

(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2004-509638  
(P2004-509638A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

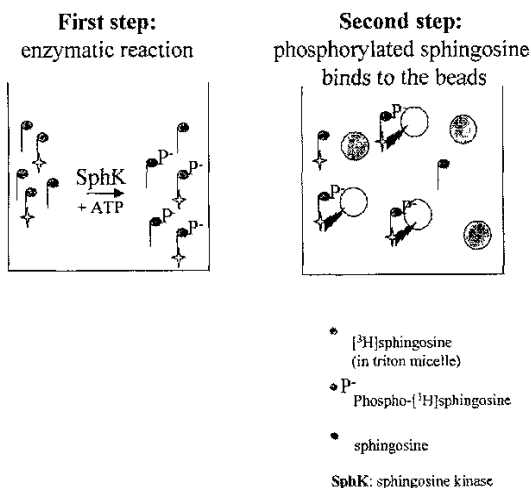
(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48	Z 2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	4 C O 8 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-530646 (P2002-530646)	(71) 出願人	391011308 ワーナー・ランバート・カンパニー、リミテッド、ライアビリティ、カンパニー WARNER-LAMBERT COMPANY LLC アメリカ合衆国ニュージャージー州 07950、モーリス・ブレインズ、テーパー・ロード 201
(86) (22) 出願日	平成13年9月28日 (2001.9.28)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月25日 (2003.3.25)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011250	(72) 発明者	ノルマン, エマニュエル フランス国、エフ-92160 アントニ、アブニュ・レオン・ジェオー 6
(87) 国際公開番号	W02002/027318		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成14年4月4日 (2002.4.4)		
(31) 優先権主張番号	00 402684.5		
(32) 優先日	平成12年9月29日 (2000.9.29)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 脂質キナーゼの調節因子をスクリーニングするための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、脂質キナーゼの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法に関する。本発明は、より好ましくは、脂質キナーゼ、特に膜脂質キナーゼ、より具体的にはスフィンゴシンキナーゼの活性を調節する化合物をスクリーニングするためにSPA技術に基づいている。本発明にはまた、該方法によって同定される化合物だけでなく、上記の方法を行うときに使用される組成物、製造物、キットなど、ならびにそれらの使用が含まれる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

脂質キナーゼの活性を調節、阻害または活性化する化合物を選択または同定する方法であって、(i) 脂質キナーゼおよびその標識された脂質基質を候補化合物およびリン酸源の存在下で混合すること、(ii) リン酸化された脂質と結合するが、リン酸化されていない脂質とは本質的には結合しない担体材料に(i)の反応混合物を曝露すること、および(iii) 該担体に結合しているリン酸化された脂質の量を評価することを含む方法。

## 【請求項 2】

担体材料が、ケイ酸イットリウム、酸化イットリウムまたはポリビニルトルエン(PVT)から選択される成分を含む、請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 3】

担体が、(ポリ)アクリルアミド、アガロース、セファロースまたはポリスチレンを(さらに)含む、請求項 1 または 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

担体がビーズまたはSPAビーズである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 5】

担体がシンチラントを含有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 6】

脂質基質が放射能標識されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 7】

脂質基質がミセル内に存在する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

20

## 【請求項 8】

脂質キナーゼが細胞抽出物または膜抽出物である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 9】

脂質キナーゼが組換え酵素である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 10】

リン酸源がATPである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 11】

(i) における反応混合物が、  
 ・ 0.01 ~ 10  $\mu$ M の非標識の脂質  
 ・ 0.01 ~ 10  $\mu$ Ci の放射能標識された脂質  
 ・ 0.1 ~ 5 % の界面活性剤(トリトンなど)または中性脂質(ホスファチジルセリンまたはカルジオリピンなど)または哺乳動物起源の血清タンパク質(BSA(ウシ血清アルブミン)、HSA(ヒト血清アルブミン)またはFBSAなど)あるいはそれらの混合物  
 ・ 0.1  $\mu$ M ~ 1 mM のリン酸源(ATPなど)、および  
 ・ 適切な希釈度で脂質キナーゼ(または脂質キナーゼを含む任意の組成物もしくは材料)を含む細胞調製物の所望する量の総タンパク質  
 を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の方法。

30

## 【請求項 12】

(i) における反応混合物が、  
 ・ 0.01 ~ 1  $\mu$ M の非標識の脂質  
 ・ 0.01 ~ 0.5  $\mu$ Ci の放射能標識された脂質  
 ・ 0.1 ~ 1 % の界面活性剤(トリトンまたはノニデットなど)あるいはその混合物  
 ・ 0.1  $\mu$ M ~ 50  $\mu$ M のリン酸源(ATPなど)、および  
 ・ 適切な希釈度で脂質キナーゼ(または脂質キナーゼを含む任意の組成物もしくは材料)を含む細胞調製物の所望する量の総タンパク質  
 を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

40

## 【請求項 13】

0 ~ 30 % のグリセロールが反応混合物にさらに添加される、請求項 11 または 12 記載

50

の方法。

【請求項 14】

15% ~ 25%、好ましくは約 20% のグリセロールが反応混合物に添加される、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

候補化合物の存在下および非存在下で担体に結合した脂質の量を比較すること、そして該量を調節する化合物を同定することを含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 16】

数個の候補化合物が同時に試験される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

工程 (i) がマイクロタイションプレートにおいて行われる、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 18】

脂質キナーゼが膜脂質キナーゼまたは細胞質脂質キナーゼまたは分泌型脂質キナーゼである、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 19】

脂質キナーゼがスフィンゴシンキナーゼである、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 20】

脂質基質がスフィンゴシンである、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 21】

スフィンゴシンキナーゼの活性を調節、阻害または活性化する化合物を選択または同定する方法であって、(i) 該スフィンゴシンキナーゼおよび放射能標識されたスフィンゴシンを候補化合物およびリン酸源の存在下で混合すること、(ii) リン酸化されたスフィンゴシンと結合するが、リン酸化されていないスフィンゴシンとは本質的には結合しない担体材料に (i) の反応混合物を曝露すること、および (iii) 該担体に結合しているスフィンゴシン - 1 - P の量を評価することを含む方法。

【請求項 22】

担体材料がケイ酸イットリウム SPA ビーズである、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

担体材料が酸化イットリウム SPA ビーズである、請求項 21 記載の方法。

【請求項 24】

脂質キナーゼの標識された脂質基質、および / またはリン酸化された脂質と結合するが、リン酸化されていない脂質とは本質的には結合しない担体材料および / または脂質キナーゼを含む、脂質キナーゼ調節因子をスクリーニングする際に使用するキット。

【請求項 25】

ヒトまたは動物の処置、診断または手術において使用される薬学的組成物を製造するための、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項記載の方法によって取得、同定、選択または特徴付けすることができる化合物の使用。

【請求項 26】

ヒトまたは動物の処置、診断または手術において使用される薬学的組成物を製造するための、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項記載の方法によって取得、同定、選択または特徴付けされた化合物の使用。

【請求項 27】

心臓血管疾患、糖尿病、発作、自己免疫疾患および炎症性疾患、アレルギー性疾患 (皮膚炎など)、Tヘルパー - 1 関連疾患、慢性閉塞性肺疾患、喘息、ガンおよび神経変性障害などの様々な病理学的状態を処置または防止するための薬学的組成物を製造するための、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項記載の方法によって取得、同定、選択または特徴付けされた化合物の使用。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

心臓血管疾患、糖尿病、発作、自己免疫疾患および炎症性疾患、アレルギー性疾患（皮膚炎など）、Tヘルパー-1関連疾患、慢性閉塞性肺疾患、喘息、ガンおよび神経変性障害などの様々な病理学的状態を処置または防止するための薬学的組成物を製造するための、請求項1～23のいずれか1項記載の方法によって取得、同定、選択または特徴付けすることができる化合物の使用。

【請求項29】

心臓血管疾患、糖尿病、発作、自己免疫疾患および炎症性疾患、アレルギー性疾患（皮膚炎など）、Tヘルパー-1関連疾患、慢性閉塞性肺疾患、喘息、ガンおよび神経変性障害などの様々な病理学的状態を処置または防止するための化合物を合成する際の、請求項1～23のいずれか1項記載の方法によって取得、同定、選択または特徴付けされた化合物の使用。

10

【請求項30】

脂質キナーゼの活性を調節、阻害または活性化する分子を合成するための方法であって、(i)脂質キナーゼおよびその標識された脂質基質を候補化合物およびリン酸源の存在下で混合すること、(ii)リン酸化された脂質と結合するが、リン酸化されていない脂質とは本質的には結合しない担体材料に(i)の反応混合物を曝露すること、および(ii)該担体に結合しているリン酸化された脂質の量を評価すること、(iv)10μM未満のIC50値を示すヒット化合物を選択すること、および(v)工程(iv)で選択されたヒット化合物を該分子の合成において使用することを含む方法。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、脂質キナーゼの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法に関する。本発明は、より好ましくは、脂質キナーゼ（特に、膜脂質キナーゼ、細胞質脂質キナーゼ、分泌型脂質キナーゼ、より具体的にはスフィンゴシンキナーゼ）の活性を調節する化合物をスクリーニングするためにSPA技術に基づいている。本発明にはまた、該方法によって同定される化合物だけでなく、上記の方法を行うときに使用される組成物、製造物、キット、ならびにそれらの使用が含まれる。

【0002】

(発明の背景)

脂質キナーゼは、細胞内で脂質のリン酸化を触媒する酵素である。これらの酵素ならびに生じるリン酸化された脂質および脂質由来の生物学的に活性な有機分子は、細胞の増殖、遊走、接着、分化、活性などを含む多くの異なる生理学的プロセスにおいて役割を果たしている。特定の脂質キナーゼ群には、膜脂質キナーゼ（すなわち、細胞膜に含まれる脂質または細胞膜と会合している脂質のリン酸化を触媒するキナーゼ）が含まれる。そのような酵素の例には、ホスフィノシチドキナーゼ（PI3キナーゼなど）、ジアシルグリセロールキナーゼ、およびスフィンゴシンキナーゼが含まれる。

30

【0003】

スフィンゴシンキナーゼ（SPHK）は基質のスフィンゴシンをスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）に変換する。S1Pは、細胞内において、そして細胞外培地に放出されたとき、その両方で様々な生理学的プロセスに関与している。具体的には、細胞内のS1Pの報告されている生理学的役割には、貯蔵体からのカルシウムの放出、サイクリン依存性キナーゼの活性化、Fc受容体によって開始されるカスケードにおける中間の重要なシグナル変換、fMLP誘導による酵素放出、TNF-誘導による（内皮細胞における）接着分子の発現、および心室筋細胞における興奮性の抑制が含まれる。さらに、細胞から放出されたとき、S1Pは、例えば、細胞増殖、走化性（マクロファージの引き寄せおよび活性化）、細胞骨格の変化（ストレスファイバーの形成および細胞形状の変化、そして分泌）、細胞付着（フィブロネクチンマトリックスの組立て）、ならびにパキシリンおよびp125-FAKの組立ておよびリン酸化の制御において共役する特異的なGタンパク質（共役EDG受容体）を介して関与している。さらに、PDGFは、血小板において高レ

40

50

ベルのスフィンゴシンキナーゼ活性およびS1P生成を誘導する。実際に、S1Pが、活性化された血小板から大量に放出される。このことは、傷害後の炎症におけるS1Pの潜在的に重要な役割を示していると考えられる。より具体的には、S1Pは初期のアテローム発生および線維症において重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、スフィンゴシンキナーゼ活性は、高親和性のIgG受容体(FcRI)によって開始されるマクロファージの場合と同様に、高親和性のIgE受容体(FcRI)を介して活性化されるマスト細胞におけるカルシウムシグナルを調節する際に大きな役割を果たしており、これらの細胞の活性化は、これらに限定されないが、喘息および慢性関節リウマチなどのアレルギー性疾患および自己免疫疾患において非常に重要である。

#### 【0004】

10

したがって、脂質（特に、膜脂質、細胞質脂質または分泌型脂質、より具体的にはスフィンゴシン-1-リン酸）は、薬物または薬理的に活性な化合物を開発するための興味深い標的である。特に、細胞内のS1Pのレベルを調節することができる化合物は、S1Pが関与するすべての疾患、例えば、アテローム性動脈硬化、血栓症および脂肪血症(dyslipidemia)を含む心臓血管疾患、I型糖尿病およびII型糖尿病を含む糖尿病（特にI型糖尿病）、発作、自己免疫疾患および炎症性疾患（多発性硬化症、乾癬、疣贅状表皮異形成および炎症性関節炎など）、アレルギー性疾患（皮膚炎など）、Tヘルパー-1関連疾患、慢性閉塞性肺疾患、喘息、ガンならびに神経変性障害などを処置するための、大きい可能性を有する化合物である。

#### 【0005】

20

したがって、そのような性質を有する化合物をスクリーニングするために好適なアッセイが利用できることは非常に注目される。これに関して、スフィンゴシンキナーゼ(SPHK)活性は、従来的には、<sup>3</sup><sup>3</sup>Pまたは<sup>3</sup><sup>2</sup>Pの取り込み、その後の脂質抽出、および<sup>3</sup><sup>3</sup>Pスフィンゴシン-1-Pまたは<sup>3</sup><sup>2</sup>Pスフィンゴシン-1-Pの薄層クロマトグラフィー(TLC)分離を使用して測定される(A. Melendezら、2000)。しかし、この試験は高感度ではあるが、ハイスループットスクリーニングには適しておらず、そしてハイスループット形式における脂質キナーゼ調節因子の効率的な同定を可能とするTLCを使用するそのような試験または方法はこの分野では報告されていない。

#### 【0006】

30

(発明の要約)

本発明は、脂質キナーゼの活性を調節、阻害または活性化する化合物を確実にかつ効率的にスクリーニングするための組成物および方法に関する。本発明による方法は、簡便で、確実に、高感度で、使いやすく、かつ経済的であり、そしてハイスループットでの化合物のスクリーニングを可能にする。特に、本発明は、薬物候補物または標的を同定するために、化合物のコンビナトリアルライブラリーを含む非常に多数の化合物を同時にスクリーニングするために使用することができる。したがって、この種の発明としては、薬学的に活性な製造物の選択、改善および/または開発のために、標的として脂質キナーゼ（特にSPHK）を使用して活性な化合物をスクリーニングすることが初めて可能になる。

#### 【0007】

40

本発明の目的は、より詳細には、脂質キナーゼの活性を調節する化合物を選択または同定する方法にある。この方法は、(i)脂質キナーゼおよびその標識された脂質基質を候補化合物およびリン酸源の存在下で混合すること（または接触させること）、(ii)（脂質キナーゼによってリン酸化された）リン酸化脂質と結合するが、リン酸化されていない脂質とは本質的には結合しない担体材料に(i)の反応混合物をさらす（曝露する）こと、および(iii)担体に結合しているリン酸化された脂質の量を評価することを含む。担体材料は、ポリマー、ゲル、ガラス、人工な成分または有機成分などの様々な成分から構成され得るか、またはそのような様々な成分を含むことができ、より詳細には、ケイ酸イットリウム、酸化イットリウムまたはポリビニルトルエン(PVT)から選択される成分から構成され得るか、またはそのような成分を含むことができる。

担体は、(ポリ)アクリルアミド、アガロース、セファロースまたはポリスチレンをさら

50

に含むことができ、あるいはさらに官能基化することができ、そしてビーズを含む様々な形態に形状化することができる。

#### 【0008】

好ましい態様によれば、本発明の方法では、シンチレーション近接技術(SPA)が使用される。該態様において、担体材料は、リン酸化された(放射能)標識されている脂質基質が結合したときに励起され得るシンチラントをさらに含む。

本発明の典型的な態様において、脂質基質はミセル内に存在し、リン酸源はATPである。

脂質キナーゼは細胞抽出物または膜抽出物であるか、あるいは精製することができる。脂質キナーゼはまた組換え酵素であってもよい。

10

好ましい態様において、(i)における反応混合物は、

- ・ 0.01 ~ 10  $\mu$ M の非標識の脂質、
- ・ 0.01 ~ 10  $\mu$ Ci の放射能標識された脂質、
- ・ 0.1 ~ 5% の界面活性剤(トリトンなど)または中性脂質(ホスファチジルセリンまたはカルジオリピンなど)または哺乳動物起源の血清タンパク質(BSA(ウシ血清アルブミン)、HSA(ヒト血清アルブミン)またはFBSAなど)あるいはそれらの混合物、

