

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 504014

(P2003 - 504014A)

(43)公表日 平成15年2月4日(2003.2.4)

| (51) Int. Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-コード (参考) |
|---------------------------|------|---------------|--------------|
| C 1 2 N 15/09 | ZNA | A 6 1 K 45/00 | 2 G 0 4 5 |
| A 6 1 K 45/00 | | 47/42 | 4 B 0 2 4 |
| 47/42 | | A 6 1 P 31/00 | 4 B 0 6 3 |
| A 6 1 P 31/00 | | 35/00 | 4 B 0 6 5 |
| 35/00 | | 37/00 | 4 C 0 7 6 |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全131数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 508324(P2001 - 508324)

(86) (22)出願日 平成12年6月30日(2000.6.30)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月27日(2001.12.27)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/06144

(87)国際公開番号 W001/002551

(87)国際公開日 平成13年1月11日(2001.1.11)

(31)優先権主張番号 99112451.2

(32)優先日 平成11年6月30日(1999.6.30)

(33)優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(31)優先権主張番号 60/141,268

(32)優先日 平成11年6月30日(1999.6.30)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 エボテック オーアーイー アクチェンゲ
ゼルシャフト

ドイツ連邦国、ハンブルグ D - 22525、シ
ユナッケンブルガリー 114

(72)発明者 フント ニコラス

ドイツ連邦共和国、デー-21629 ノイ ヴル
ムシュトルフ、ブレーデンハイデルヴェー
ク 47

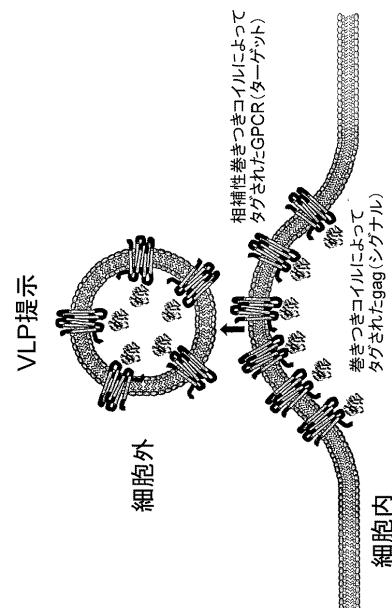
(74)代理人 弁理士 塩澤 寿夫 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウイルス状粒子、それらの調製及び好ましくは薬学的スクリーニング及び機能的ゲノムにおける
それらの使用

(57)【要約】

本発明は、ウイルス状粒子、それらの調製、及び薬学的
スクリーニング及び機能的ゲノムにおけるそれらの使用
に関する。細胞におけるターゲット分子とシグナル分子
との共発現によって粒子が生成される。但し、前記ター
ゲット分子が前記ウイルス状粒子に取り込まれるか、又
は被包されるように、シグナル及びターゲット分子は、
共有結合せずに機能的に働く。



【特許請求の範囲】

【請求項1】細胞内での共発現によってウイルス状粒子(VLPs)へ蛋白質ターゲット分子を選択的に取り込むか、又は被包させるための方法であって：

(i) 前記ターゲット分子は第一アミノ酸配列及び第二アミノ酸配列を含み、かつ

(ii) シグナル分子は第一アミノ酸配列及び第二アミノ酸配列を含み、後者は、ウイルス状粒子を構築し、かつ好ましくは細胞外環境へ放出される能力をシグナル配列に与え、

前記ターゲット分子が、前記ウイルス状粒子に取り込まれるか、又は被包されるように、前記シグナル分子の前記第一アミノ酸配列は、前記ターゲット分子の前記第一アミノ酸配列と共に、共有結合せずに機能的に働く方法。

【請求項2】前記シグナル分子の前記第一アミノ酸配列は、ファンデルワールス力、静電力、積み重ね相互作用、水素結合、及び立体適合からなる群から選ばれる共有結合ではない物理的な力によって、前記ターゲット分子の前記第一アミノ酸配列と共に機能的に働く請求項1に記載の方法。

【請求項3】前記シグナル分子は、 $K_{ass} = 10^{-6} M$ の結合定数を有する共有結合ではない物理的な力によって、前記ターゲット分子と相互作用する請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】前記ウイルス状粒子は、適当な細胞膜を通るエキソサイトーシス、溶解又は出芽によって前記細胞から放出される請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】血漿膜、小胞体、ゴルジ又は核膜を通して出芽が起こる請求項4に記載の方法。

【請求項6】前記ターゲット分子の前記第二アミノ酸配列は、ウイルス状粒子と非相同性である請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】前記ターゲット分子の前記第二アミノ酸配列は、レセプター、イオンチャンネル、酵素、粘着性分子、膜孔の成分、及びフラグメント、又はそれらの誘導体からなる群から選ばれる請求項6に記載の方法。

【請求項8】前記レセプターは、トランスメンブランレセプター、特に、出芽プ

ロセスによってウイルス状粒子のエンベローブに取り込まれる G - 蛋白質結合レセプターである請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】前記レセプターは、剥き出しの、又は包まれたウイルス状粒子の蛋白質キャプシドによって取り込まれるか、又は被包されるサイトソル又は核レセプターである請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】前記ターゲット分子の前記第二アミノ酸配列は、ルミネッセンスペプチド又は蛋白質である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】前記シグナル分子の前記第二アミノ酸配列は、ウイルスキャプシド蛋白質のフラグメント、又はウイルスキャプシド蛋白質の前駆体、又はウイルスエンベローブ蛋白質のフラグメント、又はウイルスエンベローブ蛋白質の前駆体を少なくとも含む請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】前記シグナル分子の前記第二アミノ酸は、ウイルス状粒子のキャプシド蛋白質のフラグメント、又は前記キャプシド蛋白質の前駆体、又はウイルス状粒子のエンベローブ蛋白質のフラグメント、又は前記エンベローブ蛋白質の前駆体を少なくとも含む請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】前記キャプシド又はエンベローブ蛋白質は、レトロウイルス、ピコルナウイルス、レオウイルス、ポリオマウイルス、パピロマウイルス、パルボウイルス、ノダウイルス、コロナウイルス、ヘルペスウイルス、ヘパドナウイルス、バキュロウイルス、及びバクテリオファージからなる群から選ばれるウイルス群のキャプシド又はエンベローブから得られる請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】前記シグナル分子の前記第二アミノ酸配列は、レトロウイルスの gag - 遺伝子によってコードされた構造蛋白質である請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】前記シグナル分子の前記第二アミノ酸配列は、少なくとも、レトロトランスポゾン、特に、酵母中の Ty 成分、昆虫中のコピア成分、昆虫中のコピア様成分、マウス中の VL30、又はマウス中の IAP 遺伝子のフラグメントによってコードされる請求項 6 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法によって得られ得るウイ

ルス状粒子。

【請求項17】請求項1～15のいずれかに記載の、取り込まれたか、又は被包されたターゲット分子と共に、ウイルス状粒子を含む試薬キット。

【請求項18】請求項1～15のいずれかに記載の、取り込まれた、又は被包されたターゲット分子と共に、ウイルス状粒子を含む薬剤又はその前駆体。

【請求項19】剥き出しのウイルス状粒子のキャプシド、又は包まれたウイルス状粒子の膜に、取り込まれ、又は結合した分子を更に含み、前記分子は前記薬剤又はその前記前駆体を、その影響領域へ導く機能を有する請求項18に記載の薬剤又はその前駆体。

【請求項20】遺伝的疾患、腫瘍疾患、自己免疫又は伝染性疾患を、治療又は予防するための薬剤又はその前駆体の調製のための、請求項1～15のいずれかに記載の方法によって得られ得るウイルス状粒子の使用。

【請求項21】ウイルス状粒子の異なる集団に取り込まれるターゲット分子間の相互作用の同定及び特徴付けにおける、請求項1～15のいずれかに記載の方法によって得られ得るウイルス状粒子の使用。

【請求項22】ターゲット分子、及び更に対象となる分子、特に細胞若しくはビーズに結合した分子、又は水性培地に可溶性の分子、特に細胞内機能部位の分子間の相互作用の同定及び特徴付けにおける、請求項1～15のいずれかに記載の方法によって得られ得るウイルス状粒子の使用。

【請求項23】潜在的な薬学的活性物質の同定における、請求項1～15のいずれかに記載の方法によって得られ得るウイルス状粒子の使用。

【請求項24】診断用途における、分析物の同定における請求項1～15のいずれかに記載の方法によって得られ得るウイルス状粒子の使用。

【請求項25】細胞表面蛋白質媒介活性を調節する化合物の同定法であって、化合物と細胞表面蛋白質との相互作用によって生成されたシグナルの細胞内トランスダクションを検出することにより行われ、以下を含む同定法：

- 前記化合物の存在下で、第一組換え型細胞において発現されたレポーター遺伝子生成物の量を、前記化合物の不存在下での生成物の量、又は第二組換え型細胞における生成物の量と比較すること；但し

- 第一組換え型細胞は、レポーター遺伝子構造を含み、かつ細胞表面蛋白質を発現し；

- 第二組換え型細胞は、細胞表面蛋白質を発現しないか、又は細胞表面蛋白質を所定のレベルで発現することを除き、第一組換え型遺伝子と同一であり；かつ

- レポーター遺伝子構造は：

(a) アゴニストと細胞表面蛋白質との相互作用によって生成される細胞内シグナルに応答する転写調節成分；

(b) 翻訳シグナル分子をコードし、かつ転写調節成分と効果的に結合しているレポーター遺伝子

を含む；但し

- 翻訳シグナル分子は、好ましくは細胞外環境へ放出されるウイルス状粒子を構築することができる。

【請求項26】前記化合物の不存在下での生成物の量と比べて、又は第二組換え型細胞における生成物の量と比べて、前記化合物の存在下で第一組換え型細胞において発現されたレポーター遺伝子生成物の量を変化させる化合物を選択することを更に含む請求項25に記載の方法。

【請求項27】細胞表面蛋白質は、細胞表面レセプター、粘着性分子、膜孔、又はイオンチャンネルである請求項25又は26に記載の方法。

【請求項28】前記検出し得る翻訳シグナル分子は、ルミネッセンスポリペプチド、特に緑色蛍光蛋白質若しくはその突然変異体を更に含み、又は検出し得る試薬を用いる次のラベル化のためのタグとして働く物を更に含み、又は酵素を更に含む請求項25～27のいずれかに記載の方法。

【請求項29】前記化合物は、前記細胞表面蛋白質のアゴニストである請求項25～28のいずれかに記載の方法。

【請求項30】前記化合物は、前記細胞表面蛋白質のアンタゴニストである請求項25～28のいずれかに記載の方法。

【請求項31】レポーター遺伝子生成物の量の違いを比較する前、又はそれと同時に、組換え型細胞を、前記細胞表面蛋白質を活性化させるアゴニストと接触させ、それにより前記翻訳シグナル分子が発現されることを更に含む請求項30に

記載の方法。

【請求項32】転写調節領域は、血清応答成分、環状アデノシンモノホスフェート応答成分、及び細胞内カルシウムイオンレベルに応答する成分からなる群から選ばれる調節成分を少なくとも含む請求項25～31のいずれかに記載の方法。

【請求項33】前記方法は、均質分析、特に、多数の化合物のスクリーニングのための均質ハイスループット分析である請求項25～32のいずれかに記載の方法。

【請求項34】前記ウイルス状粒子は、顕微鏡法、分光法、特に共焦点顕微鏡法又は分光法の使用によって検出される請求項25～33のいずれかに記載の方法。

【請求項35】適当な細胞膜を通るエキソサイトーシス、溶解又は出芽によって、前記ウイルス状粒子が前記細胞から放出される請求項25～34のいずれかに記載の方法。

【請求項36】前記翻訳シグナル分子は、ウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質のフラグメント、又はウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体を少なくとも含む請求項25～35のいずれかに記載の方法。

【請求項37】前記翻訳シグナル分子は、ウイルス状粒子のキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質のフラグメント、又は前記キャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体を少なくとも含む請求項25～35のいずれかに記載の方法。

