

(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2007-529193

(P2007-529193A)

(43) 公表日 平成19年10月25日(2007.10.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	2 G O 5 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-522376 (P2006-522376)
 (86) (22) 出願日 平成16年8月4日 (2004.8.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年4月4日 (2006.4.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2004/002081
 (87) 国際公開番号 W02005/014638
 (87) 国際公開日 平成17年2月17日 (2005.2.17)
 (31) 優先権主張番号 0309697
 (32) 優先日 平成15年8月6日 (2003.8.6)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 500287019
 レ ラボラトワール セルヴィエ
 フランス国、エフ-92415 クールブ
 ボワ・セデックス、プラス・ドゥ・ラ・デ
 フォンス 12
 (71) 出願人 503047685
 イブリジェニック
 H Y B R I G E N I C S
 フランス国、エフ-75014 パリ、ア
 ンパス・レイユ 3/5
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100075225
 弁理士 篠田 文雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B c l - 2ファミリーの抗アポトーシスタンパク質と相互作用する新規ペプチド

(57) 【要約】

本発明は、B c l - 2、B c l - W及び/又はB c l - X Lの抗アポトーシスタンパク質と相互作用する新規ペプチドの同定、及び前記相互作用のモジュレーターを同定するためのスクリーニング方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 : Asp - Thr - Arg - Arg - Ser - Met - Val - Phe - Ala - Arg - Arg - His - Leu - Arg - Glu - Val - Gly - Asp - Glu - Phe - Arg - Ser - Arg の配列を特徴とする、Bcl - 2 ファミリーの抗アポトーシスタンパク質と相互作用するペプチド。

【請求項 2】

抗アポトーシスタンパク質 Bcl - 2、Bcl - XL 及び / 又は Bcl - W と相互作用する、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

配列番号 1 に記載のペプチドのフラグメント又は点突然変異体に対応することを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載のペプチド。

【請求項 4】

配列番号 2 :

【表 1】

5'-GATACCCGTCGCAGCATGGTGTTTGCCAGGCACCTGCGGGAGGTGGGAGA
CGAGTTCAGGAGCAGA -3'.

の配列を特徴とする、請求項 1 記載のペプチドをコードする核酸配列。

【請求項 5】

請求項 1 又は 2 記載のアミノ酸配列の遺伝暗号に従って推定される核酸配列。

【請求項 6】

請求項 3 記載のアミノ酸配列の遺伝暗号に従って推定される核酸配列。

【請求項 7】

請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項記載の核酸配列を含むことを特徴とする、組換えベクター。

【請求項 8】

ベクターが、宿主細胞でのペプチドの発現に必要な配列を含むプラスミドであることを特徴とする、請求項 7 記載の組換えベクター。

【請求項 9】

請求項 7 又は 8 のいずれかに記載の組換えベクターにより形質転換したことを特徴とする、宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1、2 又は 3 のいずれか 1 項記載のペプチドと、Bcl - 2 ファミリーの抗アポトーシスタンパク質との間の相互作用を改変することができる化合物の同定方法であって、以下の工程：

- a) 蛍光ラベルでラベルした請求項 1、2 又は 3 のいずれか 1 項記載のペプチドの調製；
 - b) 試験用化合物とのインキュベーション；
 - c) Bcl - 2 ファミリーの抗アポトーシスタンパク質を含む融合タンパク質の添加；
 - d) 蛍光偏光の測定
- を含むことを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 1、2 又は 3 のいずれか 1 項記載のペプチドと、Bcl - 2 ファミリーの抗アポトーシスタンパク質との間の相互作用を阻害することができる化合物の同定方法であって、以下の工程：

- a) 蛍光ラベルでラベルした請求項 1 又は 2 のいずれかに記載のペプチドの調製；
- b) 試験用化合物の有無でのインキュベーション；
- c) Bcl - 2 ファミリーの抗アポトーシスタンパク質を含む融合タンパク質の添加；
- d) 蛍光偏光の測定；

10

20

30

40

50

e) 試験用化合物を用いて観察した蛍光偏光の増大が、試験用化合物を用いずに観察したものよりも有意に低い化合物の選択を含むことを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1、2 又は 3 記載のいずれか 1 項記載のペプチドと、B c l - 2 ファミリーの抗アポトーシスタンパク質との間の相互作用を高めることができる化合物を同定する方法であって、以下の工程：

a) 蛍光ラベルでラベルした請求項 1 又は 2 のいずれかに記載のペプチドの調製；

b) 試験用化合物の有無でのインキュベーション；

c) B c l - 2 ファミリーの抗アポトーシスタンパク質を含む融合タンパク質の添加；

d) 蛍光偏光の測定；

e) 試験用化合物を用いて観察した蛍光偏光の増大が、試験用化合物を用いずに観察したものよりも有意に高い化合物の選択を含むことを特徴とする方法。

【請求項 13】

抗アポトーシスタンパク質が B c l - 2 である、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 14】