- ・ 0.1  $\mu$ M ~ 1 mM のリン酸源(ATPなど)、および

- ・ 適切な希釈で脂質キナーゼ(または脂質キナーゼを含む任意の組成物もしくは材料)を含む細胞調製物の所望する量の総タンパク質を含む。

20

#### 【0009】

これに関して、本発明のより具体的な側面は、脂質キナーゼの活性を調節、阻害または活性化する化合物を選択または同定する方法にある。この方法は、(i)該脂質キナーゼおよびその標識された脂質基質を候補化合物およびリン酸源の存在下で混合すること、(ii)リン酸化された形態の脂質と結合するが、リン酸化されていない形態の脂質とは本質的には結合しないビーズであって、標識された脂質がビーズに結合したときに標識された脂質によって励起され得るシンチラントをさらに含むビーズに(i)の反応混合物をさらすこと、および(iii)ビーズのシンチレーションを評価することによって化合物の活性を評価することを含む。

30

本発明は、脂質キナーゼの活性を調節、阻害または活性化する化合物の選択、同定、特徴付け、改善、比較などのために使用することができる。本発明は、より詳細には、膜脂質キナーゼ、細胞質脂質キナーゼまたは分泌型脂質キナーゼの調節因子、さらにより好ましくはスフィンゴシンキナーゼの調節因子をスクリーニングするために好適である。

#### 【0010】

本発明のさらなる目的は、上記に定義されるような標識された脂質および/または担体を含む、上記のスクリーニングアッセイで使用されるキットにある。

#### 【0011】

本発明のさらなる目的は、上記の方法を使用して選択または同定される化合物の薬学目的または治療目的または実験目的のための使用にある。

40

#### 【0012】

(発明の詳細な説明)

示されているように、本発明は、一般には、脂質キナーゼの調節因子についてスクリーニングする改善された方法にある。これらの方法では、標識された脂質基質、およびより好ましくは非標識のリン酸源が使用される。これらの方法は、脂質キナーゼの活性化因子ならびに阻害剤を、これらの酵素の調節因子として、すなわち、脂質キナーゼに特異的なリン酸化基質のレベルを増大または低下させる化合物としてスクリーニングするために使用することができる。好ましくは、阻害剤が選択される。すなわち、脂質キナーゼに特異的なリン酸化基質のレベルを典型的には少なくとも20%低下させ、好ましくは少なくとも50%低下させる化合物が選択される。

50

## 【0013】

典型的な態様において、本発明の方法は、(i)脂質キナーゼおよびその標識された脂質基質を候補化合物およびリン酸源の存在下で混合すること、(ii)(脂質キナーゼによってリン酸化された)リン酸化脂質と結合するが、リン酸化されていない脂質とは本質的には結合しない担体材料に(i)の反応混合物をさらすこと、および(iii)担体に結合しているリン酸化された脂質の量を評価することを含む。

## 【0014】

好ましい態様では、候補化合物の存在下で担体に結合している脂質の量が、候補化合物の非存在下で担体に結合している脂質の量と比較される。したがって、該量を調節する化合物が、脂質キナーゼの活性を調節する化合物である。

10

## 【0015】

いくつかのアッセイ形式を、本発明の方法を実施するために使用することができるが、好ましいアッセイ形式は、シンチレーション近接アッセイ(SPA)などのシンチレーションアッセイである。シンチレーション近接アッセイ(SPA)技術は、PPOなどの有機シンチラントを含有するシンチラントビーズの使用を伴う。アッセイは通常、水性環境ではそのエネルギーが容易に消失する低エネルギー放射線を放射する、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^{33}\text{P}$ などの放射性同位体を使用して水性緩衝液中で行われる。例えば、 $^3\text{H}$ により放射される電子は、6 keVの平均エネルギーを有するにすぎず、水中では非常に短い経路長(-1 ~ tm)を有する。これらの同位体の1つで標識された分子が、直接的に、またはビーズに以前に結合させられた別の分子との相互作用を介してビーズ表面に結合した場合、放射される放射線により、シンチラントが活性化され、光が発生する。発生する光の量は、ビーズに結合している標識された分子の量に比例しており、液体シンチレーション(LS)カウンターで簡便に測定することができる。標識された分子がビーズに結合していない場合、その放射エネルギーは、ビーズに到達する前に周りの水性溶媒によって吸収され、光が発生しない。したがって、結合したリガンドはシンチレーションシグナルをもたらすが、遊離状態のリガンドは非常に低いバックグラウンドをもたらす。したがって、従来の放射性リガンド結合アッセイの特徴である時間のかかる分離工程の必要性がなくなる。アッセイにおいて必要とされる操作は数回の簡単なピペット操作工程に減らされ、これにより、より良好な正確性および再現性ならびにより大きいスループットが得られる。

20

30

## 【0016】

より好ましい態様において、本発明の方法は、放射能標識されたリン酸化脂質(例えば、スフィンゴシン-1-P)をSPAビーズに結合させることを含む。結合は、他の結合手段も考えられ得るが、好ましくは、ケイ酸イットリウムビーズまたは酸化イットリウムビーズとの化学的または物理的な相互作用を介して行われる。より具体的には、結合は、リン酸化された基質のリン酸基と担体表面との相互作用(すなわち、共有結合的な結合とは異なる結合)による。アッセイ媒体または反応液は(組換え)脂質キナーゼ(例えば、hSPHK)およびATPを含む。測定されるものは、標識されたリン酸化されていない脂質(例えば、スフィンゴシン)の標識されたリン酸化脂質(例えば、S1P)への脂質キナーゼの作用による変換を妨害または増大する候補化合物の能力である。例えば、候補リガンドがhSPHKを阻害する場合には、スフィンゴシンの変換は行われず、バックグラウンドのノイズシグナルと実質的には異ならないシグナルが記録される。他方、hSPHKの阻害が起こらない場合には、スフィンゴシンのリン酸化が行われ、標識されたS1PとSPAビーズとの相互作用から生じるシグナルが記録される。

40

## 【0017】

本発明は、リン酸化された脂質と結合するが、その非リン酸化形態とは結合しないように担体材料を設計することができるという予想外の発見に由来する。本発明はまた、アッセイの効率および選択性を変化させることなく、細胞溶解物を室温で使用できることも明らかにする。本発明はさらに、384ウエルプレート形式を使用することができるので、ハイスループットが小容量で可能であること、そしてDMSOの存在により、アッセイの信

50

類性が変化しないことを明らかにする。

【0018】

担体材料

次に、本発明は、特定の担体材料を使用して活性な化合物をスクリーニングする新規な方法を開示する。担体材料は、リン酸化された脂質などの酵素活性生成物と結合する能力を有するが、リン酸化されていない脂質などの基質と結合する能力を有していない。したがって、担体に結合した脂質の量は、反応媒体中の脂質キナーゼ活性に対して比例的に相関する。担体は、リン酸化された脂質とリン酸化されていない脂質との該識別を可能にする官能基（抗体または他の反応基など）を含み得るか、あるいは該生成物を識別する能力を有する物質から構成され得る（またはそのような物質を含み得る）。

10

【0019】

これに関して、担体は、少なくとも一部が、ケイ酸塩、ポリビニルトルエン（PVT）、（ポリ）アクリルアミド、アガロース、セファロース、ポリスチレンなどから構成され得る。担体材料の具体的な例には、WGA、ストレプトアビジン、ポリリシンなどのリガンドで場合によりコーティングされたPVTまたはケイ酸塩物質が挙げられる。より好ましい物質は、酸化イットリウムもしくはケイ酸イットリウム（YtSi）（これらは場合によりコーティングもしくは官能化される）、またはPVTを含む。

【0020】

より好ましい態様において、担体はシンチラント（すなわち、有機シンチラント）を含有する。シンチラントは、好ましくは、水に不溶性であり、標識された脂質が担体に結合したときに、より高いエネルギー状態に励起され得る。シンチラントは、好適な装置（例えば、シンチレーションカウンター）を使用して検出される十分な光エネルギーをもたらさなければならない。シンチラントの典型的な例には、ジフェニルオキサゾール（PPO）がある。このシンチラントは、 $\gamma$ 線を放出する放射性同位体によって効率的に励起される。

20

【0021】

本発明において使用される好適な担体材料は市販品の中に見出すことができ、例えば、Amersham製品のWGAコーティングPVTビーズ（RPNQ0001）、PEI処理WGA PVTビーズ（RPNQ0003）、ストレプトアビジンコーティングPVTビーズ（RPNQ0007）、ポリリシンコーティングケイ酸イットリウムビーズ（RPNQ0010）、WGAコーティングケイ酸イットリウムビーズ（RPNQ0011）、ストレプトアビジンコーティングケイ酸イットリウムビーズ（RPNQ0012）およびRNA結合ケイ酸イットリウムSPAビーズ（RPNQ0013）またはRNA結合酸化イットリウムSPAビーズ（RPNQ0280）などがある。

30

【0022】

リン酸化された脂質とリン酸化されていない脂質とを識別する担体材料の能力は、実施例に記載されるような従来の結合実験を使用して測定（または確認）することができる。典型的には、担体材料は、リン酸化された標識脂質およびリン酸化されていない標識脂質で別々にコーティングすることができる。結合（または結合の非存在）を、担体に付着している標識の量を評価することによって確認することができる。リン酸化された脂質との結合の差が十分に大きい限り、リン酸されていない化脂質の残留する結合は許容され得ることを理解しなければならない。

40

【0023】

具体的な例において、担体材料は、セリウムがドーブされたケイ酸イットリウム（ $Y_2SiO_5:Ce$ ）を含む。担体は、全体が上記の物質から構成され得るか、または（ポリ）アクリルアミド、アガロースもしくはポリスチレンなどのさらなる成分を含むことができる。本発明において使用される担体材料の具体的な例には、RNA結合ケイ酸イットリウムSPAビーズ（RPNQ0625またはRPNQ0013、Amersham）がある。別の具体的な例には、酸化イットリウムSPAビーズ（RPNQ0280、Amersham）がある。

50

## 【0024】

一般に、0.05～5mgの担体材料が各アッセイについて使用される。担体材料の正確な量は、担体材料、試薬量などに依存して当業者によって調節され得ることを理解しなければならない。さらに、この段階では、アッセイ性能を改善するためにZnイオンを反応混合物または緩衝剤に添加することが可能である。担体材料の好ましい量は、特に384ウエルプレートではウエルあたり約0.5mgである。例えば、好ましい態様において、担体材料は酸化イットリウムビーズである。

## 【0025】

## 標識された脂質

上記に示されるように、本発明では、標識された脂質が上記に記載される条件のもとで用いられ、そのリン酸化された形態が検出される。標識された脂質の使用は、標識されたリン酸源(ATPなど)とは対照的に、リン酸源と担体材料との間における何らかの直接的な相互作用による非特異的なシグナルが避けられるので好都合である。

## 【0026】

標識された脂質は、好ましくは放射能標識されている。放射能標識は、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{33}\text{P}$ または $^{32}\text{P}$ を含む様々な放射性同位体を使用して行うことができる。好ましくは、放射性同位体は、水性環境においてそのエネルギーが容易に消失する低エネルギー放射線を放出しなければならない。実際、結合していない標識された基質は、担体材料に含有されるシンチラントを本質的には活性化しないことが必要である。同位体の性質は、シンチラントのタイプに依存してもまた選択され得る。例えば、PPOがシンチラントとして使用される場合、同位体は、好ましくは例えば $^3\text{H}$ など、線を放射しなければならない。

## 【0027】

アッセイのために使用される標識された脂質の量は当業者によって調節され得る。典型的な実験では、0.01～10 $\mu\text{M}$ 、好ましくは0.02～1 $\mu\text{M}$ の基質が、0.01～0.5 $\mu\text{Ci}$ の $^3\text{H}$ スフィンゴシンを含む各アッセイについて使用される。反応混合物に添加されるタンパク質の量は、その活性に依存し、当業者によって調節され得る。好ましくは、この量は、反応時間内の基質の消費が30%未満であるようにしなければならない。

## 【0028】

さらに、具体的な変形において、脂質はミセル内に取り込まれる。実際、本発明は、基質脂質がミセル内に存在するときに効率的なスクリーニング条件が得られることを明らかにする。そのような目的のために、界面活性剤、中性脂質または血清タンパク質(またはそれらの任意の混合物)を、典型的には約0.1～約5%の範囲内で、より好ましくは約0.2～約3%の範囲内で反応混合物に加えることができる。より詳細には、界面活性剤はトリトンまたはノニデットが可能であり、中性脂質はホスファチジルセリンまたはカルジオリピンが可能であり、血清タンパク質は哺乳動物起源であり、例えば、BSA(ウシ血清アルブミン)、HAS(ヒト血清アルブミン)またはFBSAなどである。

## 【0029】

より好ましい態様において、トリトンまたはノニデットなどの界面活性剤が、約0.1～約5%の範囲内で、より好ましくは約0.1%～約3%の範囲内で、最も好ましくは0.1～1%の範囲内で添加される。

## 【0030】

したがって、具体的な変形において、工程(i)における反応混合物は、放射能標識された脂質および非放射能的に標識された脂質(放射能標識されたスフィンゴシンなど)、リン酸源、界面活性剤(トリトンなど)または中性脂質、および脂質キナーゼを含む細胞抽出物(または脂質キナーゼを含む任意の組成物もしくは材料)を含む。反応混合物は、様々な試薬の接触を可能するが、それらの生物学的活性を変化させない任意の溶媒、緩衝剤、生理食塩液、水溶液などを含むことができる。

## 【0031】

10

20

30

40

50

他の具体的な変形において、工程(i)における反応混合物は、放射能標識された脂質(放射能標識されたスフィンゴシンなど)、非放射能的に標識された脂質、リン酸源、界面活性剤(トリトンなど)または中性脂質、および脂質キナーゼ(または脂質キナーゼを含む任意の組成物もしくは材料)を含む。反応混合物は、様々な試薬の接触を可能するが、それらの生物学的活性を変化させない任意の溶媒、緩衝剤、生理食塩液、水溶液などを含むことができる。

【0032】

より好ましくは、工程(i)における反応混合物は、放射能標識された脂質(放射能標識されたスフィンゴシンなど)、非放射能的に標識された脂質、リン酸源、界面活性剤(トリトンなど)、脂質キナーゼを含有する細胞抽出物または調製物を含む。

10

【0033】

さらに、ミセルの形成を容易にするために、反応混合物はさらに超音波処理することができるが、これは、アッセイを行うためには必要ではない。

【0034】

脂質キナーゼ

脂質キナーゼは様々な条件のもとで使用することができる。実際、精製された酵素、または酵素を含む任意の溶液もしくは懸濁物もしくは組成物、例えば、活性な酵素を含む細胞分画物、細胞溶解物もしくは任意の細胞調製物などを使用することが可能である。実際、本発明は、アッセイで使用するために酵素を精製および単離することを必要としないこと、そして細胞溶解物が、効率および特異性の両方の点で顕著な結果をもたらすことを明らかにする。本発明の好ましい態様では、脂質キナーゼは精製されないで使用される。

20

【0035】

特定の態様において、本発明の方法では、(組換え)哺乳動物細胞、細菌細胞または昆虫細胞に由来する(から得られる)脂質キナーゼを含む調製物、より好ましくは、細胞溶解物もしくは細胞分画物、またはそれらに由来する予備精製溶液もしくは濃縮溶液が使用される。

【0036】

酵素は様々な起源であり、例えば、ヒトまたは動物に由来し得、ヒトが好ましい。酵素は、天然に存在する酵素であってもよく、または該酵素を天然に産生する生物学的サンプル(組織培養物、細胞培養物など)から単離もしくは調製することができ、または前記酵素をコードする組換え核酸を含有する細胞から調製される組換え酵素であってもよい。

30

【0037】

これに関して、特定の態様において、脂質キナーゼは、酵素の合成を可能にする条件のもとで培養された哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞の培養物から得られる。

【0038】

酵素がスフィンゴシンキナーゼである場合、スフィンゴシンキナーゼは、原核生物細胞から、そして同様に真核生物細胞(哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞)、例えば、繊維芽細胞、血小板、単球、マクロファージ、マスト細胞、T細胞などから調製することができる。さらに、細胞は、特に、増殖因子(例えば、PDGF、EGF、FGFなど)のリガンドの存在下で、そして免疫-受容体(例えば、TCR、FcRIおよびFcRI)の活性化によって、より大きい酵素活性を生じさせるために刺激することができる。細胞は、任意の適切な培地で培養され、その後、脂質キナーゼ含有材料(細胞抽出物、分画物など)を調製するために処理され得る。典型的には、細胞は、脂質キナーゼ含有材料を調製するために物理的処理および/または化学的処理に供される。典型的な実験では、細胞は、好ましくはトリプシン、解凍/凍結サイクル、超音波などを単独または様々な組合せで使用して、酵素的溶解および/または化学的溶解および/または物理的溶解に供される。細胞抽出物(または分画物)は集められ、そしてさらに濃縮され、適切な緩衝液に懸濁され、そして精製および調整などが行われ得る。