【請求項38】前記キャプシド又はエンベロープ蛋白質は、レトロウイルス、ピコルナウイルス、レオウイルス、ポリオマウイルス、パピロマウイルス、パルボウイルス、ノダウイルス、コロナウイルス、ヘルペスウイルス、ヘパドナウイルス、バキュロウイルス、及びバクテリオファージからなる群から選ばれるウイルス群のキャプシド又はエンベロープから得られる請求項36又は37に記載の方法。

【請求項39】前記翻訳シグナル分子は、少なくとも、レトロトランスポゾン、特に、酵母中のTy成分、昆虫中のコピア、昆虫中のコピア様成分、マウス中のVL30、又はマウス中のIAP遺伝子のフラグメントによってコードされる請求項25～35のいずれかに記載の方法。

【請求項40】 - 細胞外シグナルによって調節され得る活性を有する細胞表面蛋白質をコードするDNA；及び

- 前記細胞表面蛋白質によって調節される、1つ以上の転写調節成分と効果的に結合したレポーター遺伝子を含むレポーター遺伝子構造

を含む組換え型細胞；但し、

- 前記レポーター遺伝子は、翻訳シグナル分子をコードし、かつ、

- 前記翻訳シグナル分子は、好ましくは細胞外環境に放出されるウイルス状粒子を構成し得る。

【請求項41】 転写調節成分は、血清応答成分、環状アデノシンモノホスフェート応答成分、及び細胞内カルシウムイオンレベルに応答する成分からなる群から選ばれる調節成分を少なくとも含む請求項40に記載の細胞。

【請求項42】 前記翻訳シグナル分子は、ルミネッセンスポリペプチド、特に、緑色蛍光蛋白質若しくはその突然変異体を更に含み、又は検出し得る試薬を用いる次のラベル化のためのタグとして働く物を更に含み、又は酵素を更に含む請求項40又は41に記載の細胞。

【請求項43】 前記細胞表面蛋白質は、細胞表面レセプター、粘着性分子、膜孔、又はイオンチャンネルである請求項40～42のいずれかに記載の細胞。

【請求項44】 多数の化合物のスクリーニングのための分析であって、リガンド/結合ドメイン相互作用、若しくは前記化合物による酵素触媒反応の阻害若しくは刺激の程度を決定するために、又は、前記化合物のターゲット分子への結合の程度の決定するために、又は、前記化合物がウイルス状粒子内に入る能力を決定するために行われ、かつ以下を含む分析；

(a)(1) 試験されるべき前記化合物を、前記リガンド及び前記結合ドメインへ接触させること；

(2) 試験されるべき前記化合物を、前記酵素及び前記酵素のための基質へ接触させること；

(3) 試験されるべき前記化合物を、前記ターゲット分子へ接触させること；並びに

(4) 前記化合物をウイルス状粒子へ接触させること

からなる群から選択される段階；但し、前記結合ドメイン、又は酵素、又はターゲット分子は、ウイルス状粒子に取り込まれるか、又は被包され、かつ

1つ以上の前記化合物の導入による阻害、刺激、又は結合は、前記分析中に存在する前記ウイルス状粒子に結合し、若しくは被包された光学的に検出され得るラベルの量の変化を引き起こし、及び/又は、前記ウイルス状粒子の更なる性質の変化を引き起こす；

(a) 光学的方法の使用により、個々のウイルス状粒子に結合し、若しくは被包された、前記光学的に検出され得るラベルの量を決定し、及び/又は、前記ウイルス状粒子の更なる性質を測定すること；

個々のウイルス状粒子に結合し、若しくは被包された、前記光学的に検出され得るラベルの量を、前記ウイルス状粒子と結合せず、若しくは被包されていないラベルによって引き起こされる前記分析におけるバックグラウンドシグナルの量と比較すること、及び/又は、研究対象の前記ウイルス状粒子の前記性質を、対照ウイルス状粒子の性質と比較すること；

により、前記阻害、刺激、結合又は導入の程度を決定すること；並びに

前記結合/被包及びバックグラウンドシグナル間の違いから、及び/又は、研究対象のウイルス状粒子の前記性質と、対照ウイルス状粒子の性質との違いから、前記阻害、刺激、結合又は導入の程度を決定すること。

【請求項45】前記光学的方法は、共焦点顕微鏡法又は分光法を含む請求項44に記載の方法。

【請求項46】前記光学的に検出され得るラベルは、蛍光リガンド、又は蛍光基質、又は酵素反応の蛍光生成物であり、かつ前記光学的方法は、蛍光技術、特に、蛍光相関分光法、蛍光相互相関分光法、蛍光強度分布分析、蛍光寿命測定、蛍光異方性測定、蛍光応答エネルギー遷移、又はそれらの組み合わせを含む請求項44又は45に記載の分析。

【請求項47】前記ウイルス状粒子の更なる性質は、電気的方法によって決定される請求項44～46のいずれかに記載の分析。

【請求項48】前記電気的方法は、インピーダンス又は二重電気泳動測定を含む請求項47に記載の分析。

【請求項49】前記結合ドメイン、又は酵素、又はターゲット分子は、前記ウイルス状粒子の成分への融合により、特に、キャプシド又はエンベロープ成分への融合によって、前記ウイルス状粒子に取り込まれ、又は被包される請求項44～48のいずれかに記載の分析。

【請求項50】前記結合ドメイン、又は酵素、又はターゲット分子は、前記ウイルス状粒子の成分と、前記結合ドメイン、酵素又はターゲット分子との共有結合ではない物理的な力によって、前記ウイルス状粒子に取り込まれるか、又は被包される請求項44～48のいずれかに記載の分析。

【請求項51】前記分析は、均質ハイスループット分析である請求項44～50のいずれかに記載の分析。

【請求項52】少なくとも2つのターゲット分子間の相互作用の阻害又は刺激の程度を決定するための、多数の化合物をスクリーニングするための分析であって

、

(a) 第一ウイルス状粒子に取り込まれた第一ターゲット分子の液体懸濁物、及び第二ウイルス状粒子に取り込まれた第二ターゲット分子の液体懸濁物を、多数の容器へ添加すること；

(b) 前記阻害又は刺激をスクリーニングされるべき多数の化合物を、個々に、又は組み合わせて、前記多数の容器へ添加すること；

(c) 前記ウイルス状粒子及び前記化合物に取り込まれた前記ターゲット分子をインキュベートすること；

(d) 前記ウイルス状粒子の少なくとも1つの性質を測定すること；及び

(e) 少なくとも1つの前記化合物により、前記ターゲット分子間の前記相互作用の阻害又は刺激の程度を決定すること

を含む分析。

【請求項53】前記ウイルス状粒子のキャプシド若しくはエンベロープ成分への融合によって、又は前記成分と前記ターゲット分子との間の共有結合ではない物理的な力によって、前記ターゲット分子が前記ウイルス状粒子に取り込まれる請求項52に記載の分析。

【請求項54】前記ウイルス状粒子の光学的に検出され得る性質が、好ましくは

共焦点顕微鏡法又は分光法によって測定される請求項52又は53に記載の分析。

【請求項55】蛍光技術、特に、蛍光相関分光法、蛍光相互相関顕微鏡分光法、蛍光強度分布分析、蛍光寿命測定、蛍光異方性測定、蛍光応答エネルギー遷移、又はそれらの組み合わせの使用によって、前記光学的に検出され得る性質が測定される請求項54に記載の分析。

【請求項56】前記光学的に検出され得る性質は、光散乱技術によって測定される請求項52～55のいずれかに記載の分析。

【請求項57】前記ウイルス状粒子の少なくとも1つの異なる性質は、好ましくはインピーダンス又は二重電気泳動測定によって決定される請求項52～56のいずれかに記載の分析。

【請求項58】前記分析は、均質ハイスループット分析である請求項52～57のいずれかに記載の分析。

【請求項59】細胞内蛋白質 - 蛋白質相互作用を決定するための分析であって、
(a) 組換え型細胞における共発現
(i) ターゲット分子は、第一アミノ酸配列及び第二アミノ酸配列を含み、後者は好ましくはルミネッセンスレポーターであり、かつ
(ii) シグナル分子は、第一アミノ酸配列及び第二アミノ酸配列を含み、後者は、ウイルス分子を構築し、好ましくは細胞外環境へ放出される能力をシグナル分子に与える、
(a) 前記ウイルス状粒子内での、前記好ましくはルミネッセンスレポーターの存在又は不存在を測定すること；及び、それにより
(b) ターゲット分子の第一アミノ酸配列と、シグナル分子の第一アミノ酸配列との間の蛋白質 - 蛋白質相互作用の程度を決定すること
を含む分析。

【請求項60】前記組換え型細胞を、前記蛋白質 - 蛋白質相互作用を妨げる能力をスクリーニングされるべき化合物に接触させることを更に含む請求項59に記載の分析。

【請求項61】スクリーニングされるべき化合物は、cDNA発現ライブラリー

類、ゲノムDNAフラグメント類、mRNA類、ペプチド類、蛋白質類、及び低分子量物質類からなる群から選択される請求項60に記載の分析。

【請求項62】前記分析は、均質であり、好ましくは均質ハイスループット分析である請求項59又は61のいずれかに記載の方法。

【請求項63】前記ウイルス状粒子内での前記好ましくはルミネッセンスレポーターの存在又は不存在は、顕微鏡法又は分光法、特に共焦点顕微鏡法又は分光法によって測定される請求項59～62のいずれかに記載の分析。

【請求項64】蛍光技術、特に、蛍光相関分光法、蛍光相互相関分光法、蛍光強度分布分析、蛍光寿命測定、蛍光異方性測定、蛍光応答エネルギー遷移、又はそれらの組み合わせの使用によって、前記ウイルス状粒子内での前記ルミネッセンスレポーターの存在又は不存在が測定される請求項59～63のいずれかに記載の分析。

【請求項65】細胞内輸送ポリペプチド又は膜結合トランスロケーションポリペプチドをコードする核酸配列の同定のための分析であって、

(a) 第一アミノ酸配列及び第二アミノ酸配列を含む融合蛋白質をコードする核酸を含む組換え型細胞の供給、但し、前記第一アミノ酸配列は、ウイルス状粒子を構築する能力を融合蛋白質に与え、かつ、前記第一アミノ酸配列は、細胞膜へ輸送されるべき融合蛋白質へは与えず、及び/又は、前記第一アミノ酸配列は、前記細胞膜を通る出芽プロセスによって、細胞外環境へ放出される能力を、前記ウイルス状粒子に与えず、かつ前記第二アミノ酸配列は、研究対象のポリペプチドである；

(b) 前記融合蛋白質の発現；

(c) 前記細胞外環境におけるウイルス状粒子の存在又は不存在の測定；並びにそれによる

(d) 細胞内輸送ポリペプチド又は膜結合トランスロケーションポリペプチドをコードする核酸配列の同定を含む分析。

【請求項66】DNA分子のライブラリーは、多数の組換え型細胞においてスクリーニングされる請求項65に記載の分析。

【請求項67】前記第一アミノ酸配列は、前記第二アミノ酸配列のC末端と共有結合する請求項65又は66に記載の分析。

【請求項68】前記融合蛋白質は、好ましくは前記第一アミノ酸配列のC末端と共有結合したルミネッセンスレポーター分子、特に、緑色蛍光蛋白質又はその突然変異体を含む請求項65～67のいずれかに記載の分析。

【請求項69】ウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質をコードする突然変異体遺伝子によって、又はウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体をコードする突然変異体遺伝子によって、前記第一アミノ酸配列がコードされる請求項65～68のいずれかに記載の分析。

【請求項70】ウイルス状粒子のキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質をコードする突然変異体遺伝子によって、又は前記キャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体をコードする突然変異体遺伝子によって、前記第一アミノ酸配列がコードされる請求項65～68のいずれかに記載の分析。