抗アポトーシスタンパク質が B c l - X L である、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】

抗アポトーシスタンパク質が B c l - W である、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 16】

用いるペプチドが配列番号 1 を特徴とする、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

用いる蛍光ラベルがフルオレッセインである、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 18】

請求項 10 ~ 17 のいずれか 1 項記載の方法に従った、アポトーシス改変化合物の同定における、請求項 1、2 又は 3 のいずれか 1 項記載のペプチドの使用。

【請求項 19】

請求項 10 ~ 17 のいずれか 1 項記載の方法に従った、アポトーシス調節解除に関する症状の処置に有用である化合物の同定における、請求項 1、2 又は 3 のいずれか 1 項記載のペプチドの使用。

【請求項 20】

請求項 10 ~ 17 のいずれか 1 項記載の方法に従った、自己免疫疾患、特定の神経疾患及びガンの処置に有用である化合物の同定における、請求項 1、2 又は 3 のいずれか 1 項記載のペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、B c l - X L 及び / 又は B c l - 2 及び / 又は B c l - W と相互作用する新規ペプチドに関し、そしてその相互作用を改変することができる化合物を同定するスクリーニング方法にも関する。

【0002】

最も生物学的な過程として、タンパク質 - タンパク質相互作用が挙げられる。プロテオミクスが設定するゴールの 1 つは、これらの相互作用のマップを作成することである。それらが多数のシグナル伝達メカニズムに関与することから、これらの相互作用は医薬開発

10

20

30

40

50

における選択のターゲットとされる。

【0003】

タンパク質の相互作用を同定することができる多数の方法論がある。最も一般的なものの1つは、Fieldsら (US5,283,173; US5,468,614; US5,667,973) により初めて開発され、記載されたツープリッドシステムである。

このシステムは、基本的に2つの組換えタンパク質間の *in vitro* 試験からなる。これらのうち1つめは「ベイト」タンパク質として既知であり、レポーター遺伝子の上流に結合することができるDNA結合ドメイン (BD) に融合したキメラタンパク質である。通常、用いる結合ドメインは、Gal4またはE. coli LexAのものである。

2つめのタンパク質もキメラタンパク質であり、通常「プレイ」タンパク質として既知であり、一般にGal4から生じる活性化ドメイン (AD) を含む。

しかし、これらの慣用の方法には限界がある。例えば、このようなスクリーニング方法は偽陽性及び/又は偽陰性という結果となり、そして得られた結果の生化学的確認が必要となること、周知である。

偽陽性又は陰性を最小とするためにより有効な技術が、特許出願WO9942612に記載されており、「ベイト」又は「プレイ」タンパク質を含む組換えハプロイド酵母を用いる。このシステムでは、当該技術分野で用いられる他の従来方法よりも、より正確で、より再現可能で、かつより感受性の高い様式で、1つの「ベイト」を用いて多数の「プレイ」の検出が可能となる。

【0004】

アポトーシスは、多細胞組織において重大な役割を担う細胞死過程である。実際、細胞死には2形態：ネクローシスとアポトーシスがある。ネクローシスは、組織破壊の場合に見い出され：細胞膨張、細胞内容物の放出、そして次に細胞溶解に到り、周辺組織の炎症を引き起こす。

アポトーシスは、他方で、プログラムされ、そして制御された生理的過程であり、我々の 10^9 個の細胞が毎日このメカニズムにより死ぬことから、その重要性は過小評価することができない。多数の症状が細胞の成長、生存及び死の間に存在する平衡状態の調節解除につながっている。

特に、自己免疫疾患、特定の神経疾患及びガンを挙げるができる。

生細胞の保持又はその死のプログラミングは、異なるタンパク質の少なくとも10種のファミリーを要求しており、そのうちBcl-2ファミリーは主要な役割を担う。このファミリーは、約20個のタンパク質を含み、Bcl-2、Bcl-XLおよびBcl-Wが挙げられるが、これらは細胞の生存に有利に働く抗アポトーシスタンパク質であり、アポトーシス促進性であるBax、Bak及びBidとは対照的である。アポトーシスの過程では、Bcl-2ファミリーのメンバーは、そのパートナーとの相互作用を改変して、細胞内に不可逆的な変化を引き起こし、細胞死に至らしめるようである。