40

【0039】

スフィンゴシンキナーゼはまた、該酵素をコードする核酸を含有するトランスフェクショ

50

ンされた細胞から得ることができる。これに関して、ヒトのスフィンゴシンキナーゼをコードする核酸配列が、Melendezら、GENE、251、19~24に記載されている。この配列は、組換え酵素を産生させるために様々なプロモーターを含有する様々なプラスミドおよび/またはベクターを使用して細胞にトランスフェクションすることができる。そのような細胞の溶解物（またはそれらに由来する他の調製物）を本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用することができる。

【0040】

好ましい態様において、スフィンゴシンキナーゼは原核生物細胞から得られるが、好ましくはSf9またはSf21などの昆虫細胞から得られる。細胞は、該酵素をコードする核酸配列を含むベクターでトランスフェクションまたは感染させられる。これに関して、バキュロウイルスが好ましいベクターであり、酵素の製造は、「Baculovirus Expression Vectors」(Davis R. O'REILLY、Lios K. MILLER、Verne A. LUCKOW)（これは参照として本明細書中に組み入れられる）に従って行われる。しかし、当業者によって知られているバキュロウイルスによるタンパク質製造に対するアッセイもまたすべて、本発明に関連して使用することができる。

10

【0041】

典型的には、使用されるキナーゼ調製物は、0.1~40 μgの総タンパク質、より好ましくは0.1~5 μgの総タンパク質、さらにより好ましくは約1 μgの総タンパク質を含む細胞溶解物または細胞分画物（または細胞から得られる他の材料）である。キナーゼ調製物はまた、（トランスフェクションされた）細胞の全抽出物を含むことができる。正確な量は当業者によって調節され得る。一般に、本発明のスクリーニングにおいて必要とされるキナーゼの量は、基質の1/3未満がアッセイのインキュベーション期間中に使用されるキナーゼの量である。好ましくは、この量は、反応時間内において基質の10%未満の消費をもたらさなければならない。

20

【0042】

または、精製された（組換え）酵素を使用することができる。

【0043】

アッセイは、プレート、チューブ、フラスコなどを含む任意の適切な担体または器具で行うことができる。一般に、接触は、多数のアッセイが同時に行うことができるマルチウエルプレートで行われる。典型的な担体には、マイクロタイタープレートが挙げられ、特に96ウエルマイクロタイタープレート形式または384ウエルマイクロタイタープレート形式およびより大きいスループットのマイクロタイタープレート形式があり、これらは操作が容易であり、そして通常の励起で照射することが容易である。他の形式もまた使用することができ、これには、より大きいマイクロタイタープレートまたはナノテクノロジーが含まれる。

30

【0044】

担体および試験化合物に依存して、様々な量の試薬をアッセイで使用することができる。典型的には、下記の量が、ウエルあたり250 μlの最終的な最大容量で分配され得る：

- ・ 0.01~10 μMの非標識の脂質、
- ・ 0.01~10 μCiの放射能標識された脂質、
- ・ 0.1~5%の界面活性剤（トリトンなど）または中性脂質（ホスファチジルセリンまたはカルジオリピンなど）または哺乳動物起源の血清タンパク質（BSA（ウシ血清アルブミン）、HSA（ヒト血清アルブミン）またはFBSAなど）あるいはそれらの混合物、
- ・ 0.1 μM~1 mMのリン酸源（ATPなど）、および
- ・ 適切な希釈で脂質キナーゼ（または脂質キナーゼを含む任意の組成物もしくは材料）を含む細胞調製物の所望する量の総タンパク質。

40

【0045】

好ましい態様において、試薬は、30 μl~100 μlの間で含まれる最終的な容量にお

50

いて下記の量範囲にある：

- ・ 0.01 ~ 1  $\mu$ M の非標識の脂質、
- ・ 0.01 ~ 0.5  $\mu$ Ci の放射能標識された脂質、
- ・ 0.1 ~ 0.5 % の界面活性剤（トリトンなど）または中性脂質（ホスファチジルセリンまたはカルジオリピンなど）または哺乳動物起源の血清タンパク質（BSA（ウシ血清アルブミン）、HSA（ヒト血清アルブミン）またはFBSAなど）あるいはそれらの混合物、
- ・ 0.1 ~ 50  $\mu$ M のリン酸源（ATPなど）、
- ・ 適切な希釈で脂質キナーゼ（または脂質キナーゼを含む任意の組成物もしくは材料）を含む細胞調製物の所望する量の総タンパク質。

10

【0046】

さらなる好ましい態様において、0 ~ 30 % のグリセロールが反応混合物に添加される。好ましくは、15 % ~ 25 % のグリセロールが反応混合物に添加され、最も好ましくは20 % が反応混合物に添加される。

【0047】

試薬および試験化合物の正確なそれぞれの量（または濃度）は、化合物のタイプ、脂質キナーゼのタイプ、インキュベーション期間の長さなどに依存して使用者によって調節され得ることを理解しなければならない。さらに、必要な場合には、酵素は、アッセイの性能を改善するためのさらなる薬剤の存在下で混合することができる。

【0048】

さらに、ATPは好ましいリン酸源である。

20

【0049】

工程 i) における混合は6時間まで続けることができるが、典型的には4時間未満である。実際、様々な試薬が、好ましくは、リン酸化を生じさせるために十分な時間にわたってインキュベーションされる。アッセイに依存するが、この期間は、通常、約3時間未満である。典型的な実験では、混合は約1時間以下にわたって行われるが、好ましくは約45分間行われる。工程 (ii) では、担体が約10分間から数時間にわたって加えられる。反応混合物の総容量に依存して、後者は最初の5 ~ 30分間振とうされる。その後、混合物は15分間 ~ 24時間の期間にわたって置かれる。担体がビーズであるとき、ビーズ溶液は0 ~ 70 % のグリセロールを含むことができ、好ましくはグリセロールを20 % 以上

30

【0050】

担体に結合している脂質の量を、脂質キナーゼの活性の目安として、様々な方法によって評価することができる。一般には、従来の装置を使用してシンチレーション計数することによって評価される。SPAに由来する方法が使用される場合、カウント数が、何らかの分離工程を必要とすることなく、反応混合物において直接的に測定される。または、担体に結合している脂質を、クロマトグラフィー、免疫アッセイなどの他の従来技術を使用して検出または定量することができる。

40

【0051】

試験（または候補）化合物

試験化合物は、単離された形態にある任意の生成物、または任意の他の物質（例えば、任意の他の生成物）との混合状態にある任意の生成物であり得る。化合物は、構造および/または組成に関して定義することができ、あるいは定義することができない。例えば、化合物には、単離された構造的に定義される生成物、構造が未知である単離された生成物、いくつかの知られている特徴付けられた生成物の混合物、または1つ以上の生成物を含む定義できない組成物を挙げることができる。そのような不明確な組成物の例には、例えば、組織サンプル、生物学的流体、細胞抽出物、植物調製物などが含まれる。試験化合物は、ポリペプチド（またはタンパク質もしくはペプチド）、核酸、脂質、多糖、化学的生成

50

物、またはそれらの任意の混合物もしくは誘導体を含む任意の有機生成物または無機生成物であり得る。化合物は、化合物のライブラリーを含む天然起源、合成起源であり得る。

【0052】

下記においてさらに議論されるように、本発明は、化合物のコンビナトリアルライブラリーなどの非常に多数の化合物をスクリーニングするために特に適合化される。実際、本発明は、複数の化合物を短時間で効率的かつ簡便なスクリーニングすることを可能にする組成物および方法を提供する。具体的には、本発明の方法は部分的に自動化することができ、それにより、化合物の多数の組合せを効率的かつ同時にスクリーニングすることを可能にする。

【0053】

一般に、試験化合物の活性は不明であり、本発明の方法は、選択された性質を示す化合物（例えば、脂質キナーゼ調節因子）を同定するために使用される。しかし、特に、試験化合物の活性（または活性のタイプ）が知られているか、または予想される場合には、本発明の方法は、該試験化合物の誘導体をアッセイすることによって、該活性を（特異性、効力などに関して）さらに特徴付けるために、および/または該活性を最適化するために使用することができる。

【0054】

本発明のさらなる目的は、上記に定義されるように取得、同定、選択または特徴付けされた化合物を、医薬品、薬物候補物、さらに最適化するためのリードなどとして製薬産業において使用することにある。これらの化合物は、例えば、ヒトの身体を処置するための組成物を製造するために、特に、心臓血管疾患、糖尿病、発作、自己免疫性疾患および炎症性疾患、アレルギー性疾患（皮膚炎など）、Tヘルパー-1関連疾患、慢性閉塞性肺疾患、喘息、ガンおよび神経変性障害などの様々な病理学的状態を処置するための組成物を製造するために使用することができる。

【0055】

本発明はまた、上記に定義されるように取得、同定、選択または特徴付けされた化合物、ならびに本発明の方法によって取得、同定、選択または特徴付けすることができる化合物を含む薬学的組成物に関する。

【0056】

本発明はまた、脂質キナーゼ調節因子をスクリーニングするときに使用されるキットを含む。このキットは、上記に定義されるような脂質キナーゼの標識された脂質基質および/または担体材料を含む。キットは、脂質キナーゼ自体、緩衝液などの、SPA技術に対する試薬および/またはプロトコルをさらに含むことができる。

【0057】

本発明のさらなる側面および利点が下記の実施例に開示される。下記の実施例は、本出願の範囲を限定するのではなく、本発明の例示と見なさなければならない。

【0058】

材料&方法

材料

すべての補充物を含む増殖培地はLife Tech (Paris、フランス)から購入した。トランスフェクション試薬はQIAGEN (Paris、フランス)から得た。すべての脂質はSigma (Paris、フランス)から購入した。[3-3H]スフィンゴシン(15mCi/mmol)はAmersham (Paris、フランス)またはNEEN (Boston、Ma)から得られた。ケイ酸イットリウムRNA結合ビーズおよび酸化イットリウムRNA結合ビーズはAmersham (Paris、フランス)から得る。

【0059】

CHO細胞および/またはCOS-7細胞におけるヒトスフィンゴシンキナーゼ(huS

PHK1)のトランスフェクション

CHO細胞またはCOS-7細胞を、5%CO<sub>2</sub>雰囲気の中、37°Cで、T-175

10

20

30

40

50

組織培養フラスコにおいて、90% Ham F12 培地、10% ウシ胎児血清、ゲンタマイシンで培養した。CHO 細胞および/または COS-7 細胞を、Qiagen 試薬 Superfect を使用して、ベクター pcDNA3 単独で、またはヒトスフィンゴシンキナーゼ cDNA を含有するベクターで一過性トランスフェクションした。細胞を  $175 \text{ cm}^2$  フラスコあたり  $5 \times 10^6$  で播種した。24 時間後、細胞を、 $20 \mu\text{l}$  の Superfect と混合された  $10 \mu\text{g}$  の cDNA で 6 時間トランスフェクションし、洗浄し、そして完全 Ham 培地で 2 日間培養した。その後、細胞をトリプシン処理し、 $1500 \text{ rpm}$  で 10 分間遠心分離して、アッセイ緩衝液に再懸濁した。細胞を 3 回の解凍/凍結サイクルに供し、そしてタンパク質濃度を、Bradford 技術 (BioRad キット) を使用して推定した。タンパク質濃度を  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調節して、小分けし、 $-20^\circ\text{C}$  で凍結保存した。 10

#### 【0060】

BL21 DE3 細胞におけるスフィンゴシンキナーゼの産生

BL21 DE3 / SK 細胞の培養物を 25 で  $50 \mu\text{M}$  の IPTG とともに一晩インキュベーションした。細菌ペレットを緩衝液 A に懸濁する。 $2 \text{ mg}/\text{ml}$  のリゾチームを加えて、調製物を 4 で 30 分間攪拌する。その後、 $\text{MgCl}_2$  ( $10 \text{ mM}$ ) を加え、次いで DNA アーゼ 1 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加え、混合物を 4 で 30 分間攪拌する。溶液を、4 で 10 秒間、約 4 回、超音波処理する。細胞の超音波処理物を  $4000 \text{ rpm}$  において 4 で 15 分間遠心分離する。得られた上清を  $-20^\circ\text{C}$  で保存する。

アッセイ緩衝液: Tris HCl  $20 \text{ mM}$ 、グリセロール  $20\%$ 、 $\beta$ -メルカプトエタノール  $1 \text{ mM}$ 、EDTA  $1 \text{ mM}$ 、オルトバナジン酸ナトリウム  $1 \text{ mM}$ 、デオキシピリドキシン  $0.5 \text{ mM}$ 、プロテアーゼ阻害剤完全カクテル (Roche, ref 1697498)。 20

#### 【0061】

昆虫細胞におけるスフィンゴシンキナーゼの産生

Sf9 細胞を、以前に記載された方法に従ってバキュロウイルスによって感染させる。感染 6 日後、細胞を溶解緩衝液で回収して、懸濁する。細胞溶液を  $16000 \text{ g}$  において 4 で 15 分間遠心分離する。上清を超音波処理し、次いで溶解緩衝液で完全に溶解する。攪拌しながら 4 で 2 時間インキュベーションした後、溶液を  $16000 \text{ g}$  において 4 で 20 分間遠心分離する。得られた上清を  $-80^\circ\text{C}$  で保存する。 30

#### 【0062】

スフィンゴシンキナーゼ活性アッセイ

スフィンゴシンキナーゼ活性を、2つの形式のシンチレーション近接アッセイ (SPA) を使用してアッセイした。

#### 【0063】

96 ウエルプレート形式でのスフィンゴシンキナーゼ活性アッセイ

a) アッセイ組成

このアッセイの総容量は  $100 \mu\text{L}$  であり、これは、DMSO に溶解された化合物または DMSO 単独  $2 \mu\text{L}$  と、 $[^3\text{H}]$ -スフィンゴシンとともにトリトンミセルを含むアッセイ緩衝液  $60 \mu\text{L}$  と、SK 緩衝液における酵素希釈物  $38 \mu\text{L}$  とを含む。 40

#### 【0064】

アッセイの組成は下記の通りである:

適切な希釈度の酵素を、 $0.125 \mu\text{Ci}$  / ウエルの  $[^3\text{H}]$ -スフィンゴシン、 $1 \mu\text{M}$  のスフィンゴシン、 $30 \mu\text{M}$  の ATP および  $0.25\%$  のトリトン、12 個の異なる濃度でアッセイされる化合物、 $20 \text{ mM}$  の TRIS、 $1 \text{ mM}$  の  $\beta$ -メルカプトエタノール、 $1 \text{ mM}$  の EDTA、 $0.5 \text{ mM}$  の 4-デオキシピリドキシン、 $40 \text{ mM}$  の  $\beta$ -グリセロホスファート、 $1 \text{ mM}$  のオルトバナジン酸塩、 $10 \text{ mM}$  の  $\text{MgCl}_2$  および  $20\%$  のグリセロールと混合する。

#### 【0065】

酵素を SK 緩衝液で希釈する。選ばれる希釈度は、 $1 \mu\text{M}$  のスフィンゴシンが約  $10\%$  消 50

費される希釈度である。この希釈物は0で調製され、この温度でアッセイに添加される。

【0066】

b) アッセイプロトコル

アッセイは96ウエルプレート(Isoplate、白色マトリックスにおける透明ウエルを有するWallac)で行われる。各プレートには、11個の1つずつの濃度で8個の化合物(I1~I11)、6個の総活性ウエル(TA)、およびDMSOのみを含有する2個の非特異的ウエル(NS)が含まれる。

【0067】

下記の溶液が最初に調製される：

・SKx1緩衝液：Tris 20mM、MgCl<sub>2</sub> 10mM、 $\beta$ -メルカプトエタノール 1mM、EDTA 1mM、4-デオキシピリドキシン 0.5mM、 $\beta$ -グリセロホスファート 40mM、オルトバナジン酸ナトリウム 1mM、グリセロール 20%、pH7.4

・SPAビーズ溶液：SPAビーズ 5mg/ml、ZnCl<sub>2</sub> 40mM、グリセロール 70%

・DMSOによる阻害剤希釈物：各阻害剤について、11個の希釈物I<sub>1</sub>~I<sub>11</sub>がポリプロピレン製の母プレートで調製される。

・アッセイ緩衝液(1枚のプレートについて)：19 $\mu$ Lのスフィンゴシン(0.5mM)、12 $\mu$ Lの[<sup>3</sup>H]-スフィンゴシン(17Ci/mmol、1mCi/ml)、29 $\mu$ LのATP(10mM)および24 $\mu$ Lのトリトン100Xとともにプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有する5676 $\mu$ LのSK緩衝液。混合物を数分間超音波処理して、ミセルエマルジョンを形成させる。

【0068】

その後、種々の構成成分がIsoplateに分配される：

・DMSO(2 $\mu$ L/ウエル)をTAウエルおよびNSウエルに加える。

・阻害剤希釈物をウエルに分配する(2 $\mu$ L/ウエル)。

・[<sup>3</sup>H]-スフィンゴシンとともにトリトンミセルを含有するアッセイ緩衝液(60 $\mu$ L/ウエル)