【請求項71】前記アミノ酸配列は、レトロウイルスのgag-遺伝子の突然変異体によってコードされた構造蛋白質である請求項65～70のいずれかに記載の分析。

【請求項72】開始コドンメチオニンの2つ後の位置が、ミリスチン化によって修飾され得ないアミノ酸をコードするいずれかの残基に変えられる請求項71に記載の分析。

【請求項73】前記分析は、均質分析、好ましくは均質ハイスループット分析である請求項65～72のいずれかに記載の分析。

【請求項74】前記細胞外環境におけるウイルス状粒子の存在又は不存在は、光学的方法、好ましくは共焦点顕微鏡法又は分光法によって測定される請求項65～73のいずれかに記載の分析。

【請求項75】前記細胞外環境におけるウイルス状粒子の存在又は不存在は、蛍光技術、特に蛍光相関分光法、蛍光相互相関分光法、蛍光強度分布分析、蛍光寿命測定、蛍光異方性測定、蛍光応答エネルギー遷移、又はそれらの組み合わせによって測定される請求項65～74のいずれかに記載の方法。

【請求項76】レセプター、膜孔、又はイオンチャンネル媒介活性を調節する物

質の同定法であって、好ましくは、アゴニストと前記レセプター又はイオンチャンネルとの相互作用において生成されるシグナルの細胞内トランスダクションを検出することにより行われ、

- 前記物質の存在下で、組換え型細胞において発現されるレポーター遺伝子生成物の量を、前記物質の不存在下での生成物の量と比較すること

を含む同定法；但し、

- 第一組換え型細胞は、レポーター遺伝子構造を含み、かつレセプター又はイオンチャンネルを発現し；かつ

- レポーター遺伝子構造は、

(a) アゴニストとレセプター、又は膜孔、又はチャンネルとの相互作用によって生成された細胞内シグナルに応答する転写調節成分；

(b) 好ましくは細胞外環境へ放出されるウイルス状粒子を構築し得る翻訳シグナル分子をコードし、かつ転写調節成分と効果的に結合しているレポーター遺伝子

を含む。

【請求項77】アゴニストの存在下で組換え型細胞において発現されるレポーター遺伝子生成物の量を、アゴニストの不存在下での生成物の量と比較することを更に含む請求項76に記載の方法。

【請求項78】第一物質の存在下で組換え型細胞において発現されるレポーター遺伝子生成物の量を、第二物質の存在下でのレポーター遺伝子生成物の量と比較することを更に含む請求項76又は77に記載の方法。

【請求項79】前記物質は、cDNA類、ゲノムDNAフラグメント類、mRNA類、ベクター類、ペプチド類、又は蛋白質類からなる群から選ばれる請求項76～78のいずれかに記載の方法。

【請求項80】- レセプター、膜孔、又はイオンチャンネルをコードするDNA；及び

- アゴニストと前記レセプター、膜孔、又はイオンチャンネルとの相互作用によって生成された細胞内シグナルに応答する1つ以上の転写調節成分と効果的に結合したレポーター遺伝子を含むレポーター遺伝子構造

を含む組換え型細胞、但し：

- 前記レポーター遺伝子は、翻訳シグナル分子をコードし、かつ
- 前記翻訳シグナル分子は、好ましくは細胞外環境へ放出されるウイルス状粒子を構築し得る。

【請求項81】転写調節領域は、血清応答成分、環状アデノシンモノホスフェート応答成分、及び細胞内カルシウムイオンレベルに応答する成分からなる群から選ばれる少なくとも1つの調節成分を含む請求項80に記載の細胞。

【請求項82】前記翻訳シグナル分子は、ルミネッセンスポリペプチド、特に、緑色蛍光蛋白質若しくはその突然変異体を更に含み、又は、検出し得る試薬を用いる次のラベル化のためのタグとして働く物を更に含む請求項80又は81に記載の細胞。

【請求項83】シグナル経路、及び/又は細胞の生理的状态を、そのようなシグナル経路に影響を及ぼす成分によって特異的に調節する物質の同定法であって：

- 前記物質の存在下で組換え型細胞において発現されたレポーター遺伝子生成物の量、及び/又は性質を、前記物質の不存在下での生成物の量、及び/又は性質と比較することを含む方法；但し、

- 前記細胞は、前記シグナル経路のマーカ―又は代理マーカ―を含み、かつ

- 前記レポーター遺伝子生成物の生成及び/若しくは性質、又は細胞からの放出は、前記マーカ―若しくは代理マーカ―の性質及び/若しくは量に、又は前記マーカ―若しくは代理マーカ―によって生成された細胞内シグナルに応答し、かつ

- 前記レポーター遺伝子生成物は、(i)シグナル分子を含み、かつ任意に(ii)検出し得る部分を含む、但し、前記シグナル分子は、好ましくは細胞外環境へ放出されるウイルス状粒子を構築し得る。

【請求項84】前記マーカ―若しくは代理マーカ―の性質及び/若しくは濃度に、又は前記マーカ―若しくは代理マーカ―によって生成された細胞内シグナルに応答する転写調節成分を含むレポーター遺伝子構造によって、レポーター遺伝子生成物がコードされる請求項83に記載の方法。

【請求項85】転写調節成分は、血清応答成分、環状アデノシンモノホスフェート応答成分、及び細胞内カルシウムイオンレベルに応答する成分からなる群から

選ばれる少なくとも1つの調節成分を含む請求項84に記載の方法。

【請求項86】前記シグナル分子は、ウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質のフラグメント、又はウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体を少なくとも含む請求項83～85のいずれかに記載の方法。

【請求項87】前記シグナル分子は、ウイルス状粒子のキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質のフラグメント、又は前記キャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体を少なくとも含む請求項83～85のいずれかに記載の方法。

【請求項88】前記キャプシド又はエンベロープ蛋白質は、レトロウイルス、ピコルナウイルス、レオウイルス、ポリオマウイルス、パピロマウイルス、パルボウイルス、ノダウイルス、コロナウイルス、ヘルペスウイルス、ヘパドナウイルス、バキュロウイルス、及びバクテリオファージからなる群から選ばれるウイルス群のキャプシド又はエンベロープから得られる請求項83～87のいずれかに記載の方法。

【請求項89】前記シグナル分子は、レトロウイルスのgag-遺伝子によってコードされる構造蛋白質を含む請求項88に記載の方法。

【請求項90】前記検出し得る部分は、ルミネッセンスポリペプチド、特に、緑色蛍光蛋白質若しくはその突然変異体、又はルミネッセンス試薬を用いる次のラベル化のためのタグとして働く物を含む請求項83～89のいずれかに記載の方法。

【請求項91】前記検出し得る部分は、特異的蛋白質、特に酵素を含む請求項83～90のいずれかに記載の方法。

【請求項92】前記物質は、低分子量化合物類、核酸類、ペプチド類/蛋白質類、又はPNA類からなる群から選ばれる請求項83～91のいずれかに記載の方法。

【請求項93】ゲノムDNA、cDNA、mRNA、アンチセンス配列、又はフラグメントから選ばれる核酸、又は前記核酸の修飾物、又はベクターを、前記物質として使用する請求項92に記載の方法。

【請求項94】前記蛋白質は抗体である請求項92に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、ウイルス状粒子(virus like particles)、それらの調製、及び好ましくは薬学的スクリーニング及び機能的ゲノムにおけるそれらの使用に関する。本発明は、前記ウイルス状粒子を用いて使用されるべき様々な分析形式を更に提供する。

【0002】

機能的取り込み(integral)膜蛋白質の分析は、いくつかの従来技術の系及び環境において行うことができる。レセプターの、その中でそれらが内部発現するか、又はそれらが通常過剰発現する組換え型細胞系において発現する細胞上で直接生じるリガンド相互作用が分析され得る。しかし、これら分子は、そのような環境において通常機能するにもかかわらず、高いバックグラウンドレベルの結果、多数の/高濃度の、混入している機能が類似しているか、又は関連している蛋白質の存在によって、それらの分析は妨げられる。そのため、対象となる特別な蛋白質又は内部レセプターが既に多数複製(copy)されて発現されているか、又は強力な組換え型プロモーターの下で過剰発現されている場合でさえ、試料は非常に不均質である。

【0003】

しかし、更に、結合ドメインが、レセプター、粘着性分子、又は触媒分子のいずれであるかを、独自の(original)活性が検出された供給源から、各分子を均質な状態に濃縮又は精製した後に、分析することができる。しかし、そのような精製段階により、それらの正常な脂質/脂質-蛋白質環境から、各蛋白質が除去される場合もあり、その結果、その本来の環境から、対象となる特異的分子が除去された後の変性効果のため、部分的又は完全な機能の損失が起こり得る。この結果、対象となるターゲットのそれぞれの量の精製(又は少なくとも濃縮)のために、多量の原料又は組換え材料が通常必要となる。

【0004】

均質な時間依存性(time-resolved)蛍光(HTRF)、又は共焦点検出技術に基づく分析、例えば、蛍光相関分光法(FCS)を含む超ハイスループットスクリーニング(

uHTS)に適用される様々な方法の形式は、その中に、対象となる、取り込み又は膜結合(membrane associated)蛋白質が高濃度で存在する小囊のような特異的膜画分を利用する。しかし、バックグラウンドシグナルによる同様の問題は、そのような調製物(preparations)でも見られ、時には最少量の試料を調製するためにも、通常多量の細胞が必要とされる。また、そのような調製物は、通常、それらの量及び完全な状態(integrity)が不均質であるので、その結果、かなりの程度の(appreciable)分析の変形(inter-assay variations)を与える。

【0005】

上記の通り、全細胞又はそれらの濃厚(enriched)膜調製物(小囊)を使用する標準分析系は、対象となる分子が過剰発現される、組換え型に設計された(recombinant engineered)細胞系においても、なお非常に大きなバックグラウンドがある(上記参照)という欠点を有する。いくつかの用途では、この高いバックグラウンドの問題は、7つのトランスメンブラン(transmembrane)レセプター(7-TMR類、ドイツ特許第197 09 168 C1及び国際特許出願PCT/EP 98/01229)の、リガンド誘発特異的ラベル化(ligand induced specific labeling)のための方法を使用することによって、部分的に低減され得る。

【0006】

そこで、上記の問題を全て解決する1つの目的は、安定な、好ましくはその自然な環境(例えば血漿膜)において、各蛋白質(例えば、生物学的に活性な7-TMR、又は他の取り込み膜蛋白質)を発現すること、及び、便利で経済的な方法で、混入している蛋白質を取り除き、その結果、ハイスループットスクリーニングに適した(amenable)高品質な材料を、十分な量で生成することである。

【0007】

特異的な機能が損なわれず、さもなければ混入している妨害(interfering)膜蛋白質の割合が好ましくは10%未満である、安定な環境において、特異的な組換え型取り込み膜蛋白質を多量に得ることを可能にする方法が必要とされる(これら混入している蛋白質は、調製中に、膜により、若しくは膜内へ非特異的に被包されることもあり、又は、それらのそれぞれの生物学的又は実験的適用の間、それらを分離することができない親和性及び近接(proximity)を有する付属(acce

ssory)蛋白質を表すこともある)。そのような系では、例えば、レセプター-リガンド結合分析における、既知又は未知のリガンドと、選択されたターゲット分子との機能的相互作用を観察するために、(例えば、EP 0 679 251 B1に記載されている)単一分子又は単一粒子に基づく検出系のような光学的検出技術を適用すべきである。それらが、対象となる特異的シグナルから空間的に分離されている限りは、様々なバックグラウンドシグナルを許容するウエスタンブロットと比べて、明確かつ正確なシグナルに依存する、好ましくは均質な光学的分析と組み合わせ、ドイツ特許DE 197 09 168 C1及び国際特許出願PCT/EP 98/01229に記載されているような、多数の孤立型(orphan-type)レセプターのための新規なアゴニスト及びアンタゴニストを見出すことは、特に興味深い。しかし、後者の方法は、ハイスループットスクリーニングには適していないので、スクリーニングに適用可能な技術が使用されなければならない。この目的のため、均質分析、即ち、例えばレセプターに結合しているリガンドと結合していないリガンドとを区別するための、分離段階には頼らない混合測定分析(mix-and-measure-assay)は、非常に有利であろう。多数の機能的ゲノムプログラムによって見出される多数のレセプターに適用可能な機能的な分析アプローチを常に探索している薬学分野では、そのような分析法(assay regimen)は、最も興味深く、かつ重要であろう。分泌された蛋白質及び外側の膜蛋白質は、今までのところ、経済的に最も重要な種類の治療効果のあるターゲットである。既知の全薬剤の約64%は、一般に、7-トランスメンブランレセプター群に向けられている。また、上記分析のコンダクタンス(conductance)のための試薬が必要とされる。