【0005】

従って、アポトーシスの調節解除、特に自己免疫疾患、特定の神経変性疾患及びガンといった症状に効果的な本当の候補医薬を得るためには、これらの相互作用を改変することができる化合物を同定することが欠かせない。

【0006】

出願人は、今やBcl-2ファミリー、より特にはBcl-2、Bcl-XLおよびBcl-Wの抗アポトーシスタンパク質と相互作用する新規ペプチドを同定した。

【0007】

22個のアミノ酸のこのペプチドは、Bcl-2ファミリー、より特にはBcl-2及び/又はBcl-XL及び/又はBcl-Wの抗アポトーシスファミリーと正確に相互作用するドメインに対応し、そして「BH3」モチーフの典型的な構造的長、ホモ又はヘテロ二量体を形成することができる相互作用のドメインを有する。

【0008】

10

20

30

40

50

このペプチドはサイズが小さいので、これらのタンパク質間の相互作用を改変することができる化合物を非常に有効にスクリーニングすることができる試験を開発するための理想的な候補である。

【0009】

タンパク質 - タンパク質相互作用の改変遺伝子をスクリーニングするために、多数の試験が文献に記載されているが、それらは大抵その感受性及びその高処理量の実現可能性に関して制限がある。通例採用される方法は、複雑なツールの使用（融合タンパク質間、組換えタンパク質間などの相互作用）を必要とし、これは高処理量のスクリーニングにはあまり適しない。非常に頻繁に、高レベルのバックグラウンドのノイズを生じ、定量的観点からの信頼性は低く、すなわち読み取りウィンドウを縮小し、試験化合物の最適なスクリーニングをすることができない。

10

【0010】

しかし、出願人は蛍光偏光に基づいて、非常に有効なスクリーニング試験を開発した（Owicki J.C.ら、Journal of Biomolecular Screening、5、2000年、297～306）。この技術によれば、例えば蛍光ラベルしたリガンドと受容体との間の相互作用の測定が可能となる。原理は、その受容体へ結合した場合にリガンドにより放出される蛍光偏光における増大を、遊離リガンドにより放出されるものに比較して測定することからなる。遊離リガンドの蛍光偏光はその分子量に依存し、そして該リガンドの分子量が高いほど高い。従って、高い分子量のリガンドを用いて試験を実施する場合は、内因性の蛍光偏光のレベルが高く、遊離リガンドと結合リガンドとの間の蛍光偏光における差異を信頼して評価することは難しいであろう。他方、サイズを下げたリガンドを用いると、差異を強調することができ、そして結果的にアッセイの精度を高めることができる。従って、化合物の本当の活性をよりよく評価し、そして高処理量のスクリーニングを実施することができるであろう。

20

【0011】

より具体的には、本発明は、配列番号1に記載するアミノ酸配列を含むペプチド及びその機能的変異体に関する。

【0012】

「機能的変異体」とは、Bcl-2ファミリー、より特にはBcl-2及び/又はBcl-XL及び/又はBcl-Wの抗アポトーシスタンパク質と相互作用することができる、配列番号1に記載するペプチドのすべてのフラグメント又は点突然変異体であると解される。

30

【0013】

このペプチドを、「ベイト」タンパク質としてBcl-XL、Bcl-W及びBcl-2を用いたツーハイブリッド法により、特定した。ヒトcDNAの3つのバンク（胎盤、脳、細胞株CEMC7）をスクリーニングして、配列HC21ORF80の部分配列に対応する「プレイ」フラグメントの同定した（Accession番号NM_015227）。

次に、ツーハイブリッド技術により、その配列のフラグメントがBcl-XL及び/又はBcl-2及び/又はBcl-Wとの相互作用を得るのに必要かつ充分であり、そして配列番号1に記載する22個のアミノ酸のフラグメントに対応することを実験的に決定した。

40

【0014】

タンパク質Bcl-2、Bcl-W及びBcl-XLとの相互作用は、生化学技術（共免疫沈殿、GSTプルダウン）により確認し、そしてアポトーシスを引き起こすことを示した細胞へのトランスフェクション及び/又はマイクロインジェクションによりこのペプチドの生物活性を確認することができた。