・適切な希釈度の酵素(38 $\mu$ L/ウエル)を、NSウエルを除くすべてのウエルに加える。

・プレートを800rpmで攪拌し、室温で45分間インキュベーションする。

・100 $\mu$ L/ウエルのSPAビーズエマルジョン(これは0.5mg/ウエルのビーズに対応する)。プレートを透明なTopseal(Packard)で覆い、800rpmで1時間攪拌し、Wallac TriLuxで計数する。

必要な場合には、このアッセイは室温で行うことができ、そして構成成分の分配を変化させることができる。

【0069】

384ウエルプレート形式でのスフィンゴシンキナーゼ活性アッセイ

a) アッセイ組成

総容量は30 $\mu$ Lであり、これは、25%DMSOに溶解された試験化合物または25%DMSO単独の3 $\mu$ Lと、[<sup>3</sup>H]-スフィンゴシンとともにトリトンミセルを含むアッセイ緩衝液14 $\mu$ Lと、SK緩衝液における酵素希釈物13 $\mu$ Lとを含む。

【0070】

アッセイの組成は下記の通りである：

適切な希釈度の酵素を、0.042 $\mu$ Ci/ウエルの[<sup>3</sup>H]-スフィンゴシン、1 $\mu$ Mのスフィンゴシン、30 $\mu$ MのATPおよび0.25%のトリトン、20 $\mu$ Mの試験化合物、20mMのTRIS、1mMの $\beta$ -メルカプトエタノール、1mMのEDTA、0.5mMの4-デオキシピリドキシン、40mMの $\beta$ -グリセロホスファート、1mMのオルトバナジン酸塩、10mMのMgCl<sub>2</sub>および20%のグリセロールと混合する。

10

20

30

40

50

## 【0071】

酵素をSK緩衝液で希釈する。選ばれる希釈度は、1 μMのスフィンゴシンおよび30 μMのATPが約10%消費される希釈度である。この希釈物は0で調製され、この温度でアッセイに添加される。

## 【0072】

## b) アッセイプロトコル

アッセイは384ウエルプレート(白色マトリックスにおける白色の384ウエルプレート)で行われる。各プレートには、11個または12個の1つずつの濃度で23個または32個の化合物(I1~I11または12)、8個の総活性ウエル(TA)、およびDMSOのみを含有する4個の非特異的ウエル(NS)が含まれる。

10

## 【0073】

下記の溶液が最初に調製される：

- ・SKx1緩衝液：Tris 20 mM、MgCl<sub>2</sub> 10 mM、β-メルカプトエタノール 1 mM、EDTA 1 mM、4-デオキシピリドキシ 0.5 mM、β-グリセロホスファート 40 mM、オルトバナジン酸ナトリウム 1 mM、グリセロール 20%、pH 7.4

- ・Leadseekerビーズ溶液：SPAビーズ 17 mg/ml、ZnCl<sub>2</sub> 40 mM、グリセロール 20%

- ・DMSOによる阻害剤希釈物。各阻害剤について、11個の希釈物I<sub>1</sub>~I<sub>11</sub>がポリプロピレン製の元プレートで調製される。

20

- ・アッセイ緩衝液(1枚のプレートについて)：23 μLのスフィンゴシン(0.5 mM)、16 μLの[<sup>3</sup>H]-スフィンゴシン(17 Ci/mmol、1 mCi/ml)、35 μLのATP(10 mM)および29 μLのトリトン100Xとともにプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有する5273 μLのSK緩衝液。

反応混合物を数分間超音波処理して、ミセルエマルジョンを形成させる。

## 【0074】

その後、種々の構成成分が(可能であれば室温で)白色マトリックスプレートに分配される：

- ・25% DMSO(3 μL/ウエル)をTAウエルおよびNSウエルに加える。

- ・25% DMSOでの阻害剤希釈物をウエルに分配する(3 μL/ウエル)。

30

- ・[<sup>3</sup>H]-スフィンゴシンとともにトリトンミセルを含有するアッセイ緩衝液(14 μL/ウエル)

- ・適切な希釈度の酵素(13 μL/ウエル)を、NSウエルを除くすべてのウエルに加える。

- ・プレートを室温で45分間インキュベーションする。

- ・30 μL/ウエルのleadseekerビーズエマルジョン(これは0.5 mg/ウエルのビーズに対応する)。

プレートを1時間~24時間置き、その後、Leadseeker(Amersham Pharmacia biotech)で計数する。

必要な場合には、構成成分の分配を変化させることができる。

40

## 【0075】

アッセイの定量：

各アッセイの定量には、下記の式を使用して阻害率が計算されるソフトウェア(エクセル97など)で生データを変換することが必要である：

$$\text{阻害\%} = 100 \times (1 - (\text{阻害された活性}_{c_{pm}} - \text{NS}_{c_{pm}}) / (\text{TA}_{c_{pm}} - \text{NS}_{c_{pm}}))$$

阻害%は、その後、モデル「Hill傾きを有するシグモイダル曲線、 $y = 100 \cdot X^n / (K^n + X^n)$ 」を使用して近似される。Kは所望のIC50である。

## 【0076】

(実施例)

50

#### 実施例 1 : スクリーニングアッセイの組立て

スフィンゴシンキナーゼ ( S P H K ) 活性は、従来のには、 $^3\ ^3\text{P}$  または  $^3\ ^2\text{P}$  の取込み、その後の脂質抽出、および  $^3\ ^3\text{P}$  スフィンゴシン - 1 - P または  $^3\ ^2\text{P}$  スフィンゴシン - 1 - P の薄層クロマトグラフィー分離を使用して測定されている ( A . M e l e n d e z ら、2000 )。この試験は非常に高感度であるが、ハイスループットのスクリーニングには適していない。今回、特定の担体材料 ( 「 R N A 結合 S P A ビーズ」 など ) が、リン酸化されていない脂質ではなく、リン酸化された脂質と特異的に結合する能力を有することが本発明者らによって発見された。これらの担体の性質の利点を利用して、2段階アッセイが組み立てられた ( 図 1 を参照のこと )。第 1 段階のスフィンゴシンの酵素的リン酸化は、上記に記載される試験に基づいている。酵素は、A T P と、トリトンミセルに取り込まれた [  $^3\text{H}$  ] スフィンゴシンとともに 1 時間インキュベーションされる。第 2 段階において、ビーズがウエルに添加され、混合物が 15 分間攪拌され、リン酸化されたトリチウム化スフィンゴシンがビーズに結合させられる。S P A の原理に従って、( リン酸化されたトリチウム化スフィンゴシンを介して ) ビーズに結合しているトリチウムの放射により、ビーズはシンチレーションが誘導され、これに対して、リン酸化されていないスフィンゴシンのトリチウムは十分に接近しておらず、シンチレーションを誘導しない。ビーズは 1 時間静置され、そしてプレートがシンチレーションカウンターで読み取られる。

10

#### 【 0 0 7 7 】

#### 実施例 2 : スクリーニングアッセイの特異性の実証

試験の特異性を、トランスフェクションされた細胞と比較して低い内因性スフィンゴシンキナーゼ活性を示す C H O 細胞または C O S 7 細胞などの非トランスフェクション細胞を使用して、以前の記載 ( A . M e l e n d e z ら、2000 ) のように評価した ( 図 2 )。図 2 は、A T P が存在しない場合、活性が妨げられること、そして既に記載された S P H K 阻害剤の N - N - ジメチルスフィンゴシンが、以前の結果とよく一致する I C 5 0 で酵素活性を阻止したことを示している。これらのデータは、このアッセイで検出される活性が S P H K 活性に対応することを強く示唆した。

20

#### 【 0 0 7 8 】

#### 実施例 3 : 37 および室温でのスクリーニングアッセイの効率の比較

シグナル対ノイズ比が、最適化された条件を使用して大きく増大した。アッセイが行われる温度はこれらの条件の 1 つである。

30

ロボット操作時における 37 でのインキュベーションを避けるために、酵素の室温および 37 での活性を比較した。図 3 に示されるように、1 時間のインキュベーション時間で、両方のインキュベーション温度における活性は等しいことが見出された。

#### 【 0 0 7 9 】

#### 実施例 4 : A T P 量およびスフィンゴシン量の決定

アッセイ条件の最適化にはまた、A T P 濃度、スフィンゴシン濃度および酵素濃度の適切な量を決定することが必要である。

S P H K の A T P ポケットは他のキナーゼのポケットとの大きい相同性を示していない ( A . M e l e n d e z、私信 ) ので、A T P 結合ポケットの遮断剤はこれらのキナーゼの特異的な阻害剤であり得る。その場合、特異的な阻害剤を選び出すことができることは重要であると考えられる。スフィンゴシンキナーゼの阻害剤を高感度で検出するために、基質濃度、すなわち、スフィンゴシンならびに A T P の濃度は、好ましくは、それらのそれぞれの  $K_M$  よりも低くしなければならない。スフィンゴシンの  $K_M$  は  $5\ \mu\text{M}$  であり ( A . M e l e n d e z ら、2000 )、A T P の  $K_M$  は約  $30\ \mu\text{M}$  である ( 図 4 B )。A T P の好ましい濃度は  $10\ \mu\text{M}$  に設定され、スフィンゴシンの濃度は  $1\ \mu\text{M}$  に設定された。さらに、図 4 A は、 $2\ \mu\text{g}$  の細胞抽出物で最大の酵素活性 (  $V_{m a x}$  ) に達することを示した。したがって、酵素量はウエルあたり  $1\ \mu\text{g}$  の細胞抽出物に設定されている。

40

#### 【 0 0 8 0 】

#### 実施例 5 : トリトン量の比較

50

シグナルを改善するために、スフィンゴシンが取り込まれているトリトンミセルの量もまた調べた。図5Aでは、トリトンX-100のいくつかの量(%)によるスフィンゴシンキナーゼの活性が比較される。本実施例では、最大のスフィンゴシンキナーゼ活性はトリトンが0.25%~1.0%の間であり、最適な活性はトリトンが1%においてであることを示している。

#### 【0081】

実施例6：様々な濃度のDMSOを用いたスフィンゴシン活性の比較

主なライブラリーの化合物はDMSOに溶解される。したがって、様々な量のこの溶媒が存在するもとでアッセイを評価することは重要である。図5Bでは、DMSOの様々な量(%)によるスフィンゴシンキナーゼの活性が比較される。本実施例では、DMSOはシグナルを20%低下させるが、10%までのDMSOはSphK活性を妨害しなかったことを明らかにしている。このことは、この溶媒は試験の性能を損なわないことを示している。

10

#### 【0082】

実施例7：リンパ球(jurkat細胞)でのスフィンゴシンキナーゼ活性

本実施例は、CHOまたはCOS-7のような他の細胞タイプ、より具体的にはリンパ球におけるスフィンゴシンキナーゼ活性の発現を明らかにする。図7によれば、スフィンゴシンキナーゼ活性が、Jurkat細胞抽出物におけるいくつかのタンパク質(酵素)量に従って記録されている。

20

#### 【0083】

まとめると、前記の実施例により、スフィンゴシンキナーゼのSPA試験が、トリチウム化スフィンゴシンおよびRNA結合ビーズを使用して組み立てられた。この試験は、96ウエル形式および384ウエル形式の両方で影響を非常に受けにくく、そして使用されるATPおよびスフィンゴシンの両方の濃度が低いため、ATPおよびスフィンゴシンの結合ポケットの両方の阻害剤を非常に優れた感度で選び出すために化合物のライブラリーを迅速にスクリーニングすることが可能になる。この試験は、精製された酵素を必要とせず、しかしその代わりに、一過性のトランスフェクション細胞の粗抽出物を使用して行われる。これは、スフィンゴシンキナーゼについてこれまでに記載された、 $^3^3\text{P}$ または $^3^2\text{P}$ を含有しない最初のアッセイである。他の脂質キナーゼも、この技術を使用してスクリーニングすることができる。

30

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、SPAに基づくアッセイの概略図である。

##### 【図2】

図2は、キナーゼ活性の特異性を示す。

##### 【図3】

図3は、SphK活性に対するインキュベーション温度の影響を示す。

##### 【図4A】

図4Aは、スフィンゴシンキナーゼ活性プロファイル(トリトン=0.25%)に対する $^3\text{H}$ スフィンゴシン酵素の影響を示す。

40

##### 【図4B】

図4Bは、シグナルに対するATP濃度の影響を示す。

##### 【図5A】

図5Aは、SphK活性に対するトリトンの影響を示す。

##### 【図5B】

図5Bは、SphK活性に対するDMSOの影響を示す。

##### 【図6】

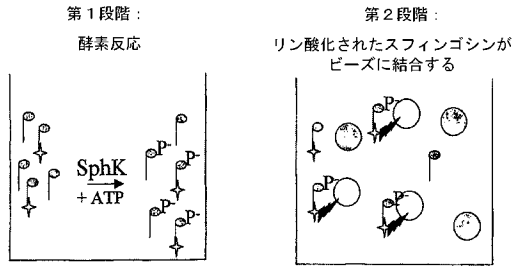
図6は、SPAビーズ定量最適化を示す。

##### 【図7】

図7は、Jurkat細胞(リンパ球)におけるSphK活性を示す。

50

【 図 1 】



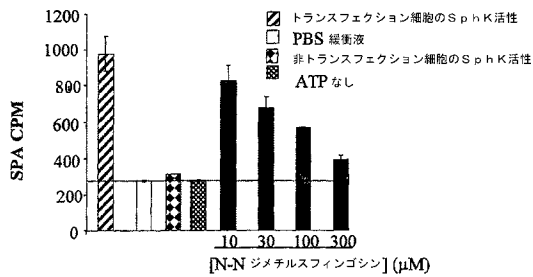
● <sup>3</sup>Hスフィンゴシン (トリトンセル内)

○P<sup>32</sup> ホスホ-<sup>3</sup>Hスフィンゴシン

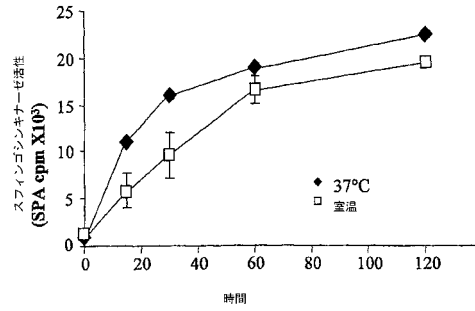
● スフィンゴシン

SphK: スフィンゴシンキナーゼ

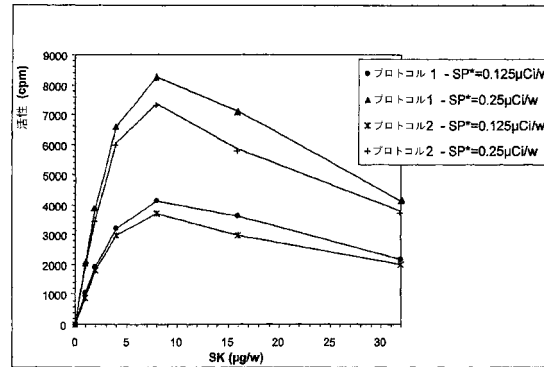
【 図 2 】



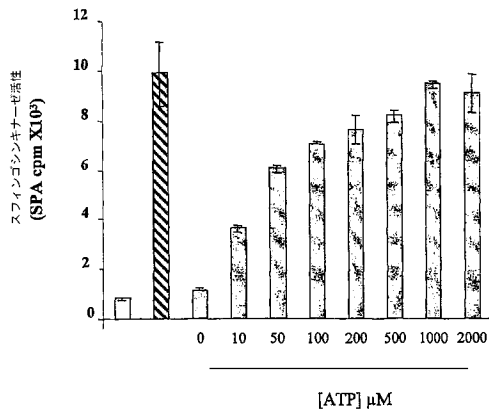
【 図 3 】



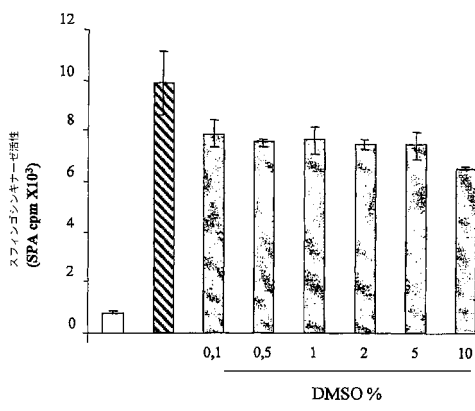
【 図 4 A 】



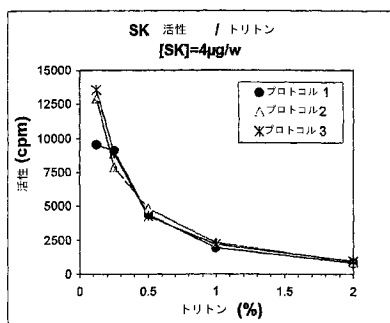
【 図 4 B 】



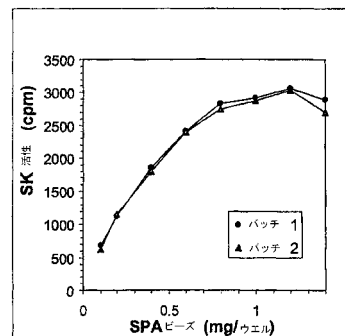
【 図 5 B 】



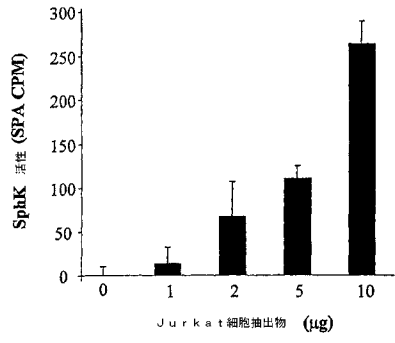
【 図 5 A 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【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  
4 April 2002 (04.04.2002)