【0008】

異なるウイルス状粒子、及びこれらのウイルス状粒子が適用され得る分析形式を提供する本発明により、これらの問題が解決される。

【0009】

ウイルス状粒子、それらの調製及び検出

第一の態様において、本発明は、ウイルス状粒子(VLPs)へ蛋白質ターゲット分子を選択的に取り込むか、又は被包するための方法を提供する。ターゲット分子は、シグナル分子と共に、組換え型細胞において共発現される(co-expressed)。

各ターゲット分子及び各シグナル分子は、第一及び第二アミノ酸配列を含む。シグナル分子の第二アミノ酸配列は、それらが容易に検出され得る細胞外環境へ好ましくは放出されるウイルス状粒子を構築し得る能力を、シグナル分子に与える。前記シグナル分子の第一アミノ酸配列は、前記ターゲット分子の前記第一アミノ酸配列と共に、共有結合せずに(in a non-covalent manner)機能的に働くように選択される。この相互作用のため、対象となる第二アミノ酸配列、例えば、レセプター又は結合ドメインは、ウイルス状粒子に取り込まれるか、又は被包される。前記シグナル分子の第一アミノ酸配列は、ファンデルワールス力、静電力、積み重ね(stacking)相互作用、水素結合又は立体適合(steric fit)のような共有結合ではない力によって、前記ターゲット分子の前記第一アミノ酸配列と共に、好ましくは機能的に働く。好ましくは、これらの力は、 $K_{ass} > 10^{-6} M$ の結合定数を有する。

【0010】

本発明によって説明されるストラテジーは、全ての蛋白質を、同じ成分を用いて修飾することができ、それにより確認される(validated)べき蛋白質全てのための標準的な操作法を得るための、遺伝的タグを付ける(tagging)ストラテジーである。

【0011】

包まれた(enveloped) VLPの脂質二分子層(bilayer)内で、又は剥き出しの(naked)、若しくは包まれたVLPのキャプシド(capsid)内で、選択された(of choice)機能的ターゲット蛋白質が発現される均質なVLP群を生成することができる。ターゲット蛋白質を、VLP内に被包することもできる。これらの反応は、シグナル(signaling)蛋白質との特異的相互作用によって媒介される。各ターゲット蛋白質の取り込み/被包は、好ましくは、各ターゲット蛋白質のカルボキシル又はアミノ末端に位置する相補性コンカタメリック(concatameric)タグと、特異的に、高い親和性をもって相互作用する特異的コンカタメリック蛋白質配列と共に、シグナル分子を用いることにより、達成される。これら修飾(modified)蛋白質(シグナル及びターゲット)はいずれも、同じ宿主細胞内で発現され、次いで、発現された蛋白質生成物は、特異的なタグによってお互いに結合する。好

ましい態様では、この相互作用の結果、細胞膜への各複合体のトランスロケーション(translocation)が高濃度で起こり、ここで、それらは、成熟ウイルス粒子の放出と類似している出芽(budding)プロセスによって、細胞から押し出される。殆どの包まれたウイルス状粒子は、適当な細胞膜 - 多くの場合は血漿膜、他の場合にはER、ゴルジ、又は核膜を通る出芽によって、それらの膜又は“エンベロープ(envelop) ”、脂質二分子層、及び結合ターゲット蛋白質を得る。出芽プロセスの詳細は、先行技術において知られている(一般的な概説については、例えばフィールズ(Fields)ら、“ファンダメンタルバイロロジー(Fundamental Virology)”第3章、第3版、リップニコット - ラビン(Lippincott - Raven、1996を参照)。しかし、ウイルス状粒子は、エキソサイトーシス(exocytosis)又は溶解によって細胞から放出されることもある。

【0012】

多くの場合、前記ターゲット分子の前記アミノ酸配列は、ウイルス状粒子と非同源性である。第二配列として、レセプター、イオンチャンネル、酵素、粘着性分子、膜孔(membrane pore)の成分、抗原、又は前記のものフラグメント若しくは誘導体を選択することが、興味深いこともある。トランスメンブランレセプター、特に、本発明に基づいて出芽プロセスによってウイルス状粒子のエンベロープに取り込まれたG - 蛋白質結合レセプターを選択することが特に好ましい。しかし、サイトソル(cytosolic)又は核レセプターは、剥き出しの、又は包まれたVLPの蛋白質キャプシドによって取り込まれるか、又は被包されることができる。下記の異なる分析形式のコンダクタンスのために、前記ターゲット分子の第二アミノ酸配列として、ルミネッセンス(luminescent)ペプチド又は蛋白質を選択することが適当であることもある。

【0013】

シグナル分子の第二アミノ酸配列は、ウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質のフラグメント、又はウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体を少なくとも含むことが好ましい。しかし、それは、ウイルス状粒子のキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質のフラグメント、又は前記キャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体を含むこともある。キャプシド又はエンベロー

ブ蛋白質は、レトロウイルス(retroviruses)、ピコルナウイルス(picornaviruses)、レオウイルス(reoviruses)、ポリオマウイルス(polyomaviruses)、パピロマウイルス(papillomaviruses)、パルボウイルス(parvoviruses)、ノダウイルス(nodaviruses)、コロナウイルス(coronaviruses)、ヘルペスウイルス(herpesviruses)、ヘパドナウイルス(hepadnaviruses)、バキュロウイルス(baculoviruses)、及びバクテリオファージを含む様々なウイルス群から選択することもできるが、これらに限定されるものではない。例えば、少なくとも、レトロトランスポゾン(retrotransposon)、特に酵母中のTy成分、昆虫中のコピア(copia)成分、昆虫中のコピア様成分、マウス中のVL30、又はマウス中のIAP遺伝子のフラグメントによってコードされる前記シグナル分子の第二アミノ酸配列を使用することもできる。特に適当な配列のリストを、以下の表に示す。

【0014】

【表1】

| ウイルス群 | 自己構築型(Self assembling)キャプシド又はエンベロープ成分 | 例 | 文献(これらの内容は、本明細書に開示として援用される) |
|------------|--|---|---|
| レトロウイルス | gag-遺伝子、Gagのポリ-蛋白質前駆体、又は切形(truncated)Gagによってコードされる成分 | モロー(Moloney)ネズミ白血病ウイルス(MoMuLV) gag Pr65 | デルカンブレ(Delchambre)ら、EMBO J 8、2653-2660、1989; ルオ(Luo)ら、Virology 179、874-880、1990; ロイヤー(Royer)ら、Virology 184、417-422、1991; モリカワ(Morikawa)ら、Virology 183、288-297、1991; ヨウ(Zhou)ら、J. Virol. 68、2556-2569、1994; ジェイセン(Gheysen)ら、Cell 59、103-112、1989; ヒューズ(Hughes)ら、Virology 193、242-255、1993; ヤムシコフ(Yamshchikov)ら、Virology 214、50-58、1995. WO 96/30523、出願人: H. ウルフ(Wolf). WO 94/20621、出願人: British Biotechnology Ltd. WO 96/35798、出願人: Introgene B.V. EP 0972841 A1、出願人: Introgene B.V. EP 0960942 A2、出願人: Introgene B.V. EP 0959135 A1、出願人: Introgene B.V. EP. |
| ピコornaウイルス | ポリ蛋白質前駆体から得られるキャプシド | ポリオウイルスVP0、VP1及びVP3 | Fundamental Virology (第3版) フィールズ(Fields)ら編、1996. 第16章. Picornaviridae. 477-522. |
| レトロウイルス | RNA セグメントによってコードされる構造キャプシド成分 | ロタウイルス(Rotavirus) VP2、VP1/2、VP1/2/3、VP2/3、VP2/6、VP2/6/7、VP2/4/6/7、VP1/2/3/6 | Fundamental Virology (第3版) フィールズ(Fields)ら編. 1996. 第24章. Reoviruses. 691-730. |

【0015】

【表2】

| | | | |
|----------|------------|--|---|
| ポリオウイルス | 構造キャプシド蛋白質 | ポリオウイルス VP1、VP2 及び VP3 | Fundamental Virology (第3版) フィールズ (Fields) ら編. 1996. 第28章. Polyomaviridae. 917-945. DE 19543553 A1, 出願人: Deutsches Primaten Zentrum. |
| パピロウイルス | 構造キャプシド蛋白質 | Human papilloma-virus L1 及び L1/L2 | Fundamental Virology (第3版) フィールズ (Fields) ら編. 1996. 第29章. Papillomavirinae. 947-978. WO 00/09157, 出願人: Merck&C O. Inc. WO 99/50424, 出願人: M. Stanley. WO 98/02548, 出願人: 米国政府 |
| パルボウイルス | 構造キャプシド蛋白質 | アデノ(Adeno)結合ウイルス VP1、VP2 及び VP3 | Fundamental Virology (第3版) フィールズ (Fields) ら編. 1996. 第31章. Parvoviridae. 1017-1041. |
| ヘルペスウイルス | 構造キャプシド蛋白質 | ヘルペス単一 (simplex) ウイルス, VP5、VP19C、VP23、VP26 | Fundamental Virology (第3版) フィールズ (Fields) ら編. 1996. 第32章. ヘルペス単一ウイルス及びそれらの複製 (Herpes Simplex viruses and their replication). 1043-1107. |
| ヘパトウイルス | 構造キャプシド蛋白質 | 肝炎ウイルス S 蛋白質 | Fundamental Virology (第3版) フィールズ (Fields) ら編. 1996. 第35章. Hepadnaviridae and their replication. 1199-1233. WO 98/28004, 出願人: The crown in the right of the Queensland department of health. |

【0016】

【表3】

| | | | |
|------------|-----------------|---|---|
| ノドウイルス | 構造キャプシド蛋白質 | フロックハウスウイルス (Flock house virus)、蛋白質アルファ | Fundamental Virology (第3版) フィールズ (Fields) ら編. 1996. 第13章. Insect viruses. 401-424. WO 99/29723、出願人: Pentamer Pharmaceuticals. |
| コロナウイルス | 構造蛋白質 | マウス肝炎ウイルス M 及び E 蛋白質 | Fundamental Virology (第3版) フィールズ (Fields) ら編. 1996. 第18章. Coronaviridae. 541-559. WO 98/49195、出願人: Universiteit Utrecht. |
| レトロトランスポゾン | レトロトランスポゾンコード領域 | 酵母レトロトランスポゾン Ty によってコードされた蛋白質、昆虫コヒア及びコヒア様成分、ネズミ VL30 及び IAP 遺伝子 | WO 88/03563 |

【0017】

しかし、前記シグナル分子の前記第二アミノ酸配列として、レトロウイルスの gag - 遺伝子によってコードされる構造蛋白質を用いることが特に好ましい。本発明は、Gag - 蛋白質の使用について主に説明する。この説明は、本発明の範囲を限定するものではない。

【0018】

レトロウイルスから得られた人工的な構造は、例えば、ウイルス状粒子の外側の表面上に、レセプターサブユニットのような、対象となる蛋白質を選択的に提示するために使用され得る。以下に、レトロウイルスの構造の現在の知識を要約する。

【0019】

レトロウイルスは、他の成分間にウイルスの遺伝物質および逆転写酵素複合体を含む蛋白質キャプシドを有する。キャプシドの外部は、ウイルスエンベロープ糖蛋白質が埋め込まれている宿主細胞血漿膜から得られる脂質二分子膜である