【0015】

また本発明は、配列番号1に記載するアミノ酸配列の遺伝暗号に従って推定される核酸配列、及び本明細書中に前記した機能的変異体から推定されるものにも関する。

【0016】

より具体的には、本発明は、配列番号1に記載するペプチドをコードする配列番号2の

50

核酸配列に関する。

【0017】

「核酸配列」とは、その自然な状況から単離された核酸配列であり、そして特には遺伝子技術により修飾されてもよく、単離、増幅及び/又は精製された配列をいうと、解される。

【0018】

また本発明は、本発明に従う核酸配列を含む組換えベクターにも関する。

「ベクター」とは、宿主細胞へ核酸配列を導入し、ポリペプチドを発現させるすべてのタイプのベクターをいうと、解される。

本発明に従う組換えベクターは、本発明に従うペプチド、より特には配列番号1に記載するペプチドの発現に必要なDNA配列を含むことを特長とする。 10

特に、細菌性プラスミド、バクテリオファージ、酵母プラスミド及び染色体、ウイルスなどに由来するベクターを挙げることができる。

【0019】

また本発明は、組換えベクターにより形質転換した宿主細胞にも関する。これらの細胞は、好ましくは細菌又は真核生物の細胞である。例えば、Escherichia coli、酵母、昆虫細胞又は哺乳類細胞を挙げることができる。

【0020】

さらに本発明は、本発明に従うペプチド、より特には配列番号1に記載するペプチドと、Bcl-2ファミリーの抗アポトーシスタンパク質、より特にはBcl-2、Bcl-W及びBcl-XLとの間の相互作用を改変することができる試薬のスクリーニング方法に関する。これらの相互作用を改変する試薬は、有利には化学的に合成されるか、又は化合物バンクから得られる化合物であろう。 20

【0021】

本発明に従うスクリーニング方法は、以下の工程：

- a) 蛍光ラベルでラベルした本発明に従うペプチドの調製；
 - b) 試験用化合物とのインキュベーション；
 - c) 抗アポトーシスタンパク質を含む融合タンパク質の添加；
 - d) 蛍光偏光の測定
- を含む。 30

【0022】

本発明は、特にはペプチドと抗アポトーシスタンパク質との間の相互作用を阻害することができる化合物をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

- a) 蛍光ラベルでラベルした本発明に従うペプチドの調製；
 - b) 試験用化合物の有無でのインキュベーション；
 - c) 抗アポトーシスタンパク質を含む融合タンパク質の添加；
 - d) 試験用化合物の有無での蛍光偏光の測定；
 - e) 試験用化合物を用いて観察した蛍光偏光の増大が、試験用化合物を用いずに観察したものよりも有意に低い化合物の選択
- を含む方法に関する。 40

【0023】

本発明は、特にはペプチドと抗アポトーシスタンパク質との間の相互作用を高めることができる化合物をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

- a) 蛍光ラベルでラベルした本発明に従うペプチドの調製；
 - b) 試験用化合物の有無でのインキュベーション；
 - c) 抗アポトーシスタンパク質を含む融合タンパク質の添加；
 - d) 試験用化合物の有無での蛍光偏光の測定；
 - e) 試験用化合物を用いて観察した蛍光偏光の増大が、試験用化合物を用いずに観察したものよりも有意に高い化合物の選択
- を含む方法に関する。 50

【0024】

本明細書中に前記した方法の好ましい実施態様に従えば、蛍光ラベルは、例えばOregon Green、Bodipy及びフルオレッセイン、より特にはフルオレッセインであろう。

【0025】

スクリーニング方法で用いる本発明に従うペプチドは、好ましくは配列番号1に記載するペプチドであればよい。

【0026】

本発明に従う方法は、Bcl-2ファミリーの抗アポトーシスタンパク質、より特にはBcl-2、Bcl-W及びBcl-XLを用いて有利に実施できる。

【0027】

結果として、本発明はまた、本発明に従った、アポトーシスを改変することができる活性化合物のスクリーニングにおける本発明に従うペプチドの使用にも関する。

【0028】

より特には、本発明は、本発明に従った、アポトーシスの調節解除に関する症状の処置に有用である化合物のスクリーニングにおける本発明に従うペプチドの使用に関する。

【0029】

従って、本発明は、本発明の方法に従った、自己免疫疾患、特定の神経疾患及びガンの処置に有用な化合物のスクリーニングにおける本発明に従うペプチドの使用に関する。下記の実施例は、決して限定することなく本発明を説明する。