PCT

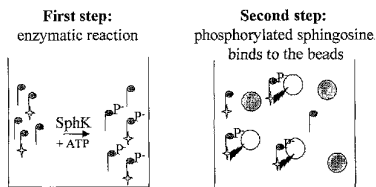
(10) International Publication Number  
**WO 02/27318 A1**

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/542**, C12Q 1/48, G01N 33/92, 33/60, 33/543 (FR). MOREAU, François [FR/FR]; 4, rue René Jacques, F-92130 Issy-les-Moulineaux (FR).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/11250 (74) Agent: **BECKER, Philippe**; Becker & Associés, 10, rue de Milan, F-75009 Paris (FR).
- (22) International Filing Date: 28 September 2001 (28.09.2001) (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00 402684.5 29 September 2000 (29.09.2000) EP (71) Applicant (for all designated States except US): **WARNER-LAMBERT COMPANY** [US/US]; 201, Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).
- (72) Inventors: and (75) Inventors/Applicants (for US only): **NORMANT, Emmanuel** [FR/FR]; 6, avenue Léon Jouhaux, F-92160 Antony (FR). **MELENDEZ, Alirio** [GB/GB]; 19, Résidence des Cécéaux, F-94260 Fresnes (FR). **CASAMITJANA, Olivier** [FR/FR]; 7, rue la Vieuville, F-75018 Paris
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR SCREENING MODULATORS OF LIPID KINASES



- <sup>3</sup>H]sphingosine (in Triton micelle)
- P- Phospho-[<sup>3</sup>H]sphingosine
- sphingosine
- SphK: sphingosine kinase

WO 02/27318 A1

(57) Abstract: The present invention relates to methods of screening compounds that modulate lipid kinase activity. The invention is more preferably based on the SPA technology to screen compounds that modulate the activity of lipid kinases, in particular membrane lipid kinases, more specifically sphingosine kinases. The invention also includes compositions, products, kits, etc. for use in performing the above methods, as well as the compounds identified by said methods, and their uses.

**WO 02/27318 A1** 

**Published:**  
— with international search report

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

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

1

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR SCREENING****MODULATORS OF LIPID KINASES**Field of Invention

5 The present invention relates to methods of screening compounds that modulate lipid kinases activity. The invention is more preferably based on the SPA technology to screen compounds that modulate the activity of lipid kinases, in particular membrane lipid kinases, cytosolic lipid kinases, secreted lipid kinases and more specifically sphingosine kinases. The invention also includes compositions, products, kits for use in  
10 performing the above methods, as well as the compounds identified by said methods, and their uses.

Background of the Invention

15 Lipid kinases are enzymes that catalyse the phosphorylation of lipids within cells. These enzymes, and the resulting phosphorylated lipids and lipid derived biologically active organic molecules, play a role in many different physiological processes, including cell proliferation, migration, adhesion, differentiation, activity, etc. A particular group of lipid kinases comprises membrane lipid kinases, i.e., kinases that catalyse the  
20 phosphorylation of lipids contained in or associated with cell membranes. Examples of such enzymes include phosphoinositide(s) kinases (such as PI3-kinases); diacylglycerol kinases; and sphingosine kinases.

Sphingosine kinases (SPHK) convert the substrate sphingosine to sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P is involved in various physiological processes, both within cells  
25 and upon release in extracellular medium. In particular, reported physiological roles of S1P within cells include the release of calcium from stores, activation of cyclin-dependent kinases, key signalling intermediate in Fc receptor initiated cascades, fMLP induced enzyme release, TNF- $\alpha$  induced (in endothelial cells) adhesion molecule  
30 expression, and depression of excitability in ventricular myocytes. Furthermore, when released from the cells, S1P is involved through specific G protein coupled (couple EDG-receptors) for instance in the control of cell proliferation, chemotaxis (attraction

CONFIRMATION COPY

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

2

and activation of macrophages), cytoskeletal changes (stress fiber formation and cell shape changes, and secretion), cell attachment (fibronectin matrix assembly) and assembly and phosphorylation of paxillin and p125-FAK. Moreover, PDGF induces high levels of sphingosine kinase activity and SIP generation in platelets. In fact, SIP is released from activated platelets in large amounts. This could indicate a potential important role of SIP in inflammation following injury. More particularly, SIP could play an important role in early atherogenesis and fibrosis. Furthermore, sphingosine kinases activity play a major role in regulating calcium signals in mast cells activated via the high affinity IgE receptor (FcεRI), as well as in macrophages triggered by the high affinity IgG receptor (FcγRI), and activation of these cells are very important in allergic and auto-immune diseases, such as but not limited to, asthma and rheumatoid arthritis.

Accordingly, lipids, in particular membrane, cytosolic or secreted lipids, more specifically sphingosine-1-phosphate represent an interesting target for the development of drugs or pharmacologically active compounds. In particular, compounds having the ability to modulate the levels of SIP in cells would represent high potential compounds for the treatment of all diseases wherein SIP is involved such as cardiovascular diseases including atherosclerosis, thrombosis and dyslipidemia, diabetes including type I and type II diabetes and particularly type I diabetes, stroke, auto-immune and inflammatory diseases such as multiple sclerosis, psoriasis, epidermodysplasia verruciformis and inflammatory arthritis, allergic diseases such as dermatitis, T helper-1 related diseases, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, cancer and neurodegenerative disorders.

The availability of assays suitable to screen compounds having such property would thus be of major interest. In this respect, the sphingosine kinase (SPHK) activity is classically measured using <sup>33</sup>P or <sup>32</sup>P incorporation, followed by lipid extraction and thin layer chromatography (TLC) separation of <sup>33</sup>P or <sup>32</sup>P sphingosine-1-P (A. Melendez et al., 2000). However, although this test is very sensitive, it is not suitable for high throughput screening, and no such test or method using TLC has been reported in the art, allowing efficient identification of lipid kinase modulators in high throughput format.

Summary of the Invention

5 The present invention discloses compositions and methods for the screening of compounds that modulate, inhibit or activate the activity of lipid kinases, with reliability and efficacy. The methods according to this invention are simple, reliable, sensitive, convenient and economical, and allow screening of compounds, on a high throughput basis. In particular, the invention can be used to screen, in parallel, large numbers of  
10 compounds, including combinatorial libraries of compounds, to identify drug candidates or targets. This type of invention thus allows, for the first time, to screen active compounds using lipid kinases as targets, in particular SPHK, for the selection, improvement and/or development of therapeutically active products.

15 An object of this invention resides more specifically in a method of selecting or identifying a compound that modulates the activity of a lipid kinase, comprising (i) mixing (or contacting) the lipid kinase and a labeled lipid substrate thereof in the presence of a candidate compound and a source of phosphate, (ii) exposing the reaction mixture of (i) to a support material, wherein the support material binds the  
20 phosphorylated lipid (that has been phosphorylated by the lipid kinase) and essentially does not bind the unphosphorylated lipid, and (iii) assessing the amount of phosphorylated lipid bound to the support.

The support material may be composed of or comprise various elements, such as polymers, gels, glass, artificial or organic elements, etc... and more precisely  
25 components selected from yttrium-silicate, yttrium-oxide or polyvinyltoluene (PVT). The support may further comprise (poly)acrylamide, agarose, sepharose or polystyrene or may be further functionalized, and may be shaped into various forms, including beads.

30 According to preferred embodiments, the method uses the scintillation proximity technology (SPA). In said embodiments, the support material further comprises a

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

4

scintillant, which can be excited upon binding of the phosphorylated, (radio)labeled lipid substrate.

In a typical embodiment of the invention the lipid substrate is in a micelle and the source of phosphate is ATP.

5 The lipid kinase is a cell or membrane extract or may be purified. The lipid kinase may also be a recombinant enzyme.

In a preferred embodiment, the reaction mixture in (i) comprises:

- 0.01-10  $\mu$ M of unlabeled lipid
- 0.01-10  $\mu$ Ci of radio-labelled lipid,
- 10 - 0.1 to 5% of detergent, such as Triton, or neutral lipid, such as phosphatidyl serine or cardiolipine, or serum proteins from mammalian origin such as BSA (bovine serum albumin), HAS (human serum albumin) or FBSA ; or a mixture thereof,
- 0.1  $\mu$ M to 1 mM of phosphate source, such as ATP, and
- 15 - the desired amount of total proteins of a cell preparation comprising a lipid kinase (or any composition or material comprising the same) at the appropriate dilution.

In this regard, a more particular aspect of this invention resides in a method of selecting  
20 or identifying a compound that modulates, inhibits or activates the activity of a lipid kinase, comprising (i) mixing the said lipid kinase and a labeled lipid substrate thereof in the presence of a candidate compound and a source of phosphate, (ii) exposing the reaction mixture of (i) to beads, wherein the beads bind the lipid in phosphorylated form and essentially do not bind the lipid in unphosphorylated form, the beads further  
25 comprising a scintillant which is excitable by the labeled lipid upon binding thereof to the beads, and (iii) assessing the activity of the compound by assessing the scintillation of the beads.

The invention can be used for selecting, identifying, characterizing, improving, comparing, etc... compounds that modulate, inhibits or activates the activity of lipid  
30 kinases. The invention is more particularly suited for screening modulators of membrane lipid kinases, cytosolic lipid kinases or secreted lipid kinases, even more preferably sphingosine kinases.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

5

A further object of this invention resides in a kit for use in the above screening assay, comprising a labelled lipid and/or a support as defined above.

- 5 A further object of this invention resides in the use of compounds selected or identified using the above methods, for pharmaceutical, therapeutical or experimental purposes.

#### Legend to the Drawings

- 10 Figure 1 : Schematic representation of the SPA based assay  
Figure 2 : Specificity of the kinase activity  
Figure 3 : Effect of incubation temperatures on SphK activity  
Figure 4 : Effect of [<sup>3</sup>H]sphingosine enzyme on Sphingosine Kinase activity profiles (Triton = 0.25%) (4A) and ATP concentration on the signal (4B)  
15 Figure 5 : Effect of Triton (5A) and DMSO (5B) on SphK activity  
Figure 6 : SPA beads quantity optimisation  
Figure 7: SphK activity in Jurkat cells (lymphocytes)

#### Detailed Description of the Invention

20

As indicated, this invention resides, generally, in improved methods of screening for modulators of lipid kinases. These methods, generally, use labeled lipid substrates, and more preferably unlabelled phosphate source. The methods can be used to screen  
25 activators as well as inhibitors of lipid kinases as modulators of these enzymes, i.e., compounds that increase or decrease the levels of phosphorylated substrate specific for lipid kinases. Preferably, inhibitors are selected, i.e., compounds that decrease the levels of phosphorylated substrate specific for a lipid kinase, typically by at least 20%, preferably by at least 50%.

- 30 In a typical embodiment, the method comprises (i) mixing the lipid kinase and a labeled lipid substrate thereof in the presence of a candidate compound and a source of phosphate, (ii) exposing the reaction mixture of (i) to a support material, wherein the

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

6

support material binds the phosphorylated lipid (that has been phosphorylated by the lipid kinase) and essentially does not bind the unphosphorylated lipid, and (iii) assessing the amount of phosphorylated lipid bound to the support.

5 In a preferred embodiment, the amount of lipid bound to the support in the presence of a candidate compound is compared to the amount of lipid bound to the support in the absence of a candidate compound, compounds modulating said amount representing compounds that modulate the activity of the lipid kinase.

10 While several assay formats can be used to carry out the method of the present invention, a preferred assay format is scintillation assays such as the scintillation proximity assay (SPA). Scintillation proximity assay (SPA) technology involves the use of scintillant beads that contain an organic scintillant such as PPO. Assays are usually carried out in aqueous buffers using radioisotopes such as  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$  or  $^{32}\text{P}$  that  
15 emit low-energy radiation, the energy of which is easily dissipated in an aqueous environment. For example, the electrons emitted by  $^3\text{H}$  have an average energy of only 6 keV and have a very short path length ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) in water. If a molecule labelled with one of these isotopes is bound to the bead surface, either directly or via interaction with another molecule previously coupled to the bead, the emitted radiation will activate the  
20 scintillant and produce light. The amount of light produced, which is proportional to the amount of labelled molecules bound to the beads, can be measured conveniently with a liquid scintillation (LS) counter. If the labelled molecule is not attached to the bead, its radiation energy is absorbed by the surrounding aqueous solvent before it reaches the bead, and no light is produced. Thus, bound ligands give a scintillation signal, but free  
25 ligands give a very low background, and the need for a time-consuming separation step, characteristic of conventional radioligand binding assays, is eliminated. The manipulations required in the assays are reduced to a few simple pipetting steps leading to better precision and reproducibility, and a higher throughput.

30 In a more preferred embodiment, the method comprises the binding of radiolabelled phosphorylated lipids (e.g., sphingosine-1-P) to SPA beads. The binding is preferably carried out through chemical or physical interaction with yttrium-silicate or yttrium-

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

7

oxyde beads, although other binding means can be contemplated. More specifically, the binding is due to the interaction (i-e bound other than covalent bound) between the phosphate group of the phosphorylated substrate and the support surface. The assay medium or reaction comprises a (recombinant) lipid kinase (e.g., hSPHK,) and ATP.

5 What is measured is the ability of the candidate compound to prevent or increase the conversion of labelled unphosphorylated lipid (e.g., sphingosine) to labelled phosphorylated lipid (e.g., SIP) by action of the lipid kinase. For instance, if the candidate ligand inhibits hSPHK, hence the conversion of sphingosine will not occur and a signal not substantially different from the background noise signal will be  
10 recorded. On the other hand, if no hSPHK inhibition occurs, sphingosine phosphorylation will take place and a signal resulting from the interaction between labelled SIP and the SPA bead will be recorded.

This invention stems from the unexpected discovery that support material can be  
15 designed to bind phosphorylated lipids and not unphosphorylated forms thereof. The invention also shows that cell lysates can be used, at room temperature, without altering the efficacy and selectivity of the assay. The invention further shows that high throughput is feasible, since 384-wells plates format can be used, with low volumes, and that the presence of DMSO does not alter the reliability of the assay.

20

#### The support Material

The present invention now discloses a novel method of screening active compounds using particular support material. The support material has the ability to bind the product of the enzymatic activity such as the phosphorylated lipid but not bind the  
25 substrate such as the unphosphorylated lipid. Accordingly, the amount of lipid bound to the support is directly correlated to the lipid kinase activity in the reaction medium. The support may comprise either functional groups allowing said discrimination between phosphorylated and unphosphorylated lipids, such as antibodies or other reactant groups, or be composed of (or comprise) a material having the capacity to distinguish  
30 said products.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

8

In this regard, the support may be composed, at least in part, of silicate, polyvinyltoluene (PVT), (poly)acrylamide, agarose, sepharose, polystyrene, etc. Specific examples of support material include PVT or silicate material, optionally coated with ligands such as WGA, streptavidin, polylysine, etc. More preferred material  
5 comprises yttrium-oxide or yttrium silicate (YtSi), optionally coated or functionalized, or PVT.

In a more preferred embodiment, the support contains a scintillant (or an organic scintillant). The scintillant is preferably water insoluble and excitable to a higher energy  
10 state upon binding of the labeled lipid to the support. The scintillant should produce sufficient light energy to be detected using suitable device (scintillation counter, for instance). A typical example of scintillant is diphenyloxazole (PPO). This scintillant is efficiently excited by radioisotopes emitting beta rays.

Suitable support material for use in the present invention may be found in the  
15 commerce, such as for instance from Amersham products WGA-coated PVT beads (RPNQ0001), PEI-treated WGA PVT beads (RPNQ0003), streptavidin-coated PVT beads (RPNQ0007), polylysine-coated yttrium silicate beads (RPNQ0010), WGA coated yttrium silicate beads (RPNQ0011), streptavidin coated yttrium silicate  
20 beads (RPNQ0012) and RNA-binding yttrium silicate SPA beads (RPNQ0013) or RNA-binding yttrium oxide SPA beads (RPNQ0280).