。感染サイクル中、これらのエンベロープ糖蛋白質は、宿主細胞の表面上の特異的レセプターを認識し、かつそれと結合し、ウイルスと細胞膜との融合を引き起こすことにより、感染し始める。細胞内ゲノム複製および細胞染色体の中へのその取り込み(integration)後に、構造蛋白質をコードするウイルスRNAが生成され、発生期のビリオンが構築される。新たに合成されたウイルスキャプシドは、通常(for the most part)、細胞蛋白質を排除するのに対し、ウイルス出芽の間には、細胞蛋白質以外のウイルス糖蛋白質を、血漿膜から取り込む。このレトロウイルス構築(assembly)工程は、レトロウイルスの基礎分子生物学の重要な態様である。ウイルスキャプシド形成及び出芽プロセスによる宿主細胞からの放出のこの工程の複雑さを、以下により詳細に説明する。

【0020】

すべてのレトロウイルスのゲノムは、注目すべき(notably)、構造蛋白質をコードするgag遺伝子、逆転写酵素及び結合蛋白質分解ポリペプチド、ヌクレアーゼ及びインテグラーゼ結合機能をコードするpol遺伝子、並びに被感染細胞の表面上、及び成熟した放出されたウイルス粒子の表面上でも検出されるコードされた糖蛋白質膜蛋白質を有するenvという、主に3つの主要な遺伝子生成物をコードする。今まで分析されたすべてのレトロウイルスのgag遺伝子は、全体的な構造類似性を有し、特に、各グループ内でアミノ酸レベルに維持される。gag及びpol遺伝子は、両生成物のために同じグループに分類することができ、単純な高分子量前駆体ポリ蛋白質、例えばPr65^{Gag}(ネズミ白血病ウイルス用、MuLV)又はPr200^{Gag-Pol}として合成され、次いで切断され、成熟蛋白質が生成される。Gag蛋白質は、逆転写酵素以外のコア蛋白質を生成する。MuLVのためのGag前駆体ポリ蛋白質はPr65^{Gag}であり、4つの蛋白質に切断される。前駆体上でのそれらの順番は、NH₂-p15-p12-p30-p10-COOHである。これらの切断は、ウイルスプロテアーゼによって媒介されるようである。MuLV Gag蛋白質は、グリコシル化された形、及びグリコシル化されていない形で存在する。グリコシル化された形は、非グリコシル化Pr65^{Gag}のためのAUGコドンの上流に位置する、異なるフレーム内(inframe)開始コドンから合成されるgPr80^{Gag}から切断される。グリ

コシル化Gagを合成しないMuLVの欠損(deletion)突然変異体は、依然として感染性であるので、グリコシル化(glycosylation events)の重要性には疑問が生じる。プロテアーゼにコードされたウイルスによる55000DaのHIV-1 Gag前駆体(pr55^{Gag})の後翻訳切断により、N-ミリスチン化され(myristolated)、かつ内部でホスホリル化された(phosphorylated)p17マトリックス蛋白質(p17MA)、ホスホリル化p24キャプシド蛋白質(p24CA)、並びにp9及びp6に更に切断されるヌクレオキャプシド蛋白質p15(p15NC)が得られる。

【0021】

MuLV pol遺伝子の翻訳は、gag遺伝子末端に近接したリボソーム-1フレームシフトによって達成される。翻訳フレームシフトにより、polリーディングフレーム(reading frame)の生成物に融合した、切形(truncated)Gag融合蛋白質からなる160kDのポリ蛋白質の合成が可能になる。しかし、Gag-Pol融合蛋白質生成のレベルは、Gag蛋白質の生成レベルの5-10%しかない(ジャックス(Jacks)ら、セル(Cell)55、447-458、1988年;ウィルソン(Wilson)ら、セル(Cell)55、1159-1169、1988年)。

【0022】

pol遺伝子は、ウイルスプロテアーゼによって前駆体から切断されるウイルス酵素プロテアーゼ、逆転写酵素、及びインテグラーゼをコードする(ライトフート(Lightfoote)ら、J.Virol.60、771-775、1986年;オロズラン(Oroszlan)及びルフトィグクルトップ(Luftig Curr Top)、Microbiol Immunol 157、153-185、1990年;ペン(Peng)ら、J.Virol.65、2751-2756、1991年)。

【0023】

env遺伝子は、感染サイクルの開始に必要なビリオンの表面糖蛋白質をコードする。それらの位置および役割により、env生成物は、ビリオンの宿主領域および中和(neutralisation)抗原の両方を決定する。お互いに密接に関連していないにもかかわらず、異なるグループのenv遺伝子は、多くの構造類似性を

示す。env生成物のアミノ末端配列は、Env前駆体のトランスメンブラン工程の結果として切断されるシグナルペプチドをコードする。MuLV Pr90^Eのenv遺伝子生成物は、グリコシル化され、ジスルフィド結合によってお互いに結合したままのgp70及びp15Eに切断される。P15Eは、脂質膜内に位置するカルボキシル末端及び膜外に位置するアミノ末端を有するトランスメンブラン蛋白質である。電子顕微鏡写真では、p15Eはウイルスエンベロープ上にスパイク(spikes)として表れるのに対し、gp70は、スパイクより高い位置にあるコブ(knob)である。既に説明したように、より大きなアミノ末端蛋白質は、宿主領域を特定する決定基(determinants)を含む。より小さなカルボキシル末端蛋白質は、そのカルボキシル末端の近くに、トランスメンブラン固定(anchor)領域を構成する、20個以上のアミノ酸の疎水性ドメイン、それに続く塩基性アミノ酸及び様々なサイズの細胞質ドメインを常に含み、キャプシド蛋白質の認識に関連すると考えられる。

【0024】

レトロウイルスの構築は、細胞血漿膜で、出芽プロセスによって起こる。いくつかのレトロウイルスの研究により、他のウイルス成分の不存在下で発現されたGagポリ蛋白質は、細胞表面での粒子形成及び出芽に対して自給自足(self sufficient)であることが示された(ウイルス(Wills)及びクラベン(Craven) AIDS 5、639-654、1991年; Zhouら、J.Virol.68、2556-2569、1994年; モリカワ(Morikawa)ら、Virology 183、288-297、1991年; ロイヤー(Royer)ら、Virology 184、417-422、1991年; ジェイセン(Gheysen)ら、セル(Cell) 59、103-112、1989年; ヒューガス(Hughes)ら、Virology 193、242-255、1993年; ヤンスチコフ(Yamshchikov)ら、Virology 214、50-58、1995年)。バキュロウイルスを用いる昆虫細胞中でのGag前駆体の発現におけるレトロウイルス状粒子の形成が、数グループによって示された(デルカンブラ(Delchambre)ら、EMBO J 8、2653-2660、1989年; ルオ(Luo)ら、Virology 179、874-880、1990年; ロイヤー(Royer)ら、Virology 184、417-422、1991年; モリカワ(Morikawa)ら、Virology 183、288-297、1991年; Zhouら、J. Virol. 68、2556-2569、1994年; ジェイセ

ン(Gheysen)ら、セル(Cell) 59, 103-112, 1989年; ヒュージス(Hughes)ら、Virology 193, 242-255, 1993年; ヤンスチコフ(Yamshchikov)ら、Virology 214, 50-58, 1995年)。これらG a g粒子は、未成熟レンチウイルス(lentivirus)粒子に似ており、効率的に構築され、出芽によって昆虫細胞血漿膜から放出される。哺乳動物細胞における発現と比べ、バキュロウイルス系でのG a g発現ベクター中のプロテアーゼ領域の取り込み(inclusion)により、プロテアーゼの過剰発現、並びに粒子の形成及び放出を妨げる、昆虫細胞内の成長構造蛋白質へのG a g前駆体の初期の処理が引き起こされる(モリカワ(Morikawa)ら、Virology 183, 288-297, 1991年;ヒュージス(Hughes)ら、Virology 193, 242-255, 1993年)。未成熟粒子は、構造蛋白質、マトリックス、コア及びヌクレオキャプシド蛋白質へのG a g前駆体の切断を含む、ウイルスプロテアーゼによる成長過程に付される(ウィルス(Wills)及びクラベン(Craven) AIDS 5, 639-654, 1991年)。

【0025】

G a g前駆体のアミノ末端領域は、ウイルス構築のために必要とされる、細胞表面への輸送及び膜結合のためのターゲティング(targeting)シグナルであると報告されている(ユー(Yu)ら、J. Virol. 66, 4966-4971, 1992年; an, Xら、J. Virol. 67, 6387-6394, 1993年;ゾウ(Zhou)ら、J. Virol. 68, 2556-2569, 1994年;リー(Lee)及びリニアル(Linial) J. Virol. 68, 6644-6654, 1994年;ドルフマン(Dorfman)ら、J. Virol. 68, 1689-1696, 1994年;ファキー(Facke)ら、J. Virol. 67, 4972-4980, 1993年)。ウイルス粒子の血漿膜由来(derived)エンベロープへのエンベロープ蛋白質の特異的取り込みのメカニズムは知られていないが、E n vとマトリックス蛋白質との相互作用は重要なようである(ユー(Yu)ら、J. Virol. 66, 4966-4971, 1992年;ドルフマン(Dorfman)ら、J. Virol. 68, 1689-1696, 1994年;ガラハー(Gallaher)ら、AIDS Res Hum Retroviruses 11, 191-202, 1995年;ブジェルスキー(Bugelski), P.J.ら、AIDS Res Hum Retroviruses 11, 55-64, 1995年)。ヒトの免疫欠乏ウイルスタイプ1 H I V - 1は、レトロウイルスのレンチウイルス群に属する。他のレトロウイルスのように、H I V - 1は、g a g及びp o l遺伝子によってコードされた2つのポリ蛋白質前駆体から、その成長コア粒子を構築する。e n v遺伝子は、成長ウイルス粒子のエンベ

ローブ糖蛋白質をコードする(タカハシ(Takahashi)ら、J Exp Med 170, 2023-2035, 1989年)。H I Vでは、g a g及びp o l遺伝子生成物の構造及び機能が、ウイルスの形態形成工程におけるそれらの役割を理解するために、広く研究された。これにより、p 17のマトリックス層に取り囲まれているp 24の疎水性コア内の、ヌクレオキャプシド蛋白質複合体からなるウイルス粒子が説明された。コアは、マトリックス層と共に、ウイルスE n v糖蛋白質を含む宿主細胞膜によって包まれている。ヌクレオ蛋白質複合体は、p 9蛋白質及びウイルスゲノムの複製及び取り込みに必要なウイルス酵素と、ウイルスR N Aゲノムからなる(ゲルダーブロム(Gelderblom), AIDS 5, 617-637, 1991年; ウィルス(Wills)及びクラベン(Craven) AIDS 5, 639-654, 1991年)。g a g遺伝子の3´領域によってコードされる第二蛋白質、p 6は、蛋白質の役割も正確な位置も明らかにされていないが、コア領域とエンベローブ領域との間に位置すると言われている。

【0026】

G a g構造蛋白質、並びにE n v糖蛋白質g p 120及びg p 41を含む組換え型H I V状粒子の構築は、牛痘(vaccinia)ウイルス発現系を用いて報告された(ハッファー(Haffar)ら、J. Virol. 66, 4279-4287, 1992年)。これらの粒子は、ウサギにおいて、H I V体液及び細胞免疫を誘発し(ハッファー(Haffar)ら、J. Virol. 66, 4279-4287, 1992年)、H I V - 1血清陽性(sero-positive)ドナーからの潜在的に感染されている(latently infected)末梢血液単核におけるウイルス生成を阻害することができる(ハッファー(Haffar)ら、J. Virol. 66, 4279-4287, 1992年)ことが報告された。