【0030】

実施例1：配列番号1に記載するペプチドの同定

ヒトcDNAの3つのバンク（胎盤、脳、細胞株CEMC7）を、コンジュゲーションプロトコルを用いる酵母でのツーハイブリッド技術（Fieldsら）によりスクリーニングした（Legrainら、Nature Genetics、1997年、16、277~282）。

【0031】

1) 「ベイト」及び「プレイ」の調製

a) 用いた「ベイト」は：

- ・ LexA DNA 結合ドメインに融合した Bcl-XL の C 末端切断 (1~209)
- ・ LexA DNA 結合ドメインに融合した Bcl-2 の C 末端切断 (1~211)

である。

それらを *Saccharomyces cerevisiae* (CG1945 又は L40 Gal4) で発現させ、そして 30°C で、トリプトファンを欠いた合成培地 (DO-Trp) 中で、 DO_{600nm} が包括的に 0.1~0.5 を得るまで、プレインキュベートする。その前培養の希釈液 50ml ($DO_{600nm} = 0.006$) を 30°C で一晩インキュベートする。

【0032】

b) cDNA バンクを発現するプラスミドを含み、Gal4 転写活性化ドメインに融合した酵母コレクションを、形質転換後、ロイシンを欠いた培地上で (DO-Leu) 選択して得る。

【0033】

2) コンジュゲーション

抱合は、2の「ベイト」/「プレイ」比率を用いて実施する。

50 units の DO_{600nm} に相当する工程 1) a) で得られた「酵母ベイト」細胞の量を、工程 1) b) で得られた「酵母プレイ」と混合する。遠心分離後、沈殿物を YPGlu 培地に再懸濁し、YPGlu 培養プレート上に広げ、そして 4 時間 30 分 30°C でインキュベートする。お互いに相互作用することができる「ベイト」及び「プレイ」を含むコンジュゲーション酵母の選択は、DO-Leu-Trp-His 培地、すなわちロイシン及びトリプトファンの欠損により、プラスミドの2つのタイプ（「ベイト」/「プレイ」）を含むこれらの酵母のみを発育させる選択圧を維持でき、培地からのヒスチジンの欠損により、お互いに相互作用できる「ベイト」プラスミド及び「プレイ」プラスミドを含むコンジュゲーション酵母を選択することができ、この相互作用はヒスチジンの生合

10

20

30

40

50

成に關与する酵素をコードするH I S 3 遺伝子を活性化することができる培地で、実施する。

【0034】

3) 陽性クローンの同定

2) に従って選択した酵母のコロニーの「プレイ」フラグメントを、「プレイ」ベクターの特異的プライマー:

A B S 1 5' - G C T T T G G A A T C A C T A C A G G - 3' (配列番号3)

A B S 2 5' - C A C G A T G C A C G T T G A A G T G - 3' (配列番号4)

を用いてそのコロニーの粗ライセートから、PCRにより増幅する。

次に、PCR産物を配列決定し、そして得られた配列をデータベースとの比較により同定する。 10

得られた陽性クローンのうち、配列H C 2 1 O R F 8 0 (Accession番号:NM_015227)の部分配列である約300個のアミノ酸のフラグメントを同定することができた。

【0035】

4) 配列番号1に記載するペプチドの同定

配列H C 2 1 O R F 8 0の小さい方のフラグメントについて前記した工程1)、2)及び3)に従って実施したツーハイブリッド実験により、B c l - X L及び/又はB c l - W及び/又はB c l - 2との相互作用を得るために必要かつ充分である22個のアミノ酸の短いペプチド: A s p - T h r - A r g - A r g - S e r - M e t - V a l - P h e - A l a - A r g - H i s - L e u - A r g - G l u - V a l - G l y - A s p - G l u - P h e - A r g - S e r - A r g (配列番号1)を同定することができた。 20

【0036】

実施例2: 実施例1に記載したペプチドとB c l - W及び/又はB c l - X L及び/又はB c l - 2との間の相互作用の確認

1) G S T「プルダウン」

実施例1で得られたペプチドとB c l - W及び/又はB c l - X L及び/又はB c l - 2との間の相互作用を、「B H 3」モチーフを有するB i dタンパク質と融合タンパク質G S T - B c l - X L、G S T - B c l - W又はG S T - B c l - 2との間の相互作用におけるシフトを測定することにより確認する。

a) 放射ラベルしたB i dの合成

ラベルしたタンパク質を、TNT Quick Masterキット(Promega)を用いて得る。40 µlのTNT混合物を90分間30 で、2 µl(20 µCiに等量)の³⁵S-メチオニン(Amersham)、B i dをコードする1 µgのプラスミドDNA及び容量が50 µlとなるのに充分量の水と共にインキュベートする。