The ability of the support material to discriminate between phosphorylated and unphosphorylated lipids can be determined (or verified) using conventional binding  
25 experiments as described in the examples. Typically, the support material can be contacted, separately, with a phosphorylated and unphosphorylated labeled lipid. Binding (or absence of binding) can be verified by assessing the amount of label attached to the support. It should be understood that residual binding of the unphosphorylated lipid may be tolerated, as long as the difference in binding with  
30 phosphorylated lipid is sufficiently important.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

9

In a specific example, the support material comprises cerium-doped yttrium ion silicate ( $\text{Y}_2\text{SiO}_5:\text{Ce}$ ). The support may be composed entirely of the above material, or comprise additional components such as (poly)acrylamide, agarose or polystyrene. A specific example of a support material for use in the instant invention is the RNA-binding  
5 yttrium silicate SPA beads (RPNQ0625 or RPNQ0013, Amersham). Another specific example is the Yttrium oxyde SPA beads (RPNQ0280, Amersham).

Generally, from 0.05 to 5 mg of support material is used for each assay. It should be understood that the precise amount of support material can be adjusted by the skilled  
10 person, depending on the support material, amounts of reagents, etc. Furthermore, in this step, it is possible to add, to the reaction mixture or buffer, Zn ions to improve the performance of the assay. Preferred quantity of support material is about 0.5 mg by well particularly in 384 well plate. For instance, in a preferred embodiment the support material is yttrium oxide beads.

15

#### The labelled Lipid

As indicated above, this invention employs a labelled lipid, whose phosphorylated form is detected, under the conditions described above. The use of a labelled lipid, as  
20 opposed to a labelled source of phosphate (such as ATP) is advantageous since it avoids non-specific signal due to any direct interaction between the source of phosphate and the support material.

The labelled lipid is preferably radiolabelled. Radiolabeling can be performed using various radioisotopes, including  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{33}\text{P}$  or  $^{32}\text{P}$ . Preferably, the radioisotope  
25 should emit low-energy radiation, the energy of which is easily dissipated in an aqueous environment. Indeed, it is required that unbound labeled substrate essentially fails to activate the scintillant contained in the support material. The nature of the isotope may be selected also depending on the type of scintillant. For instance, where PPO is used as a scintillant, the isotope should preferably emit beta rays, such as  $^3\text{H}$  for instance.

30

The amount of labeled lipid used for the assay can be adjusted by the skilled person. In a typical experiment, between 0.01 to 10  $\mu\text{M}$  and preferred between 0.02 to 1  $\mu\text{M}$  of

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

10

substrate are used for each assay including 0.01 to 0.5 $\mu$ Ci of [ $^3$ H] sphingosine. The amount of protein to add in the reaction mixture depends on its activity and can be adjusted by the skilled person. Preferably, this amount should lead to less than 30% consumption of the substrate within the reaction time.

5

Furthermore, in a specific variant, the lipid is incorporated in a micelle. Indeed, the invention shows that efficient screening conditions are obtained when the substrate lipid is present in a micelle. To that effect, it is possible to add a detergent, a neutral lipid or a serum protein (or any mixture thereof) to the reaction mixture, typically within the

10

range of about 0.1 to about 5%, more preferably from about 0.2 to about 3%. More particularly, the detergent may be Triton or Nonidet, the neutral lipid may be phosphatidyl serine or cardiolipine, and the serum proteins are of mammalian origin, such as BSA (bovine serum albumin), HAS (human serum albumin) or FBSA.

15

In a more preferred embodiment, a detergent is added, such as Triton or Nonidet, within the range of about 0.1 to about 5%, more preferably from about 0.1 to about 3% and most preferred from 0.1 to 1%.

20

Accordingly, in a specific variant, the reaction mixture in step (i) comprises the radio-labeled and unradio-labeled lipids (such as radio-labeled sphingosine), a source of phosphate, a detergent (such as Triton) or a neutral lipid, and cell extract comprising the lipid kinase (or any composition or material comprising the same). The reaction mixture may comprise any solvent, buffer, saline solution, aqueous solution, etc., that allows contacting of the various reagents and does not alter their biological activity.

25

In an other specific variant, the reaction mixture in step (i) comprises the radio-labeled lipid (such as a radio-labeled sphingosine), unradio-labeled lipids, a source of phosphate, a detergent (such as Triton) or a neutral lipid, and the lipid kinase (or any composition or material comprising the same). The reaction mixture may comprise any solvent, buffer, saline solution, aqueous solution, etc., that allows contacting of the various reagents and does not alter their biological activity.

30

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

11

More preferably, the reaction mixture in step (i) comprises the radio-labeled lipid (such as a radio-labeled sphingosine), an unradio-labeled lipid, a source of phosphate, a detergent (such as Triton), and cell extracts or preparation containing the lipid kinase.

- 5 Furthermore, to facilitate the formation of micelles, the reaction mixture may be further sonicated, although this is not required for performing the assay.

#### The Lipid Kinase

- The lipid kinase may be used under various conditions. Indeed, it is possible to use  
10 purified enzyme, or any solution or suspension or composition comprising the enzyme, such as cell fractions, cell lysates, or any cell preparation comprising the active enzyme. This invention indeed shows that it is not required to purify and isolate the enzyme for use in the assay, and that cell lysates provide remarkable results, both in terms of efficacy and specificity. In a preferred embodiment of the instant invention the lipid  
15 kinase is used non-purified.

- In a particular embodiment, the method uses a preparation comprising the lipid kinase derived (or obtained) from (recombinant) mammalian, bacterial or insect cells, more preferably a cell lysate or cell fractions, or a pre-purified or enriched solution derived  
20 therefrom.

- The enzyme may be of various origin, such as human or animal, preferably human. The enzyme may be a naturally-occurring enzyme, isolated or prepared from a biological sample that naturally produces the said enzyme (tissue culture, cell culture, etc.), or a  
25 recombinant enzyme, prepared from cells containing a recombinant nucleic acid encoding the same.

- In this respect, in a particular embodiment, the lipid kinase is obtained from a culture of mammalian cells, preferably human cells, cultured under conditions allowing the  
30 synthesis of the enzyme.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

12

Where the enzyme is a sphingosine kinase, it can be prepared from procaryotic cells as well as eucaryotic cells (mammalian, preferably human) cells such as fibroblasts, platelets, monocytes, macrophages, mast cells, T cells etc. Furthermore, the cells may be stimulated to trigger higher enzymatic activity, in particular in the presence of ligands such as, growth factors (e.g. PDGF; EGF; FGF etc...) and via the activation of immune-receptors (e.g. TCR; FcεRI and FcγRI). The cells may be cultured in any appropriate medium, and then treated to prepare the lipid-kinase-containing material (cell extracts, fractions, and the like). Typically, the cells are subjected to physical and/or chemical treatment, to produce the lipid-kinase-containing material. In a typical experiment, the cells are subjected to enzymatic and/or chemical and/or physical lysis, preferably using trypsin, thaw/freeze cycle(s), ultra-sounds, etc., either alone or in various combinations. The cell extracts (or fractions) are collected, and may be further concentrated, suspended in appropriate buffers, purified, conditioned, etc.

Sphingosine kinase may also be obtained from transfected cells containing a nucleic acid encoding said enzyme. In this regard, the nucleic acid sequence encoding a human sphingosine kinase has been described in *Melendez et al. GENE 251, 19-24*. The sequence may be transfected into cells, using various plasmids and/or vectors, containing various promoters, to produce the recombinant enzymes. The lysate of such cells (or other preparations derived therefrom) may be used in the screening assays of this invention.

In a preferred embodiment, the Sphingosine Kinase is obtained from procaryotic cells and preferably from insect cells such as Sf9 or Sf21. The cells are transfected or infected by a vector comprising the nucleic acid sequence encoding the said enzyme. In this regard, baculovirus is a preferred vector and enzyme production is made according to "Baculovirus Expression Vectors" Davis R. O'REILLY, Lois K. MILLER, Verne A. LUCKOW incorporated herein by reference. However, any assay for protein production by baculovirus known by the skilled artisan is also usable in the context of the present invention.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

13

Typically, the kinase preparation used is a cell lysate or fractions (or other material derived from cells) comprising between 0.1 to 40  $\mu\text{g}$  of total proteins, more preferably between 0.1 to 5  $\mu\text{g}$  of total proteins, even more preferably about 1  $\mu\text{g}$  of total proteins. The kinase preparation may also comprise total (transfected) cell extracts. The precise amounts can be adjusted by the skilled person. Generally, the amount of kinase required in the screening of this invention is the amount of kinase which uses during the incubation period of the assay less than one third of the substrate. Preferably, this amount should lead to less than 10% consumption of the substrate within the reaction time.

10

Alternatively, purified (recombinant) enzymes may be used.

The assay can be performed in any appropriate support or device, including plate, tube, flask, and the like. Generally, contacting is performed in multi-well plates, allowing multiple assays to be carried out in parallel. Typical supports include microtiter plates, especially the 96-well or 384-well and higher throughput microtiter plate formats, which are easy to manage and easy to illuminate with conventional excitation. Other formats may also be used, including larger microtiter plates or nanotechnologies.

Depending on the support and test compound, varying amounts of reagents can be used in the assay. Typically, the following amounts may be distributed in a final maximum volume of 250  $\mu\text{l}$  per well:

- 0.01 to 10  $\mu\text{M}$  of unlabeled lipid
- 0.01 to 10  $\mu\text{Ci}$  of radio-labelled lipid,
- 25 - 0.1 to 5% of detergent, such as Triton, or neutral lipid, such as phosphatidyl serine or cardiolipine, or serum proteins from mammalian origin such as BSA (bovine serum albumin), HAS (human serum albumin) or FBSA ; or a mixture thereof,
- 0.1  $\mu\text{M}$  to 1 mM of phosphate source, such as ATP, and
- 30 - the desired amount of total proteins of a cell preparation comprising a lipid kinase (or any composition or material comprising the same) at the appropriate dilution.

In a preferred embodiment, the reagents are in the following ranges of quantity in a final volume comprised between 30  $\mu$ l and 100  $\mu$ l :

- 5        - 0.01 to 1  $\mu$ M of unlabeled lipid
- 0.01 to 0.5  $\mu$ Ci of radio-labelled lipid,
- 0.1 to 0.5% of detergent, such as Triton, or neutral lipid, such as phosphatidyl serine or cardiolipine, or serum proteins from mammalian origin such as BSA (bovine serum albumin), HAS (human serum albumin) or FBSA ; or a mixture thereof,
- 10        - 0.1  $\mu$ M to 50  $\mu$ M of phosphate source, such as ATP,
- the desired amount of total proteins of a cell preparation comprising a lipid kinase (or any composition or material comprising the same) at the appropriate dilution.

15

In further preferred embodiment 0 to 30 % of glycerol is added to the reaction mixture. Preferably 15 % to 25% of glycerol is added and most preferred about 20% is added to the reaction mixture.

20

It should be understood that the precise respective amounts (or concentration) of reagents and test compounds can be adjusted by the user, depending on the type of compound, the type of lipid kinase, the length of incubation period, etc. Furthermore, if necessary, the enzyme can be mixed in the presence of additional agents to improve the performance of the assay.

25

Furthermore, while ATP is a preferred source of phosphate.

The mixing in step i) can last for up to 6 hours, typically less than 4 hours. Indeed, the various reagents are preferably incubated for a period of time sufficient to allow phosphorylation to occur. Depending on the assays, this period usually lasts less than about 3 hours. In a typical experiment, the mixing is performed for about 1 hour or less

30

and preferably about 45 minutes. In step (ii), the support is added for about 10 minutes to several hours. Depending on the total volume of the reaction mixture, the latter is shaken during the first 5-30 minutes. The mixture is then left for a period of time between 15 minutes to 24 hours. When the support is beads, the beads solution may  
5 comprise between 0 to 70% of glycerol and preferably more than 20%. For instance, in 96 wells plate format assay 70% of glycerol is preferably added in beads solution and 20% of glycerol is added in beads solution for the 384 wells plate assay.

The amount or quantity of lipid bound to the support can be assessed by various ways,  
10 as an indication of the activity of the lipid kinase. Generally, it is assessed by scintillation counting using conventional devices. Where SPA-derived method is used, the counts are measured directly in the reaction mixture, with no need for any separation step. Alternatively, the support bound lipid may be detected or quantified using other conventional techniques, such as chromatography, immuno-assay, etc.

15

The test (or candidate) compound(s)

The test compound can be any product in isolated form or in mixture with any other material (e.g., any other product(s)). The compound may be defined in terms of structure and/or composition, or it may be undefined. For instance, the compound may  
20 be an isolated and structurally-defined product, an isolated product of unknown structure, a mixture of several known and characterized products or an undefined composition comprising one or several products. Examples of such undefined compositions include for instance tissue samples, biological fluids, cell extracts, vegetal preparations, etc. The test compound may be any organic or inorganic product,  
25 including a polypeptide (or a protein or peptide), a nucleic acid, a lipid, a polysaccharide, a chemical product, or any mixture or derivatives thereof. The compounds may be of natural origin, synthetic origin, including libraries of compounds.

As will be further discussed below, the present invention is particularly adapted for the screening of large numbers of compounds, such as combinatorial libraries of  
30 compounds. Indeed, the instant invention provides compositions and methods allowing efficient and simple screening of several compounds in short periods of time. In

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

16

particular, the instant methods can be partially automated, thereby allowing efficient and simultaneous screening of large sets of compounds.

Generally, the activity of the test compound(s) is unknown, and the method of this invention is used to identify compounds exhibiting the selected property (e.g., lipid kinase modulators). However, in particular instances where the activity (or type of activity) of the test compound(s) is known or expected, the method can be used to further characterize said activity (in terms of specificity, efficacy, etc.) and/or to optimise said activity, by assaying derivatives of said test compounds.

10

A further object of the present invention resides in the use of a compound obtained, identified, selected or characterized as defined above, in the pharmaceutical industry, as a medicament, drug candidate, lead for further optimisation, etc. These compounds may for instance be used for the manufacture of a composition for the treatment of the human body, in particular for the treatment of various pathological conditions such as cardiovascular diseases, diabetes, stroke, autoimmune and inflammatory diseases, allergic diseases such as dermatitis, T helper-1 related diseases, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, cancer and neurodegenerative disorders.

20

The invention also relates to a pharmaceutical composition comprising a compound obtained, identified, selected or characterized as defined above as well as a compound obtainable, identifiable, selectable or characterizable by the method of the instant invention.

25

The invention also includes kits for use in screening a lipid kinase modulators, the kits comprising a labeled lipid substrate of the lipid kinase and or a support material as defined above. The kit may further include the reagents and/or protocols for SPA technology, such as the lipid kinase itself, buffers, etc.

30

Further aspects and advantages of the present invention will be disclosed in the following examples, which should be regarded as illustrative and not limiting the scope of the present application.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

17

#### Material & methods

##### *Material*

Growth medium including all supplements were purchased from LifeTech (Paris, France). Transfection reagents were from QIAGEN (Paris, France). All lipids were purchased from Sigma (Paris, France). [3-3H]sphingosine, 15 mCi/mmol were from Amersham (Paris, France) or NEN (Boston, Ma). Yttrium silicate RNA binding beads and Yttrium oxyde RNA binding beads are from Amersham (Paris, France).

##### 10 *Transfection of human sphingosine kinase (huSPHK1) in CHO or COS-7 cells*

CHO and/or COS-7 cells were cultured in 90% Ham F12 medium, 10% fetal bovine serum, Gentamycin, in T-175 tissue culture flasks in air with 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. CHO and/or COS-7 cells were transiently transfected with the vector pcDNA3 alone or vector containing the human sphingosine kinase cDNA, using the Qiagen reagent Superfect. They were seeded 5 X 10<sup>6</sup> per 175 cm<sup>2</sup> flask. After 24hrs, cells were transfected with 10µg of cDNA mixed with 20µl Superfect for 6 hrs, washed, and cultured for 2 days in complete Ham medium. They were then trypsinized, centrifuged down at 1500 rpm for 10 min, and resuspended in assay buffer. They underwent 3 thaw/freeze cycles and protein concentration were estimated using the Bradford technique (Biorad kit). The protein concentration was adjusted to 1µg/µl, and aliquots were kept frozen at -20°C.

##### *Sphingosine kinase production in BL21DE3 cells*

The culture of BL21DE3/SK cells is induced with IPTG 50µM at 25°C for all the night. The bacterial pellet is suspended in the buffer A. 2mg/ml of lysosyme is added and the preparation is stirred for 30min at 4°C. After, addition of Mgcl (10mM) then DNA' ase 1 (10µg/ml) is added and the mixture is stirred for 30 min at 4°C. The solution is sonicated around four times for 10sec at 4°C. The cell sonicate is centrifuged at 4000rpm for 15 min at 4°C. The supernatant obtained is stored at -20°C.