【0027】

バキュロウイルス系におけるレトロウイルスのエンベローブ糖蛋白質の発現パターンは、哺乳動物細胞における発現と比べて、いくつかの珍しい特徴も有する。これらの蛋白質は、非常に非効率的に切断され、主に細胞に結合する(ルシェ(Rusche)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84, 6924-6928, 1987年; ウェルズ(Wells)及びコンパンス(Compans) Virology 176, 575-586, 1990年; ヒュー(Hu)ら、Nature 328, 721-723, 1987年)。しかし、昆虫細胞中で生成されたH I V - 1 E n v蛋白質は、免疫血清と特異的に反応する能力(ヒュー(Hu)ら、Nature 32

8, 721-723, 1987年; ウェルズ(Wells)及びコンパンズ(Compans) Virology 176, 575-586, 1990年)、及びH e L a T 4細胞との共存培養におけるシンシチウム(syncytium)形成を誘発する能力(ウェルズ(Wells)及びコンパンズ(Compans) Virology 176, 575-586, 1990年) によって示されるように、免疫学的及び生物学的に活性である。

【0028】

本発明による1つの特異的態様において、ウイルス状粒子へ蛋白質ターゲット分子を選択的に取り込むか、又は被包するための方法は、レトロウイルスの特異的構造遺伝子成分(gag遺伝子、又は他のウイルス群からの構造蛋白質成分)が、宿主細胞において未処理のポリ蛋白質として発現されると、この遺伝子単独で、VLP類の形成、及び血漿膜からの出芽プロセスによる細胞外環境への放出が可能であり、かつその能力を有する(responsible)という観察に基づいている。この観察は、ペプチド又はポリペプチドが、宿主細胞由来の所定の小囊粒子内に、選択的に取り込まれるか、又は被包される新規な方法に適当に(accordingly)適用され、発達した。VLP類内での各ターゲット蛋白質の取り込み/被包の特異性は、対象となるターゲットと結合した相補性特異的ペプチドタグを有するシグナル蛋白質と共有結合した分子ペプチドタグの(ファンデルワールスカ、静電力、積み重ね(stacking)相互作用、水素結合及び立体適合(steric fit)を含む)共有結合ではない強力な特異的相互作用の結果である。しかし、いくつかの場合には、対象となるターゲット蛋白質/ペプチドとシグナル蛋白質との共有(covalent)融合物を使用することが好ましいこともある。

【0029】

タグを含むシグナル融合蛋白質は、分子内、又はN-若しくはC-末端の特異的ペプチドタグも運ぶ、対象となる各ターゲット分子と共に、細胞系において共発現される。このタグは、シグナル蛋白質上で見出されるものに対する相補性パートナーであり、(かつ通常シグナル及びターゲット分子のいずれとも非相同性であり、)そしてそれと特異的に高親和性で相互作用する。相互作用しているペプチドは、モノマーとして親水性を有する(charged)アルファヘリックスを形成するように特異的に設計され、共発現されたときに、平行又は非平行の、巻きつ

きコイル構造(coiled-coil structure)を形成するようにお互いに相互作用することが好ましい。好ましくは、巻きつきコイル相互作用の結合定数は、低nM(1 - 10 nM)範囲であり、設計された対に特異的である。各宿主細胞における修飾されたシグナル蛋白質(例えば、レトロウイルスからのGag蛋白質)の発現により、Gag蛋白質のN末端部内に存在するシグナルによる、血漿膜でのGag蛋白質の蓄積(accumulation)が起こる。この蛋白質が、血漿膜に高濃度で存在することは、これらVLP類が細胞外環境へ放出される出芽プロセスに、通常必要な条件である。相補性タグを運ぶターゲット蛋白質(例えば酵素)が、同じ細胞内で発現され、細胞内区画(compartments)で濃縮されると、タグされた(tagged)Gag蛋白質との特異的相互作用により、血漿膜へのターゲットの共輸送(co-transport)が起こり、次いで、放出されたVLP類への取り込みが起こる。更に、ターゲット蛋白質が(酵素又はルミネッセンスペプチド又は細胞と非相同性のポリペプチドのような)可溶性細胞質蛋白質であると、それは、標準的な分子生物学的方法により、Gag蛋白質のC末端へ共有結合で(covalently)融合され得る。この融合蛋白質の発現により、蛋白質生成物が合成され、それは、その後宿主細胞の血漿膜へ輸送され、そこで濃縮され、次いで出芽プロセスによってVLP類内に詰められ、その後細胞外環境へ放出される。ターゲット蛋白質が、(レセプター、イオンチャンネル、粘着性分子又は膜孔複合体のような)取り込み膜蛋白質であると、巻きつきコイルタグによる特異的相互作用により、血漿膜での共存局在化(co-localisation)及び濃縮の後に、主にタグされたGag蛋白質及び対象となるターゲット蛋白質を含むキメラ(chimeric)VLPの放出がその後起こる。すべての場合、細胞外環境へ放出された、得られたVLP類は、その中で、機能的ターゲット蛋白質/ペプチドが、包まれた膜小嚢内に被包されるか、又は取り込まれる複合構造を形成する。上述のように、ペプチド又はポリペプチドターゲットは、シグナル構造と融合され得る。更なる態様において、ペプチド又はポリペプチドは、好ましくは $K_{as} > 10^6 M^{-1}$ の結合定数の相互作用しているタグによって、シグナル構造と共有結合ではなく(non-covalently)結合する。相互作用は、好ましくは、ペプチド/ペプチド相互作用、好ましくは巻きつきコイル、ペプチドリガンド相互作用、又はキレート相互作用のような複合体形

成に基づくこともある。

【0030】

更なる態様では、本発明は、それらの中に取り込まれた／被包された蛋白質ターゲット分子を含むウイルス状粒子を提供する。これらは、シグナル分子と共に、第一アミノ酸配列及び第二アミノ酸配列を含む前記ターゲット分子を、細胞中で共発現することにより得ることができる。これらシグナル分子は、第一アミノ酸配列及び第二アミノ酸配列を含み、それらの後者は、ウイルス状粒子を構築し、好ましくは細胞外環境へ放出される能力を、シグナル分子に与える。前記シグナル分子の第一アミノ酸配列は、前記ターゲット分子の第一アミノ酸配列と共に、共有結合せずに機能的に働き、それにより前記ターゲット分子は前記VLP類に取り込まれるか、又は被包される。これらVLP類は、それらが容易に検出され、かつ分離される細胞外環境へ好ましくは放出される。本発明は、これらVLP類を含む試薬キット、及び前記VLP類を含む薬剤を更に提供する。VLP類は、剥き出しの、若しくは包まれているVLPのキャプシドに、又は包まれているVLPのエンベロープに取り込まれるか、又は結合している分子を更に含むことが好ましいこともあり、前記分子は、前記薬剤をその影響領域(area of influence)へ導く機能を有する。本発明によるVLP類は、例えば遺伝的疾患、腫瘍疾患、自己免疫又は伝染性疾患を、治療若しくは予防するための薬剤、又はその前駆体の調製のために使用され得る。しかし、それらは、例えば異なるVLP群に取り込まれたターゲット分子間の相互作用の同定及び特徴付けのための、例えばターゲット分子と、対象となる更なる分子、特に、細胞若しくはビーズ、特にコンビナトリアルケミストリー(combinatorial chemistry)により、それらに結合した分子を含むビーズの表面に結合した分子、又は水性培地に可溶性分子、特に細胞内の機能的位置の分子との間の相互作用の同定及び特徴付けのための、特定の分析を行うために特に重要であり、かつ価値ある道具(tool)でもある。それらは、潜在的に薬学的に活性な物質の同定において、診断用における分析物(analytes)の同定において、及び機能的ゲノムにおいて、必須の道具になるであろう。

【0031】

本発明の態様により、新たな形のドラッグデリバリーシステム(drug delivery system)も提供され、それにより、細胞内活性蛋白質が生成される。蛋白質は、例えば、同じ細胞によって共発現されるGagと相互作用するタグへの融合によって、プロデューサー(producer)細胞系において生成されることにより、プロデューサー細胞から、VLPとしてまとめられて(packaging)、排除される。この画分は、生物活性を有する本来の(native)、適当に処理された蛋白質によって容易に精製することができる。VLP類が、適当にターゲットとされる(targeted)ように同時に設計されると、それらは、生体内で各ターゲット細胞を認識し、それにより生物活性蛋白質と共に各VLPの取り込みが起こるのであろう。必要であれば、適用されるべき蛋白質は、その完全な活性状態となる各宿主細胞内への導入後にだけ、それが正確に処理され得る前駆体の形で、VLPに取り込まれ得る。そのようなVLP類は、局部的に、又は全身に適用され得る。

【0032】

そのような本発明の(inventive)系は、既知若しくは未知の蛋白質の転写若しくは機能的翻訳の両方のためのレポーター系として、及び/又は細胞内での分子相互作用の分析のためのレポーター系として適用することもできる。他の従来技術の方法と比べて、高濃度の反応物の細胞内蓄積は必要なく、かつ対象となる主要な分子相互作用を増幅する非線形シグナルを生成するための酵素反応が関連する分析と比べて、バックグラウンドシグナルが低減されている。その方法はそのまま(as the methodology stands)、蛋白質-蛋白質相互作用の分析のために使用されるツーハイブリッド(2-hybrid)系において、いくつかの利点をもたらす。いくつかのこれらの利点には、以下のことが含まれる：この系は、蛋白質を核に移入する必要がないので、様々な種類の蛋白質に適用することができる。この分析は、均質であり、複雑な選択形式(regimes)を使用しないので、陽性(positives)の間違いが少ない。宿主細胞から生成物が連続的に排除されるので、系の毒性が低減される。この系は、対象となる細胞からの細胞抽出物の調製を必要とせず連続的に分析することができる一般的な(universal)レポーター系として役立つ。このことは、反応速度論(kinetics)を容易に適用する(followed)ことができ、かつ必要であれば細胞を同時に処理する(synchronized)ことができること

を意味する。

【0033】

この技術は、Gag-蛋白質又はその他の適当なシグナル分子に結合/相互作用する部位がある場合に、蛋白質のほかに、細胞内で対象となるいずれかの分子を取り出すのにも適している。形質転換(transforming)DNA又はコードDNAが、Gag融合によって認識され得るタグと結合し得る場合、それは、DNAやRNAのようなコード配列に結合するために使用され得る。例えば、その相互作用パートナー蛋白質を取り出すために、対象となる蛋白質を発現する株(strain)に形質転換されたcDNA-ライブラリーのショットガン(shot gun)発現によって、シグナル鎖の解読(decoding)が可能であり、それにより、対象となる蛋白質はシグナル構造と相互作用するか、又は結合する。

【0034】

例えば、Gagと対象となる蛋白質との間の結合は、直接的な融合、又は、生成(producing)細胞内部で形成される、蛋白質/蛋白質、ペプチド/蛋白質、若しくはペプチド/ペプチド相互作用のような共有結合ではない相互作用によって行われるか、又は媒介される。例としては、巻きつきコイルペプチド相互作用、pDZドメイン等、又はいずれかの発展的に進化した(evolutionary evolved)、例えばコイル-コイル相互作用が挙げられる。

【0035】

本発明による、シグナル分子とターゲット分子との間の共有結合ではない相互作用に基づくVLP類、並びにシグナル分子とターゲット分子との間の融合物を利用する、従来技術のVLP類を、以下の分析形式で 사용할 ことができる。細胞からの放出形式(適当な細胞膜を通るエキソサイトーシス、溶解又は出芽)によって、これらのVLP類は、剥き出されているか、又は包まれていることができる。対象となるターゲット分子は、蛋白質キャプシド又はエンベロープ内に取り込まれ得る。それはまた、VLPのルーメン(lumen)内に被包され得る。

【0036】

要約すると、これらに限られないが、ターゲット分子の取り込み/被包の例として、以下のものが挙げられる：

- 剥き出しの、又は包まれているウイルス状粒子のキャプシド構造の領域(confines)内のターゲット分子の封入(enclosure)、
- 剥き出しの、又は包まれたウイルス状粒子のキャプシド構造へのターゲット分子の取り込み(integration)及び結合(attachment)、
- 包まれたウイルス状粒子の膜へのターゲット分子の取り込み又は結合。