産生した放射活性なタンパク質のfmoles/µl数を、タンパク質中のメチオニン数に基づいて計算する。

【0037】

b) G S T「プルダウン」

4 fmolesの放射活性なB i dタンパク質を、4 で3時間、3 µlの融合タンパク質グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-B c l - X L(G S T - B c l - X L)又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ-B c l - 2(G S T - B c l - 2)又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ-B c l - W(G S T - B c l - W)と共に、又はG S T単独で、300 µlの結合緩衝液(142 mMのK C l、5 mMのM g C l₂、10 mMのH e p e s緩衝液、0.5 mMのD T T、1 mMのE D T A、プロテアーゼ阻害剤、pH7.4)及び0.4%のTritonX100中でインキュベートする。「グルタチオンセファロース4 Fast Flow」(Amersham)のビーズを結合緩衝液中で3回洗浄し、そしてその緩衝液に、50%溶液を得るように再懸濁する。20 µlを各試料に加え、そして回転させながら4 で1時間インキュベートする。次に、ビーズを結合緩衝液中で3回洗浄し、そして次に25 µlの2 × S D S緩衝液、Laemml i (Sigma)を加える。次に試料を5分間95 で保持し、そして次に12% T r i s - グリシゲル(Invitrogen)にアプライする。電気泳動後、引 40 50

き続いてゲルを乾燥溶液 (Invitrogen) 中で 30 分間インキュベートし、そして次に 150 分間 70 で乾燥させる。放射活性なタンパク質を Kodak BioMax MS-1 フィルム (Sigma) に露出して明らかにする。試験するペプチドを用いた競合試験を実施するために、後者を 5 ~ 20 μM の濃度範囲で最初の溶液に加える。

【0038】

c) 結果

実施例 1 で得られたペプチドを最初の溶液に加えると、Bid のオートラジオグラフィのシグナルは消える。この結果は、実施例 1 で得られるペプチドが Bcl - W と Bid との間、Bcl - XL と Bid との間、そして Bcl - 2 と Bid との間の相互作用を阻害することを示す。

10

【0039】

実施例により、Bcl - XL と Bid との間で得られた結果を、図 1 に示す。

【0040】

2) 蛍光偏光：実施例 1 で得られたペプチドと抗アポトーシスタンパク質との間の相互作用の K_d の決定

実施例 1 で得られ、N 末端でフルオレッセインを用いてラベルしたペプチドの 15 nM 溶液を、 Na_2HPO_4 20 mM pH7.4、EDTA 1 mM、NaCl 50 mM、プルロニック酸 F-680 0.05% を含有する緩衝液中で 1 nM ~ 5 μM と濃度を変えた融合タンパク質 GST - Bcl - XL または GST - Bcl - W を含む溶液と、混合する。次に、蛍光偏光を、En Vision 装置 (Packard Perkin-Elmer) により測定する。

20

得られた結果を、図 2 及び 3 に示す。

【0041】

結果：実施例 1 で得られたペプチドを Bcl - XL 及び Bcl - W を含む融合タンパク質とインキュベートして観察して、蛍光偏光での有意な増大を観察し、これらのタンパク質へ結合したことを実証した。

【0042】

Bcl - XL で得た K_d は 2.15×10^{-7} M であり (図 2)、そして Bcl - W で得た K_d は 4.11×10^{-7} M である (図 3)。

【0043】

実施例 3：Bcl - W 及び / 又は Bcl - XL 及び / 又は Bcl - 2 と、実施例 1 で得られたペプチドとの間の相互作用を阻害することができる化合物のスクリーニング試験