30 Assay buffer: Tris Hcl 20mM, glycérol 20%, β-Mercaptoethanol 1mM, EDTA 1mM, Sodium orthovanadate 1mM, Deoxyypyridoxine 0.5mM, Protease inhibitor cocktails complete (Roche, ref 1697498)

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

18

*Sphingosine kinase production in Insect cells*

Sf9 cells are infected by baculovirus according to the method previously mentioned. After 6 days of infection, cells are recovered with lyse buffer and suspended. The solution cells is centrifuged 15 minutes at 16000g at 4°C. The supernatant is sonicated then completed with lyse buffer. After 2 hours incubation at 4°C under agitation, the solution is centrifuged at 4°C, 20 minutes at 16000g. The supernatant obtained is store at -80°C.

10

*Sphingosine kinase activity assay*

Sphingosine kinase activity was assayed using a 2 formats of scintillation proximity assay (SPA):

15

Sphingosine Kinase activity assay in 96 wells plate format

## a) Assay composition

The total volume of this assay is 100  $\mu$ L comprising 2  $\mu$ L of compound dissolved in DMSO or DMSO alone with 60  $\mu$ L Assay Buffer containing triton micelles with [ $^3$ H]-Sphingosine and 38  $\mu$ L Enzyme dilution in SK Buffer.

The Composition of the assay is the following :

The Enzyme at the appropriate dilution is mixed with 0.125  $\mu$ Ci/well [ $^3$ H]-Sphingosine, 1  $\mu$ M Sphingosine, 30  $\mu$ M ATP and 0.25% Triton, the compound to assayed at 12 different concentrations, 20mM TRIS, 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mM EDTA, 0.5mM 4 deoxyypyridoxine, 40mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1mM Orthovanadate, 10mM MgCl<sub>2</sub> and 20% glycerol

The enzyme is diluted in SK buffer. The dilution choosen is the one that leads to about 10% consumption of 1  $\mu$ M Shingosine. This dilution is prepared at 0 °C and added to the assay at this temperature.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

19

## b) Assay protocol

The assay is carried out in 96 well plates (Isoplate, Wallac with clear well in white matrix). Each plate includes 8 compounds at 11 singulates concentrations (I1 –I11), 6 total activity wells (TA) and 2 non specific wells (NS) containing only DMSO.

The following solutions are first prepared :

- SKx1 buffer : Tris 20mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, β-mercaptoethanol 1mM, EDTA 1mM, 4 Deoxyypyridoxine 0.5mM, β-glycerophosphate 40mM, Sodium orthovanadate 1mM, glycerol 20%, pH 7.4
- SPA beads solution : SPA beads 5mg/ml, ZnCl<sub>2</sub> 40mM, Glycerol 70%
- Inhibitor dilutions with DMSO : For each inhibitor, 11 dilutions I<sub>1</sub> – I<sub>11</sub> are prepared on a polypropylene mother plate.
- Assay Buffer (for 1 plate) : 5676 μl SK buffer containing protease inhibitor cocktails with 19μL Sphingosine (0.5mM), 12μl [<sup>3</sup>H]-Sphingosine (17Ci/mmol, 1mCi/ml), 29μL ATP (10mM) and 24μl Triton 100X. The mixture is sonicated for few minutes to form micelles emulsion

The different constituents are then distributed in the Isoplate :

- . DMSO (2μL/well) is added in the TA wells and NS Wells.
- . Inhibitor dilutions are distributed in wells (2μL/well)
- . Assay Buffer containing triton micelles with [<sup>3</sup>H]-Sphingosine (60μL/well)
- . Enzyme (38μL/well) at the appropriate dilution is added in all the wells except NS wells
- . The plate is stirred at 800rpm and incubate for 45 min at room temperature
- . 100 μL/well of SPA beads emulsion (corresponding to 0.5mg /well beads) . The plate is covered with a transparent Topseal (Packard), stirred for 1 hour at 800rpm and counted on a Wallac Trilux.
- This assay could be carried out at room temperature and the distribution of constituents could be altered if necessary.

Sphingosine Kinase activity assay in 384 wells plate format

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

20

## a) Assay composition

The total volume is 30  $\mu$ L comprising 3  $\mu$ L of test compound dissolved in 25%DMSO or 25%DMSO alone with 14 $\mu$ L assay buffer containing triton micelles with [<sup>3</sup>H]-  
5 Sphingosine and 13  $\mu$ L enzyme dilution in SK Buffer.

The composition of the assay is the following :

The enzyme at the appropriate dilution is mixed with 0.042 $\mu$ Ci/well [<sup>3</sup>H]-Sphingosine, 1 $\mu$ M Sphingosine, 30 $\mu$ M ATP and 0.25% Triton, 20 $\mu$ M of test compound , 20mM  
10 TRIS, 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mM EDTA, 0.5mM 4 deoxyripyridoxine, 40mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1mM Orthovanadate, 10mM MgCl<sub>2</sub> and 20% glycerol.

The enzyme is diluted in SK buffer. The dilution chosen is the one that leads to about 10% consumption of 1 $\mu$ M Shingosine and 30 $\mu$ M ATP. This dilution is prepared at 0 °C  
15 and added to the assay at this temperature.

## b) Assay protocol

The assay is carried out in 384 well plates (white 384-well plate in white matrix). Each plate includes 23 or 32 compounds at 11 or 12 singulates concentrations (I1 -I11 or 12),  
20 8 total activity wells (TA) and 4 non specific wells (NS) containing only DMSO.

The following solutions are first prepared :

- SKx1buffer : Tris 20mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 1mM, EDTA 1mM, 4  
25 Deoxyripyridoxine 0.5mM,  $\beta$ -glycerophosphate 40mM, Sodium orthovanadate 1mM, glycerol 20%, pH 7.4
- Leadseeker beads solution : SPA beads 17mg/ml, Zncl<sub>2</sub> 40mM, Glycerol 20%
- Inhibitor dilutions with DMSO. For each inhibitor, 11 dilutions I<sub>1</sub> - I<sub>11</sub> are prepared on a polypropylene mother plate .
- 30 - Assay Buffer (for 1 plate) : 5273  $\mu$ l SK buffer containing protease inhibitor cocktails with 23 $\mu$ L Sphingosine (0.5mM), 16 $\mu$ l [<sup>3</sup>H]-Sphingosine (17Ci/mmol, 1mCi/ml), 35 $\mu$ L ATP (10mM), 29 $\mu$ l Triton 100X

The reaction mixture is sonicated for few minutes to form micelles emulsion

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

21

The different constituents are then distributed, in the white matrix plate (possibly at room temperature) :

- . 25%DMSO (3 $\mu$ L/well) is added in the TA wells and NS Wells.
- 5 . Inhibitor dilutions in 25% DMSO are distributed (3 $\mu$ L/well)
- . Assay Buffer containing triton micelles with [<sup>3</sup>H]-Sphingosine (14 $\mu$ L/well)
- . Enzyme (13 $\mu$ L/well) at the appropriate dilution is added in all the wells except NS wells
- . The plate is incubated for 45 min at room temperature
- 10 . 30  $\mu$ L/well of leadseeker beads emulsion (corresponding to 0.5mg/well beads)
- The plate wait between 1 hour to 24 hours before is counted on a Leadseeker (Amersham Pharmacia biotech)
- The distribution of constituents could be altered is necessary.

15

Assays quantitation :

The quantitation of each assay needs that the raw data are transfered on a software (such as Excel 97) where percentages of inhibition are calculated using the following formula :

20

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times (1 - (\text{Inhibited activity}_{\text{cpm}} - \text{NS}_{\text{cpm}}) / (\text{TA}_{\text{cpm}} - \text{NS}_{\text{cpm}}))$$

The % Inhibition are then fitted using the model « Sigmoidal curve with Hill slope ,  $y=100 * X^n / (K^n + X^n)$  ». K is the desired IC50.

25

#### EXAMPLES

##### 30 **Example 1 : screening assay setting up**

The sphingosine kinase (SPHK) activity is classically measured using <sup>33</sup>P or <sup>32</sup>P incorporation, followed by lipid extraction and thin layer chromatography separation of <sup>33</sup>P or <sup>32</sup>P sphingosine-1-P (A. Melendez et al., 2000). Although this test is very

sensitive, it is not suitable for high throughput screening. It has now been discovered by the inventors that particular support material (such as "RNA binding SPA beads") have the ability to specifically bind phosphorylated lipids and not unphosphorylated lipids. Taking advantage of the property of these supports, a two-steps assay was set up (see figure 1). The first step, enzymatic phosphorylation of sphingosine, is based on the test described above. The enzyme is incubated for an hour with ATP and [<sup>3</sup>H] sphingosine incorporated in triton micelles. In a second step, beads are added to the wells and the mix is agitated for 15 minutes, allowing the phosphorylated tritiated sphingosine to bind to the beads. According to the SPA principle, the  $\beta$  emission of the tritium bound to the beads (via the phosphorylated tritiated sphingosine) induce the beads to scintillate, whereas the tritium of unphosphorylated sphingosine, not closed enough, does not. The beads settle down for an hour, and the plate is read on a scintillation counter.

**Example 2 : demonstration of screening assay specificity**

The specificity of the test was assessed using untransfected cells such as CHO or COS7 cells which exhibited a low endogenous sphingosine kinase activity compared to transfected cells (Fig. 2), as previously described (A. Melendez et al., 2000). Figure 2 shows that absence of ATP prevent activity, and that the already described SPHK inhibitor N-N-dimethylsphingosine blocked the enzyme activity with an IC50 in good agreement with previous results. These data strongly suggested that the activity detected in this assay correspond to the SPHK activity.

**Example 3 : comparison of efficiency of the screening assay at 37°C and at room temperature**

The signal to noise ratio has been greatly increased using optimized conditions. The temperature at which the assay is performed is one of these conditions.

In order to avoid a 37°C incubation during the robotic process, room temperature and 37°C activity of the enzyme was compared. As shown in figure 3, at one hour incubation time, activities at both incubation temperatures were found equivalent.

**Example 4 : determination of ATP and sphingosine quantity**

Optimization of assay conditions need also the determination of adequate quantities of ATP, sphingosine, and enzyme concentration .

Since the ATP pocket of SPHKs does not exhibit a high homology with other kinases pocket (A. Melendez, personal communication), ATP binding pocket blockers might be specific inhibitors of these kinases. It might be then important to be able to sort them out. To detect sphingosine kinases inhibitors with a high sensitivity, substrate concentrations, i.e. sphingosine as well as ATP concentrations, should then preferably be below their respective  $K_M$ . Sphingosine  $K_M$  is  $5\mu\text{M}$  (A. Melendez, et al., 2000) and the ATP  $K_M$  is around  $30\mu\text{M}$  (Figure 4B). The preferred concentration of ATP has been set up at  $10\mu\text{M}$  and the concentration of sphingosine at  $1\mu\text{M}$ . Furthermore, Figure 4A indicated that the maximal enzyme activity ( $V_{\text{max}}$ ) is reached with  $2\mu\text{g}$  of cell extract. The amount of enzyme is therefore set up at  $1\mu\text{g}$  of cell extract per well.

**Example 5 : comparison of triton quantity**

To improve the signal, quality of the triton micelles in which sphingosine was incorporated was also checked. Figure 5A compares the sphingosine kinase activity according to several quantities of Triton X-100 (%). This example shows that maximum of sphingosine kinase activity is between 0.25 % and 1.0 % triton with an optimal activity at 1% triton.

**Example 6 : comparison of sphingosine activity with different concentrations of DMSO**

Compounds from main libraries are dissolved in DMSO. It is therefore important to validate the assay in presence of various amount of this solvent. Figure 5B compares the sphingosine kinase activity according to several quantities of DMSO (%). Accordingly, this example shows that, although DMSO decrease the signal by 20%, up to 10% DMSO did not block the SphK activity, indicating that the solvent will not diminish the quality of the test.

**Example 7 : Sphingosine kinase activity in lymphocytes (jurkat cells)**

This example shows the expression of sphingosine kinase activity in other cell type as CHO or COS-7 and more particularly in lymphocytes. According to figure 7 sphingosine kinase activity is recorded according to several quantities of protein (enzyme) in Jurkat cells extracts.

5

In conclusion, according to the preceding examples a sphingosine kinase SPA test has been set up, using tritiated sphingosine and RNA binding beads. This test is very robust, both on 96 and 384 wells format, and allows us to screen quickly compounds libraries to sort out inhibitors of both ATP and sphingosine binding pockets with an exquisite

10

sensitivity due to the low concentrations of both ATP and sphingosine which are used. This test doesn't require purified enzyme, but instead, is run using raw extracts of transiently transfected cells. This is the first non  $^{33}\text{P}$ - or  $^{32}\text{P}$ -containing assay described so far for sphingosine kinase. Other lipid kinases might be screened using this technique.

15

## CLAIMS

1. A method of selecting or identifying a compound that modulates, inhibits or activates  
5 the activity of a lipid kinase, comprising (i) mixing the lipid kinase and a labeled lipid  
substrate thereof in the presence of a candidate compound and a source of phosphate,  
(ii) exposing the reaction mixture of (i) to a support material, wherein the support  
material binds the phosphorylated lipid and essentially does not bind the  
unphosphorylated lipid, and (iii) assessing the amount of phosphorylated lipid bound to  
10 the support.
2. The method according to claim 1, wherein the support material comprises  
components selected from yttrium-silicate, yttrium-oxide or polyvinyltoluene (PVT).
- 15 3. The method according to claim 1 or 2, wherein the support (further) comprises  
(poly)acrylamide, agarose, sepharose or polystyrene
4. The method according to anyone of the preceding claims, wherein the support is a  
bead or SPA bead.  
20
5. The method according to anyone of the preceding claims, wherein the support  
contains a scintillant.
6. The method according to anyone of the preceding claims, wherein the lipid substrate  
25 is radiolabelled.
7. The method according to anyone of the preceding claims, wherein the lipid substrate  
is in a micelle.
- 30 8. The method according to anyone of the preceding claims, wherein the lipid kinase is  
a cell or membrane extract.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

26

9. The method according to anyone of the preceeding claims, wherein the lipid kinase is a recombinant enzyme.
10. The method according to anyone of the preceeding claims, wherein the source of phosphate is ATP.
11. The method according to anyone of the preceeding claims, wherein the reaction mixture in (i) comprises:
- 0.01 to 10  $\mu\text{M}$  of unlabeled lipid
  - 10 - 0.01 to 10  $\mu\text{Ci}$  of radio-labelled lipid,
  - 0.1 to 5% of detergent, such as Triton, or neutral lipid, such as phosphatidyl serine or cardiolipine, or serum proteins from mammalian origin such as BSA (bovine serum albumin), HAS (human serum albumin) or FBSA ; or a mixture thereof,
  - 15 - 0.1  $\mu\text{M}$  to 1 mM of phosphate source, such as ATP, and
  - the desired amount of total proteins of a cell preparation comprising a lipid kinase (or any composition or material comprising the same) at the appropriate dilution.
12. The method according to anyone of the preceeding claims, wherein the reaction mixture in (i) comprises:
- 0.01 to 1  $\mu\text{M}$  of unlabeled lipid
  - 0.01 to 0.5  $\mu\text{Ci}$  of radio-labelled lipid,
  - 0.1 to 1% of detergent, such as Triton, or Nonidet; or a mixture thereof,
  - 25 - 0.1  $\mu\text{M}$  to 50  $\mu\text{M}$  of phosphate source, such as ATP, and
  - the desired amount of total proteins of a cell preparation comprising a lipid kinase (or any composition or material comprising the same) at the appropriate dilution.
13. The method according to claim 11 or 12, wherein 0 to 30 % of glycerol is further added to the reaction mixture.
- 30

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

27

14. The method according to claim 13, wherein 15 % to 25% of glycerol is added and preferably about 20% is added to the reaction mixture.
15. The method according to anyone of the preceding claims, comprising comparing the amount of lipid bound to the support in the presence and in the absence of a candidate compound, and identifying the compound that modulates said amount.
16. The method according to anyone of the preceding claims, wherein several candidate compounds are tested in parallel.
17. The method according to anyone of the preceding claims, wherein step (i) is performed in a microtitration plate.
18. The method according to anyone of the preceding claims, wherein the lipid kinase is a membrane, cytosolic or secreted lipid kinase.
19. The method according to anyone of the preceding claims, wherein the lipid kinase is a sphingosine kinase .
20. The method according to anyone of the preceding claims, wherein the lipid substrate is sphingosine.
21. A method of selecting or identifying a compound that modulates, inhibites or activates, the activity of a sphingosine kinase, comprising (i) mixing the said sphingosine kinase and a radiolabelled sphingosine in the presence of a candidate compound and a source of phosphate, (ii) exposing the reaction mixture of (i) to a support material, wherein the support material binds phosphorylated sphingosine and essentially does not bind unphosphorylated sphingosine, and (iii) assessing the amount of sphingosine-1-P bound to the support.
22. The method of claim 21, wherein the support material is an yttrium-silicate SPA bead.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

28

23. The method of claim 21, wherein the support material is an yttrium-oxide SPA bead.
- 5 24. A kit for use in screening of lipid kinase modulators, the kit comprising a labeled lipid substrate of the lipid kinase and/or a support material wherein the support material binds the phosphorylated lipid and essentially does not bind the unphosphorylated lipid and/or the lipid kinase.
- 10 25. The use of a compound obtainable identifiable, selectable, or characterizable by the method according to anyone of claims 1 to 23 for the manufacture of a pharmaceutical composition to be used in the treatment, diagnosis or surgery of the human or animal.
- 15 26. The use of a compound obtained, identified, selected or characterized by the method according to any one of claims 1 to 23, for the manufacture of a pharmaceutical composition to be used in the treatment, diagnosis or surgery of the human or animal.
- 20 27. The use of a compound obtained, identified, selected or characterized by the method according to any one of claims 1 to 23, for the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment or prevention of various pathological conditions such as cardiovascular diseases, diabetes, stroke, autoimmune and inflammatory diseases, allergic diseases such as dermatitis, T helper-1 related diseases, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, cancer and neurodegenerative disorders.
- 25 28. The use of a compound obtainable, identifiable, selectable or characterizable by the method according to any one of claims 1 to 23, for the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment or prevention of various pathological conditions such as cardiovascular diseases, diabetes, stroke, autoimmune and inflammatory diseases,
- 30 allergic diseases such as dermatitis, T helper-1 related diseases, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, cancer and neurodegenerative disorders.