【0037】

本発明により使用されるべき細胞の例としては、特に、ヒト細胞、他の哺乳動物細胞、又は昆虫細胞のような他の真核生物細胞が挙げられる。

【0038】

以下の分析形式はすべて、均質な方法、即ち、例えば所定のターゲット分子との相互作用のためのスクリーニングにおいて、結合/非結合リガンドを区別するための分離段階を何ら使用しない、混合測定形式(mix-and-measure mode)で行われることが一般に好ましい。コンビナトリアルケミストリーや自動合成のような新規合成技術により、スクリーニングに使用され得る新規分子数は、過去数年で急激に増加した(exploded)。更に、ゲノムの成果により(from genomics efforts)、新規ターゲットの数は増加し始めている。それ故、以下の分析が、ハイスループット形式でしばしば使用されるであろう。

【0039】

長年に亘り、広範な生物学的分析に取り組む(address)ために、いくつかの蛍光法が開発されてきた。以下の分析形式と共に、これら技術を使用することが好ましい。これらに限られないが、蛍光相関分光法(fluorescence correlation spectroscopy)、蛍光相互相関分光法(fluorescence cross-correlation spectroscopy)、蛍光強度分布分析(fluorescence intensity distribution analysis)、蛍光寿命測定(fluorescence lifetime measurements)、蛍光応答エネルギー遷移(fluorescence resonance energy transfer)、又はこれらの組み合わせを適用することが推奨される。特に、感度が高く、かつバックグラウンドが低いので、共焦点(confocal)顕微鏡法及び分光法技術を適用することができる。しかし、いくつかの場合には、伝統的な顕微鏡装置に頼るか、又は光散乱技術を使用することが適当であることもある。VLP類の検出、又はそれらの性質の分析のために、例

例えば、インピーダンス(impedance)又は二重電気泳動(dielectrophoresis)測定に頼ることもできる。この特許出願において開示されているすべての分析法は、放射計による(radiometric)読み出しのような、非蛍光、非光学読み出し(read out)技術を使用することもできる。例えば、シンチレーション近接分析(scintillation proximity assays)又はフィルター技術を使用することが特に好ましいこともある。

【0040】

本発明により研究され得る分析形式の例として、以下のものが挙げられる：

- リガンド/レセプター相互作用の解明のための分析
- レセプター/レセプター相互作用の解明のための分析
- 蛋白質 - 蛋白質、ポリペプチド - ポリペプチド、蛋白質 - DNA、蛋白質 - RNA、及び低分子量リガンド - 蛋白質相互作用を含むインサイチュ(in situ)の細胞内相互作用の解明のための分析
- 既知/既知、未知/既知、未知/未知パートナー相互作用を含む分析
- 以下のものを解明するための分析
 - 細胞/細胞相互作用(細胞粘着性分子を含む)
 - ホルモン、cAMP、血清及び成長因子応答DNA成分、例えばCRE、EREなどを含む転写活性化に基づく分析
- 細胞内ターゲットの分析
 - 媒介物(mediator)が膜を通過し得る場合に、そのような酵素活性の媒介物を研究するためのVLPの内部に結合した酵素系/酵素検出系
 - 新たな相互作用蛋白質を取り出すための相互作用、及びそれにより、相互作用の強度を強めるか、又は弱めるために、分析系として同じ系を使用すること。

【0041】

PCT/EP00/01787(その内容は、本明細書に開示として援用される)に記載の分析において、本発明によって生成されるVLP類を使用することも好ましい。

【0042】

ここで開示されるVLP類及び分析は、これらに制限されないが、翻訳拡散(translation diffusion)、蛍光異方性/偏光、分子蛍光明度、蛍光相互相関/一

致(coincidence)、蛍光寿命に基づく、単一分子又は複合体又はVLP類のような粒子を追い(follow)、それらを測定することができる共焦点蛍光検出に基づく光学的検出系と組み合わせて任意に使用することができる。このような方法は、EP 0 679 251、ヨーロッパ特許出願97 945 816.3、PCT/EP 98/03509、PCT/EP 98/06165、ヨーロッパ特許出願97 951 990.7、ドイツ特許197 02 914及びヨーロッパ特許出願99 112 104.7に開示されており、これらの内容は、本明細書に開示として援用される。

【0043】

ここで開示されるVLP類及び分析は、ヨーロッパ特許出願96 939 933.6、97 953 804.8、97 952 938.5、PCT/EP 97/07218、PCT/EP 98/08370、PCT/EP 99/02380、PCT/EP 99/04469及びPCT/EP 99/04470(これらの内容は、本明細書に開示として援用される)に開示されているような取り扱い、及び分類技術と共に適用することもできる。

【0044】

上記VLPタイプ - 本発明の一態様によって調製されたもの、並びに従来技術で開示されたものを含む - 及び検出方法を容易に適用し得る(amenable)、様々な分析形式を以下に説明する。

【0045】

細胞に基づくレポーター分析

この分析原理では、特異的なエフェクター(effector)分子(例えば、ホルモン、若しくは成長因子、若しくは低分子量分子)は、細胞の表面上の特異的分子(例えば、血漿膜レセプター、若しくはイオンチャンネル、若しくは細孔複合体(pore complex))と相互作用するか、又は、血漿膜を、活動的に、若しくは消極的に超えることができ、そこで、その後、その特異的細胞内結合パートナー(細胞質若しくは核レセプター、若しくは他の相互作用パートナー)と相互作用することができる。この相互作用は、細胞内での特異的なシグナル現象のカスケード(cascade)を刺激し、それにより、各応答遺伝子のプロモーター領域で見られる特異的DNA配列と相互作用する特異的転写因子の制御下にあることを特徴とする細胞内のいくつかの遺伝子の転写活性化が起こる。特異的ターゲット遺伝子が刺

激される場合、応答DNAプロモーター配列が、宿主細胞と非相同性である特異的レポーター遺伝子の転写を制御するように配置されている、設計された細胞において、レポーター遺伝子の転写は、高く、又は低く調節され(up- or down-regulated)、かつ定量され得る。このレポーター遺伝子の定量化により、その後、研究対象の分子の活性化状態を直接測定することができる。細胞の表面上で見られる取り込み(integral)膜蛋白質の活性化の分析のための分析形式において、化合物は、この分子の活性化を刺激するか、又は阻害する培地に添加され、それにより細胞内で合成されるレポーター分子のレベルが(対照細胞と比べて)増加するか、又は減少し、その定量化は、研究対象の分子上の化合物の効果と直接相關する。本発明によれば、VLP類は、この分析形式に適用され得る。VLP類を構築し得る蛋白質と、それらの検出及び定量化を可能とするVLP類に、特異的な性質をもたらす特異的分子との間の融合物を、シグナル分子として使用することが好ましい。これらVLP類は、細胞から、細胞外培地へ放出されることが好ましい。そのように設計された細胞の培養培地へ、アゴニスト、アンタゴニスト、又は化合物のいずれかを添加することによる、研究対象の分子の調節により、そのようなVLP類中に存在する検出可能な部分に従って定量され得る、放出されたVLP類の量が調節される。細胞に基づくレポーター分析の分析のための検出系として、VLP類を使用することによって得られる利点としては、以下のことが挙げられる：サンプリング及び分析読み出しの分析は、非侵入的(non-invasive)である。即ち、細胞自身は破壊されず、VLP類が長時間蓄積されている細胞培養培地から除去された試料だけを用いて、データポイントが生成される。これは、反応速度測定が可能であることを意味する。細胞外培地におけるVLP類の物理化学的安定性は、VLP類を直ちに定量化する必要がないことをも意味する。定量化のために放出されたVLP類の固有の性質(融合された検出可能な部分のルミネッセンス)を使用すると、試験化合物、又はそれらの代謝産物が高濃度で存在することは、そのような粒子の検出の妨げとはならないであろう。放出された粒子の定量化は、VLP類の固有の性質を利用する均質な形式において行うことができる。

機能的ゲノムに関する細胞に基づくレポーター分析

説明した分析から規定される原理により、既知又は未知の機能を有する遺伝子生成物をコードする（強力な構造的又は誘導性プロモーターの転写調節下の）特異的DNA分子が、特定の機能を果たす組換え型細胞へ導入されることにより、分析読み出しによって、これらの遺伝子生成物がこの特異的機能を調節することができるか否かが直接示される。そのような分析形式の具体例は、翻訳されると、活性化された取り込み膜蛋白質の下流のシグナル活性を調節することができる蛋白質生成物が得られる特異的DNA配列を導入する効果を分析することであろう。この分析原理では、特異的なエフェクター分子（例えば、ホルモン、若しくは成長因子、若しくは小型分子）は、細胞表面上の特異的分子（例えば、血漿膜レセプター、イオンチャンネル、若しくは細孔複合体）と相互作用するか、又は、血漿膜を、活動的に、若しくは消極的に超えることができ、そこで、その後、その特異的細胞内結合パートナー（細胞質若しくは核レセプター、若しくは他の相互作用パートナー）と相互作用することができる。この相互作用は、細胞内での特異的なシグナル現象のカスケードを刺激し、それにより、各応答遺伝子のプロモーター領域で見られる特異的なゲノムDNA配列と相互作用する特異的転写因子の制御下にあることを特徴とする細胞内のいくつかの遺伝子の転写活性化が起こる。応答DNAプロモーター配列が、その後特異的ターゲット遺伝子の刺激に使用される宿主細胞と非相同性である特異的レポーター遺伝子の転写を制御するように配置されている、設計された細胞において、レポーター遺伝子の転写は、高く、又は低く調節され、かつ定量され得る。このレポーター遺伝子の定量化により、その後、研究対象の分子の活性化状態を直接測定することができる。

【0047】

細胞表面上で見られる取り込み膜蛋白質の下流のシグナル能力を調節することができるペプチド又はポリペプチド分子を検出するための分析形式において、その後、既知又は未知の機能を有するペプチド又はポリペプチドをコードする（強力な構造的又は誘導性プロモーターの転写調節下の）DNA分子が、細胞内へ導入される。これらは、転写が調節された(transcriptionally regulated)レポーター分子融合物（好ましくはGag-ルミネッセンス蛋白質）と共に発現される

。積極的な選択工程によって、新たに導入されたDNA構造の取り込み(uptake)、及び安定的な取り込み(stable integration)のために、細胞クローンがその後選択される。研究対象の分子を積極的に刺激することができるエフェクター分子を添加した後、細胞培養内地へ放出された、検出及び定量可能なVLP類の放出のために、これらの細胞クローンは、その後、個々に、又は貯留して(in pools)分析される。研究対象の(studied)分子を発現し、転写が調節されたレポーター(好ましくは、Gag-ルミネッセンスペプチド又はポリペプチド)を含むが、外部から添加されたDNAを含まない対照細胞からの、検出及び定量可能なVLP類の放出が、細胞クローン/外因性DNAを含まないプールから放出されたVLP類と比較される。違いが検出される場合には、この効果は、外部から適用されたDNA構造によってコードされる蛋白質の機能に起因すると考えることができる。この効果は、これらに制限されないが、いくつかの可能性によって説明され得る：

- ペプチド又はポリペプチドは、転写が調節されたレポーター分子を介してレセプターに作用する刺激をもたらす際に使用されるシグナルトランスダクションカスケード、及びその後のVLP内に取り込まれた細胞からの放出に関連する1つ以上の分子と直接相互作用(直接的な蛋白質-蛋白質相互作用)することができる。

- ペプチド又はポリペプチドは、1つ以上の分子を化学的に修飾する(例えば、ホスホリル化(phosphorylation)、ミリスチン化(myristylation)、アセチル化(acetylation)等)ことにより、シグナルトランスダクションカスケードに関する分子の機能に影響を及ぼすことができる。