30

試験用化合物を、384 ウェルのプレート (Corning Flat Bottom) へ、最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で分注する。1 つのウェルを、試験用化合物を用いずに等量の緩衝液 / 溶媒で充填し、コントロールにする。実施例 1 で得られ、フルオレッセインでラベルしたペプチドを、最終濃度 15 nM となるように各ウェルに加える。融合タンパク質 GST - Bcl - XL、GST - Bcl - W、GST - Bcl - 2 を次に、 Na_2HPO_4 20 mM pH7.4、EDTA 1 mM、NaCl 50 mM 及びプルロニック酸 F-680 0.05% を含有する緩衝液中で最終濃度 500 nM (Bcl - XL、Bcl - 2) 及び 1 μM (Bcl - W) となるように加える。次に、蛍光偏光を En Vision 装置 (Packard Perkin-Elmer) により測定する。試験化合物を用いずに得た蛍光偏光 (コントロールのウェル) に比較して、試験化合物を用いて実施した試験で記録した蛍光偏光における有意な減少により、化合物が阻害活性を有することを結論付けることができる。反対に、コントロールに比較して、試験化合物を用いた試験における蛍光偏光の有意な増大により、化合物が活性化活性を有することを結論付けることができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図 1】図 1 は、配列番号 1 に記載するペプチドと競合した、「GST プルダウン」GST - Bcl - XL + TBid を示す。

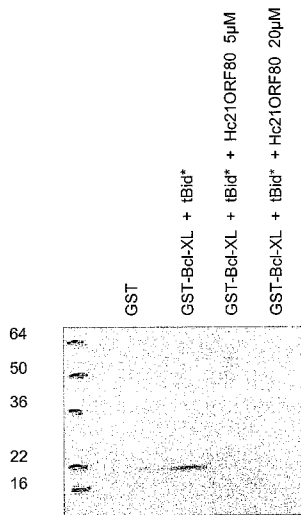
【図 2】図 2 は、Bcl - XL について、配列番号 1 に記載するペプチドの K_d の決定である。

50

【図3】 図3は、Bcl-Wについて、配列番号1に記載するペプチドの K_d の決定である。

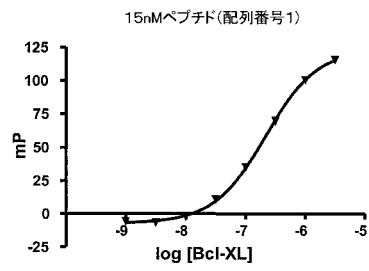
【図1】

配列番号1に記載するペプチドと競合した、「GSTプルダウン」GST-Bcl-XL+TBid



【図2】

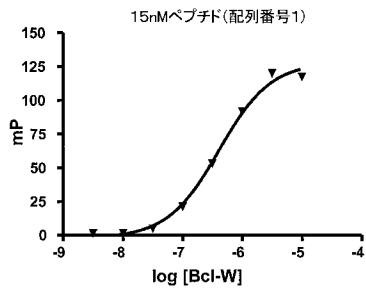
Bcl-XLについて、配列番号1に記載するペプチドの K_d の決定



$K_d = 2.15 \times 10^{-7} M$

【 図 3 】

Bcl-WIについて、配列番号1に記載するペプチドのK_dの決定



$$K_d = 4.11 \times 10^{-7} \text{M}$$

【 配列表 】

[2007529193000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
/FR2004/002081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 G01N33/50		
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 C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENESEQ 'Online! 6 March 2003 (2003-03-06), "Human Bcl-XL-binding polypeptide" XP002268229 Database accession no. ABJ18850 the whole document	1-20
X	-& WO 02/072761 A (PHYLOS INC) 19 September 2002 (2002-09-19) SEQ ID No 29figure 3B3	1-20
A	KELEKAR AMEETA ET AL: "Bcl-2-family proteins: The role of the BH3 domain in apoptosis" TRENDS IN CELL BIOLOGY, vol. 8, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 324-330, XP002268228 ISSN: 0962-8924 the whole document	1-20
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 January 2005		Date of mailing of the international search report 25/01/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Weikl, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
 T/FR2004/002081

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 283 173 A (SONG OK-KYU ET AL) 1 February 1994 (1994-02-01) cited in the application the whole document	1-20
A	DEGTEREV A ET AL: "IDENTIFICATION OF SMALL-MOLECULE INHIBITORS OF INTERACTION BETWEEN THE BH3 DOMAIN AND BCL-XL" NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN PUBLISHERS, GB, vol. 3, February 2001 (2001-02), pages 173-182, XP008000872 ISSN: 1465-7392 the whole document	10-20
A	OWICKI J C: "FLUORESCENCE POLARIZATION AND ANISOTROPY IN HIGH THROUGHPUT SCREENING: PERSPECTIVES AND PRIMER" JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, LARCHMONT, NY, US, vol. 5, no. 5, October 2000 (2000-10), pages 297-306, XP009007612 ISSN: 1087-0571 cited in the application the whole document	10-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR2004/002081