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

29

29. The use of a compound obtained, identified, selected or characterized by the method according to any one of claims 1 to 23, in the synthesis of a compound for the treatment or prevention of various pathological conditions such as cardiovascular diseases, diabetes, stroke, autoimmune and inflammatory diseases, allergic diseases such as dermatitis, T helper-1 related diseases, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, cancer and neurodegenerative disorders.

30. A method for the synthesis of a molecule that modulates, inhibits or activates the activity of a lipid kinase, comprising (i) mixing the lipid kinase and a labeled lipid substrate thereof in the presence of a candidate compound and a source of phosphate, (ii) exposing the reaction mixture of (i) to a support material, wherein the support material binds the phosphorylated lipid and essentially does not bind the unphosphorylated lipid, and (iii) assessing the amount of phosphorylated lipid bound to the support, (iv) selecting a hit compound exhibiting an IC<sub>50</sub> value below 10 μM, and (v) using the hit compound selected in step (iv) in the synthesis of said molecule.

20

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

1/9

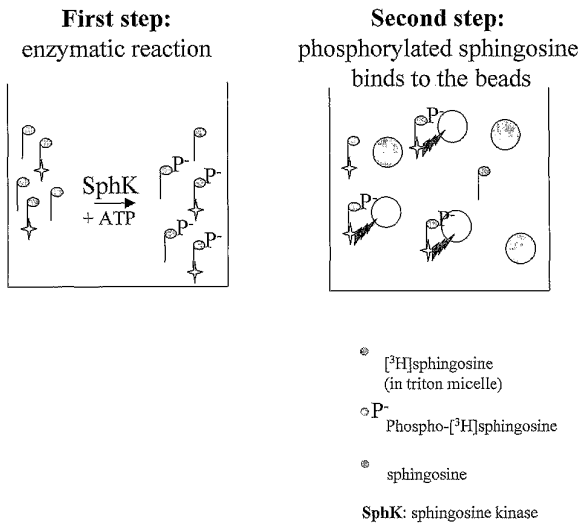


Figure 1

2/9

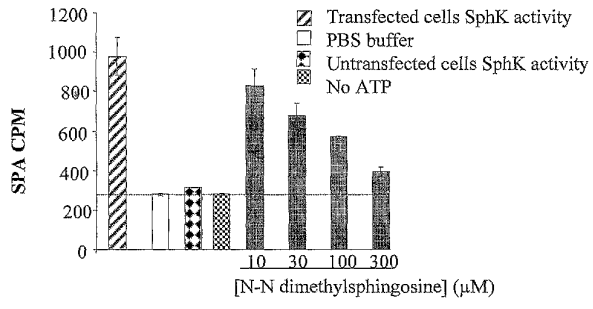


Figure 2

3/9

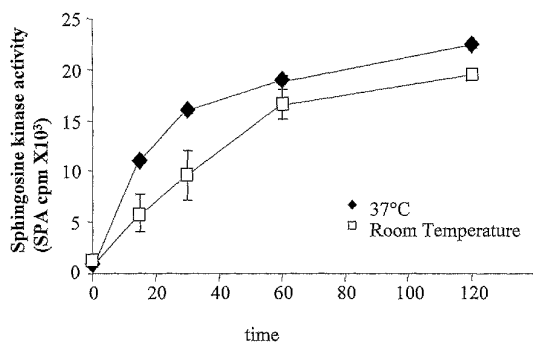


Figure 3

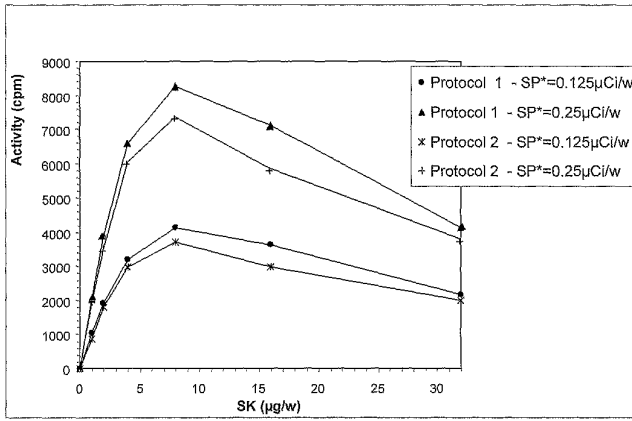


Figure 4 A

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

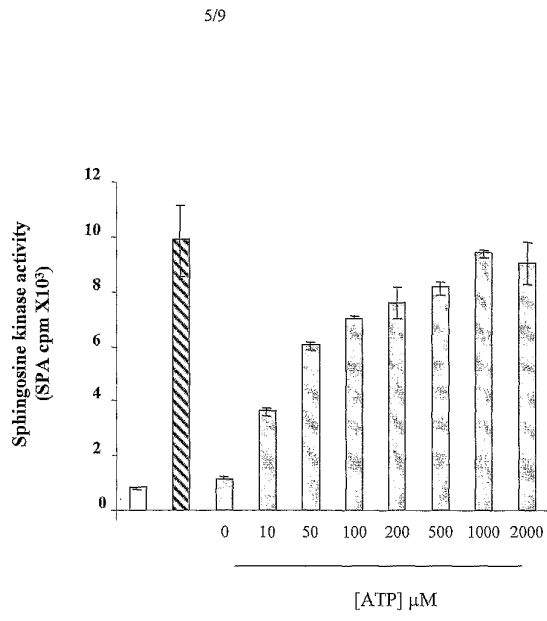


Figure 4 B

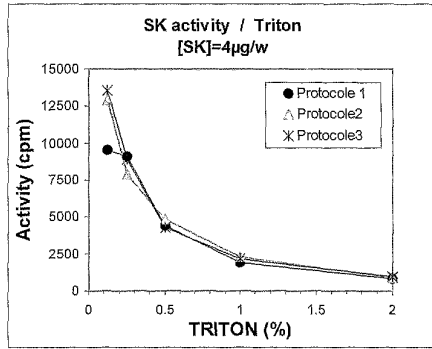


Figure 5 A

WO 02/27318

PCT/EP01/11250

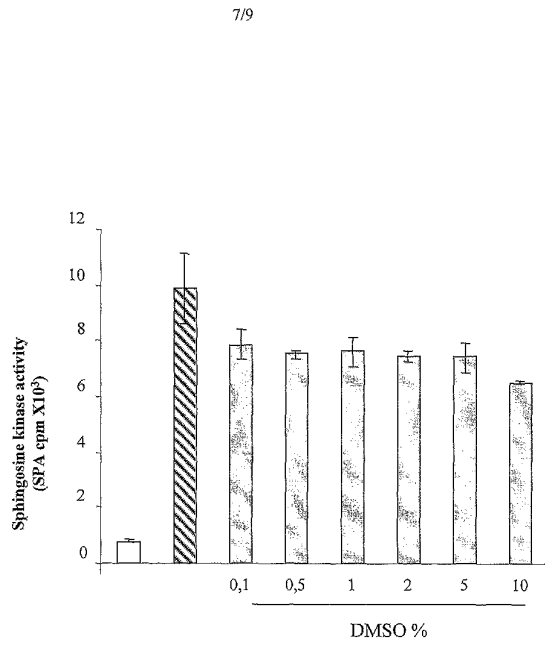


Figure 5 B

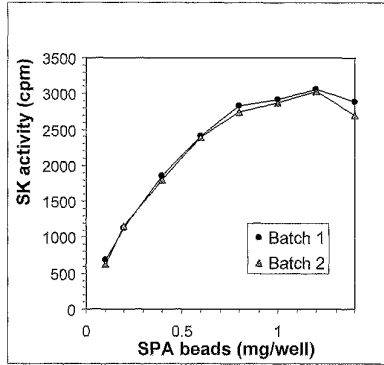


Figure 6

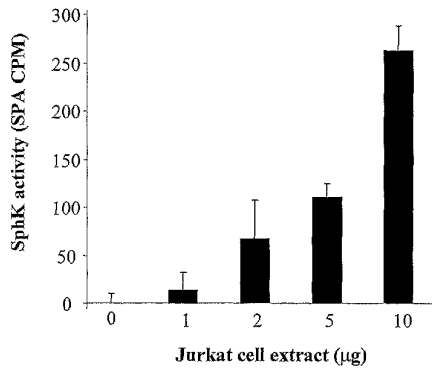


Figure 7

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. EP 01/11250
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/542 C12Q1/48 G01N33/92 G01N33/60 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 00207 A (CABOT MYLES ;LOS ANGELES CHILDRENS HOSPITAL (US); MAURER BARRY JAM) 6 January 2000 (2000-01-06) page 2, line 33 -page 3, line 13; claims 8,10	25-28
X	WO 99 12533 A (BARTER PHILIP ;PITSON STUART (AU); GAMBLE JENNIFER (AU); RYE KERRY) 18 March 1999 (1999-03-18) claims 1,2,15,16	25-28
X	EP 0 381 514 A (BIOMEMBRANE INST ;CORNELL RES FOUNDATION INC (US); KANTO ISHI PHAR) 8 August 1990 (1990-08-08) claims 2,5,9,10,14,22 -- --	25-28
--		
-/-		
<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.		
* Specific categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *C* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
13 December 2001	21/12/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2740, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer: Gunster, M	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 .../EP 01/11250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 098 631 A (SHAYMAN JAMES A ET AL) 8 August 2000 (2000-08-08) claims 1-9	25-28
A	WO 99 61581 A (DEAN OF RESEARCH AND GRADUATE ;SPIEGEL SARAH (US)) 2 December 1999 (1999-12-02) page 35, line 33 -page 36, line 21 claims 18,19	1,6, 8-10,15, 19,21
A	WO 91 08489 A (PACKARD INSTRUMENT CO INC) 13 June 1991 (1991-06-13) the whole document	1-5
A	WO 00 37613 A (MASURE STEFAN LEO JOZEF ;RICHARDSON ALAN (BE); JANSSEN PHARMACEUTII) 29 June 2000 (2000-06-29) claim 41 page 25, line 20 -page 26, line 2	1-23
A	YATOMI Y ET AL: "N,N-DIMETHYLSPHINGOSINE INHIBITION OF SPHINGOSINE KINASE AND SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE ACTIVITY IN HUMAN PLATELETS" BIOCHEMISTRY,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, vol. 35, no. 2, 16 January 1996 (1996-01-16), pages 626-633, XP000647642 ISSN: 0006-2960 the whole document	25-28

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2002)

International Application No. PCT/JP 01 A1250

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 25-28 partially

Present claims 25-28 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being identifiable by the method of claims 1-23.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only one of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the screening methods per se and the only supported example: N,N-dimethylsphingosine.

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Information on patent family members

 International Application No.  
 .../EP 01/11250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 000207 A	06-01-2000	AU 4724599 A	17-01-2000
		BR 9912501 A	02-05-2001
		CN 1308538 T	15-08-2001
		EP 1091745 A1	18-04-2001
		WO 0000207 A1	06-01-2000
WO 9912533 A	18-03-1999	AU 8965898 A	29-03-1999
		WO 9912533 A1	18-03-1999
		EP 1011654 A1	28-06-2000
		JP 2001515857 T	25-09-2001
EP 0381514 A	08-08-1990	AT 122560 T	15-06-1995
		CA 2007507 A1	03-08-1990
		DE 69019388 D1	22-06-1995
		DE 69019388 T2	04-01-1996
		DK 381514 T3	04-09-1995
		EP 0381514 A2	08-08-1990
		JP 2976055 B2	10-11-1999
		JP 3157336 A	05-07-1991
		JP 2215711 A	28-08-1990
		US 5583160 A	10-12-1996
US 6098631 A	08-08-2000	AU 2327599 A	09-08-1999
		WO 9937298 A1	29-07-1999
WO 9961581 A	02-12-1999	AU 4097999 A	13-12-1999
		WO 9961581 A2	02-12-1999
WO 9108489 A	13-06-1991	EP 0502123 A1	09-09-1992
		WO 9108489 A1	13-06-1991
WO 0037613 A	29-06-2000	AU 1873200 A	12-07-2000
		EP 1141326 A2	10-10-2001
		WO 0037613 A2	29-06-2000

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/15	A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/50	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/53	S
	G 0 1 N 33/543	5 1 5 D
	G 0 1 N 33/543	5 1 5 J
	G 0 1 N 33/543	5 2 5 C

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

(72) 発明者 メレンデス, アリリオ  
シンガポール国、1 0 4 0 0 1 シンガポール、ギルマン・ハイツ・コンドミニウム、ブロック・  
1 イー・ナンバー 0 6 - 4 2

(72) 発明者 カサミジャナ, オリビエ  
フランス国、エフ - 7 5 0 1 8 パリ、リュ・ラ・ヴィエヴィル 7

(72) 発明者 モロー, フランソワ  
フランス国、エフ - 9 2 1 3 0 イシ - レ - ムリノー、リュ・レネ・ジャック 4

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CA18 CA20 CA24 CB01 DA20 DA60  
DA61 DA77 FB01 FB03 FB08 FB15 HA16  
4B063 QA01 QA18 QQ27 QR07 QR57 QR82 QR83 QS26 QS36 QX02  
4C084 AA02 AA03 AA06 AA17 BA44 CA62 NA14 ZA152 ZA362 ZA452  
ZA542 ZA592 ZA892 ZA962 ZB072 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZC192  
ZC202 ZC332 ZC352

专利名称(译)	用于筛选脂质激酶调节剂的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004509638A</a>	公开(公告)日	2004-04-02
申请号	JP2002530646	申请日	2001-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	华纳兰茂公司		
申请(专利权)人(译)	华纳 - 兰伯特公司, 有限公司, 责任, 公司		
[标]发明人	ノルマンエマニュエル メレンデスアリリオ カサミジャナオリビエ モローフランソワ		
发明人	ノルマン,エマニュエル メレンデス,アリリオ カサミジャナ,オリビエ モロー,フランソワ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/02 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C12Q1/48 G01N33 /15 G01N33/53 G01N33/542 G01N33/543 G01N33/573 G01N33/60 G01N33/92		
CPC分类号	A61P3/06 A61P3/10 A61P7/02 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C12Q1/48 G01N33/542 G01N33/573 G01N33/60 G01N33/92 G01N2333/9121		
FI分类号	C12Q1/48.Z A61K45/00 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/02 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P11 /06 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.111 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.S G01N33/543.515.D G01N33/543.515.J G01N33/543.525.C		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CA18 2G045/CA20 2G045/CA24 2G045 /CB01 2G045/DA20 2G045/DA60 2G045/DA61 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB15 2G045/HA16 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ27 4B063/QR07 4B063/QR57 4B063 /QR82 4B063/QR83 4B063/QS26 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/NA14 4C084/ZA152 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084 /ZA542 4C084/ZA592 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084 /ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C084/ZC332 4C084/ZC352		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2000402684 2000-09-29 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及筛选调节脂质激酶活性的化合物的方法。本发明更优选基于SPA技术筛选调节脂质激酶，特别是膜脂激酶，更具体地鞘氨醇激酶活性的化合物。本发明还包括用于实施上述方法的组合物，产品，试剂盒等，以及通过所述方法鉴定的化合物及其用途。

5 A ]