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02072761	A	19-09-2002	WO 02072761 A2	19-09-2002
			US 2003032157 A1	13-02-2003
US 5283173	A	01-02-1994	US 5468614 A	21-11-1995
			US 5667973 A	16-09-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR2004/002081

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07K14/47 G01N33/50		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE GENESEQ 'Online! 6 mars 2003 (2003-03-06), "Human Bcl-XL-binding polypeptide" XP002268229 Database accession no. ABJ18850 le document en entier	1-20
X	-& WO 02/072761 A (PHYLOS INC) 19 septembre 2002 (2002-09-19) SEQ ID No 29figure 3B3	1-20
A	KELEKAR AMEETA ET AL: "Bcl-2-family proteins: The role of the BH3 domain in apoptosis" TRENDS IN CELL BIOLOGY, vol. 8, no. 8, août 1998 (1998-08), pages 324-330, XP002268228 ISSN: 0962-8924 le document en entier	1-20
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
<p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>		<p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p>
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
14 janvier 2005		25/01/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Weikl, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
/FR2004/002081

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 283 173 A (SONG OK-KYU ET AL) 1 février 1994 (1994-02-01) cité dans la demande le document en entier -----	1-20
A	DEGREEV A ET AL: "IDENTIFICATION OF SMALL-MOLECULE INHIBITORS OF INTERACTION BETWEEN THE BH3 DOMAIN AND BCL-XL" NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN PUBLISHERS, GB, vol. 3, février 2001 (2001-02), pages 173-182, XP008000872 ISSN: 1465-7392 le document en entier -----	10-20
A	OWICKI J C: "FLUORESCENCE POLARIZATION AND ANISOTROPY IN HIGH THROUGHPUT SCREENING: PERSPECTIVES AND PRIMER" JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, LARCHMONT, NY, US, vol. 5, no. 5, octobre 2000 (2000-10), pages 297-306, XP009007612 ISSN: 1087-0571 cité dans la demande le document en entier -----	10-20

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

/FR2004/002081

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02072761	A	19-09-2002	WO 02072761 A2	19-09-2002
			US 2003032157 A1	13-02-2003
US 5283173	A	01-02-1994	US 5468614 A	21-11-1995
			US 5667973 A	16-09-1997

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A 4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 21/78	C

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ジェネステ, オリヴィエ
フランス国、エフ - 9 2 5 0 0 リュエル - マルメゾン、リュ・クルヴェル・デュヴァル、パーティマン・ア - 1 7

(72) 発明者 ヒックマン, ジョン
フランス国、エフ - 7 5 0 1 7 パリ、ブールヴァール・ペレール 1 2 6

(72) 発明者 ベネット, リチャード
フランス国、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ・サン - クリストフ 3

(72) 発明者 レーン, ジャン - クリストフ
フランス国、エフ - 9 5 1 2 0 エルモン、リュ・ダキロン 1 3

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FB12 GC15
2G054 AB04 CE02 EA03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 EA04 GA11 HA03
4B065 AA01X AA57X AA87X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA18 BA23 CA18 NA14 ZA012
ZB082 ZB212 ZB262
4H045 AA10 AA20 AA30 BA17 CA40 EA21 EA22 EA28 FA74

专利名称(译)	与Bcl-2家族的抗凋亡蛋白质相互作用的新型肽		
公开(公告)号	JP2007529193A	公开(公告)日	2007-10-25
申请号	JP2006522376	申请日	2004-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	施维雅药厂 混合基因股份公司		
申请(专利权)人(译)	莱斯LABORATOIRES漩渦施维雅 伊夫里转基因		
[标]发明人	ジェネステオリヴィエ ヒックマンジョン ベネットリチャード レーンジャンクリストフ		
发明人	ジェネステ,オリヴィエ ヒックマン,ジョン ベネット,リチャード レーン,ジャン-クリストフ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K38/00 A61P37/06 A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N21/78 C12N15/12		
CPC分类号	A61P25/00 C07K14/4702 C07K14/4747		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K37/02 A61P37/06 A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00.105 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AB04 2G054 /CE02 2G054/EA03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084 /BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZB082 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045 /EA21 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2003009697 2003-08-06 FR		
其他公开文献	JP4395514B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与抗凋亡蛋白Bcl-2, Bcl-W和/或Bcl-XL相互作用的新肽的鉴定, 并且涉及允许鉴定那些相互作用的修饰物的筛选方法。

配列番号1に記載するペプチドと競合した、「GSTプルダウン」GST-Bcl-XL+TBid