いくつかの他の説明が可能であり、それらはシグナルトランスダクション経路(pathway)への影響はないが、レポーター遺伝子RNAの翻訳、又は最初のスクリーニングで検出されるであろうVLP類の成熟及び放出を妨げるが、適当な対照を含むことによって、2番目の分析では無視することができる。

【0048】

更なる分析形式では、各分子を活性化するために、エフェクター分子が細胞外培地に添加されない点が異なるが、上記の系が使用され得る。従って、シグナル

トランスダクションカスケード経路を、アゴニストの不存在下で刺激し得る蛋白質をコードする外因性DNA分子を分析することができる。

【0049】

ウイルスの成熟及び放出に影響を及ぼす化合物の検出のための細胞に基づく分析
ウイルス性病原体は、これら絶対的な(obligate)病原体のライフサイクルを邪魔する薬剤を開発するための薬学分野に対する難題を提示し、そのような薬剤は、殆どの場合、宿主細胞に有害な効果を与えずにウイルスに対する高い特異性を示さなければならない。邪魔することができる段階は、主に生体内の複製サイクル及びウイルスの拡散(spread)に制限される。従って、小型分子阻害剤の成長が予想され得るウイルスの成熟及び放出プロセスが行われる。これらのプロセスを分析するために使用される従来技術の分析形式は、比較的時間がかかり、かつビリオンの放出の定量において、病原体自体か、又はそれらの弱毒化された(attenuated)突然変異体を通常含んでいる。VLP法は、uHTSに従う形式で、これらの方法を分析するために、代替の方法を提供する。他のウイルスによってコードされた(virally encoded)蛋白質の不存在下での、様々な異なるウイルスキャプシド蛋白質、前駆体分子、又はそれらの変異体の発現により、数例の(in a number of cases)ウイルスキャプシド構造の成熟、及びその後の未成熟な蛋白質粒子、又はVLP類の、宿主細胞から細胞外培地への放出が起こる。細胞外環境へのVLP類の押し出しを引き起こすプロセスには、血漿膜からの出芽、細胞質又は核膜区画からの出芽、及びその後の宿主細胞のエキソサイトーシス又は溶解による細胞からの放出が含まれる。そのようなキャプシド蛋白質、好ましくはレトロウイルスのGag蛋白質を使用する適用において、その後、細胞内でのGag前駆体蛋白質の発現により、VLP類の形成及び細胞外環境への放出が起こる。更に、細胞内での前駆体Gagレポーター融合分子の発現により、好ましくは共焦点検出技術を用いて定量され得る検出可能なルミネッセンスVLP類の放出がその後起こる。従って、この分析形式は、VLP類の成熟及び細胞外培地への放出を妨げる化合物のスクリーニングに適用され得る。化合物は、例えばGag-レポーター遺伝子生成物を構造的に(constitutively)発現する細胞へ添加され、検出及び定量可能なVLP類の放出は、その化合物によって処理されて

いない対照細胞と比較され、それによりウイルスの成熟及び放出の阻害を評価することができる。

【0050】

細胞表面蛋白質媒介(cell surface protein-mediated)活性の調節物(modulators)の同定のための分析

更に別の態様において、本発明は、細胞表面蛋白質と化合物との相互作用によって生成されるシグナルの細胞内トランスダクションを検出することにより、細胞表面蛋白質媒介活性を調節する化合物を同定する方法を開示する。この方法は、化合物の存在下で第一組換え型細胞において発現されたレポーター遺伝子生成物の量を、化合物の不存在下でのレポーター遺伝子生成物の量、又は第二組換え型細胞におけるレポーター遺伝子生成物の量と比較することを含む。原則として、第一組換え型細胞は、レポーター遺伝子構造を含み、かつ対象となる細胞表面蛋白質を発現する。第二組換え型細胞は、細胞表面蛋白質を発現しないか、又は細胞表面蛋白質を所定のレベルで発現すること以外は、第一組換え型細胞と同一である。レポーター遺伝子構造は、アゴニストと細胞表面蛋白質との相互作用によって生成される細胞内シグナルに応答する転写調節成分、並びに転写シグナル分子をコードするレポーター遺伝子を含み、かつ転写調節成分と効果的に結合している。転写シグナル分子は、好ましくは細胞外環境に放出されるウイルス状粒子を構成し得る。

【0051】

好ましくは、この方法は、化合物の不存在下でのレポーター遺伝子生成物の量と比べるか、又は第二組換え型細胞におけるレポーター遺伝子生成物の量と比べて、化合物の存在下で第一組換え型細胞において発現されるレポーター遺伝子生成物の量に影響を及ぼす化合物を選択することを更に含む。1つの態様では、前記化合物は、前記細胞表面蛋白質のアゴニストであり、別の態様では、前記化合物は、前記細胞表面蛋白質のアンタゴニストである。後者の場合には、この方法は、それと同時に、またはその前に(prior to or simultaneously with)、前記細胞表面蛋白質を活性化させるアゴニストと、組換え型細胞とを接触させた後、レポーター遺伝子生成物の量の違いを比較し、それにより前記翻訳シグナル分子

が発現されることを含む。

【0052】

細胞表面蛋白質は、例えば、細胞表面レセプター、粘着性分子、膜孔、又はイオンチャンネルであり得る。好ましくは、前記検出され得る翻訳シグナル分子は、ルミネッセンスポリペプチド、特に緑色蛍光蛋白質若しくはその突然変異体を更に含むか、又は検出し得る試薬を用いる、その後のラベル化のためのタグとして働く物を更に含むか、又は酵素反応によって適当な読み出しパラメーターをもたらす酵素を更に含む。特に好ましい態様において、転写調節領域は、血清応答成分、環状アデノシンモノホスフェート応答成分、及び細胞内カルシウムイオンレベルに反応する成分からなる群から選ばれる調節成分を少なくとも1つ含む。

【0053】

この分析形式に関して、本発明は、(i)細胞外シグナルによって調節され得る活性を有する細胞表面蛋白質をコードするDNA；及び(ii)前記細胞表面蛋白質によって調節される1つ以上の転写調節成分と効果的に結合しているレポーター遺伝子を含むレポーター遺伝子構造：を含む組換え型細胞をも提供する。レポーター遺伝子は、翻訳シグナル分子をコードする。これらシグナル分子は、好ましくは細胞外培地に放出されるウイルス状粒子を構築し得る。適当な転写調節成分、前記シグナル分子内の検出可能な部分、及び細胞表面蛋白質の種類は、この章の上記段落に開示されている。本発明はまた、これらの組換え型細胞を含む試薬キットを提供する。

【0054】

レセプター - 、又はイオンチャンネル - 媒介活性の調節物

更に別の態様において、本発明は、特に機能的ゲノムに関するアプローチを提供する。

【0055】

レセプター - 、又は膜孔 - 、又はイオンチャンネル媒介活性を調節する物質を、アゴニスト又は物質と、前記レセプター又はイオンチャンネルとの相互作用によって生成されるシグナルの細胞内トランスダクションを検出することによって同定する方法が提供される。前記方法は、

- 前記物質の存在下で組換え型細胞において発現されたレポーター遺伝子生成物の量を、前記物質の不存在下での生成物の量と比較すること

を含む；但し、

- 第一組換え型細胞は、レポーター遺伝子構造を含み、かつレセプター又はイオンチャンネルを発現し；かつ、

- レポーター遺伝子構造は、以下のものを含む：

(a) アゴニストとレセプター又はイオンチャンネルとの相互作用によって生成された細胞内シグナルに応答する転写調節成分；

(b) 翻訳シグナル分子をコードし、かつ転写調節成分と効果的に結合しているレポーター遺伝子；

但し、翻訳シグナル分子は、好ましくは細胞外環境に放出されるVLP類を構築し得る。

【0056】

アゴニストの存在下で組換え型細胞において発現されるレポーター遺伝子生成物の量は、アゴニスト又は異なる物質の不存在下でのレポーター遺伝子生成物の量と比較されることもある。この分析形式を適用してスクリーニングされるべき好ましい物質は、cDNA類、ゲノムDNAフラグメント、mRNA類、ベクター類、ペプチド類及び蛋白質類を含む。前記物質は、cDNA又はcDNA発現ライブラリーであることが特に好ましい。前記細胞に、cDNAを感染させる代わりに、ゲノムDNAフラグメント若しくはmRNAのような他のタイプの核酸によって細胞を形質転換させるか、又はペプチド若しくは蛋白質を細胞に導入することもできる。

【0057】

この分析法により、細胞内のシグナルカスケードを妨げる遺伝子生成物の同定が可能になる。形質転換された細胞系は、特異的プロモーターの制御下で、レポーター構造を発現する。このレポーターに結合したシグナルカスケードが刺激されると、VLP類の放出を観察及び定量することができる。この更なる蛋白質生成物が前記シグナルトランスダクション経路を調節し得るならば、蛋白質生成物を発現し得る、単一又は複数のcDNA分子による、そのような細胞のトランス

フェクションにより、刺激された細胞中のVLP類の放出が影響を受ける。異なる読み出しが予想され得る：

1. アゴニストによって刺激されたシグナルトランスダクションカスケードに関連する成分と、導入されたcDNA生成物との相互作用により、検出され得るVLP類の生成及び放出が阻害(abrogation)される。
2. アゴニストによって刺激されたシグナルカスケードに関連する成分と、導入されたcDNA生成物との相互作用により、検出され得るVLP類の生成及び放出が高められる。
3. アゴニストの不存在下でのシグナルカスケードに関連する成分と、導入されたcDNA生成物との相互作用により、VLP類の生成及び放出が刺激される。

【0058】

更に、導入されたcDNA分子が、異なる供給源、又は異なる処理をされた材料からのもの(例えば、刺激された細胞、及び刺激されていない細胞からのcDNA)である場合、VLP類の放出に関する違いも検出され得る。形質転換された細胞系は、特異的プロモーターの制御下でレポーター構造を発現する。このレポーターに結合したシグナルカスケードが刺激されると、VLP類の放出を観察及び定量することができる。この更なる蛋白質生成物が前記シグナルトランスダクション経路を調節し得るならば、蛋白質生成物を発現し得る、単一の、又は複数のcDNA分子による、そのような細胞のトランスフェクションにより、刺激された細胞中のVLP類の放出が影響を受ける。上記構造を輸送する1つの細胞系は、特異的組織又は刺激された試料からの単一又は複数のcDNAによってトランスフェクトされる。上記構造を輸送する1つの細胞系は、比較されるべき、別の特異的組織又は刺激された試料からの単一又は複数のcDNAによってトランスフェクトされる。様々な条件下(刺激、非刺激、導入、構造的など)での検出され得るVLP類の放出への、導入されたcDNA生成物の影響が、2つの細胞群の間で比較される。更なる用途は、上記で略述した実験から生成されたサブトラクティブ(subtractive)ライブラリーのスクリーニングに関する。

【0059】

更なる態様において、以下のものを含む組換え型細胞が提供される：

- レセプター、膜孔、又はイオンチャンネルをコードするDNA；及び
- 前記レセプター、膜孔、又はイオンチャンネルと、アゴニストとの相互作用によって生成された細胞内シグナルに応答する1つ以上の転写調節成分と効果的に結合しているレポーター遺伝子を含むレポーター遺伝子構造。但し：
 - 前記レポーター遺伝子は、翻訳シグナル分子をコードし、かつ
 - 前記翻訳シグナル分子は、好ましくは細胞外環境へ放出されるウイルス状粒子を構築し得る。

【0060】

更なる態様において、本発明は、これらの組換え型細胞を含む試薬キットも提供する。適当な転写調節成分は、血清応答成分、環状アデノシンモノホスフェート応答成分、及び細胞内カルシウムイオンレベルに応答する成分を含む。翻訳シグナル分子は、GFPのようなルミネッセンスポリペプチド類、酵素類、又は検出し得る試薬を用いる次のラベル化のためのタグとして働く物を含むことが好ましい。

【0061】

結合、競争、及び酵素分析。化合物のVLPへ入る能力を決定するための分析。

更なる態様において、本発明は、多数の化合物をスクリーニングするための、好ましくは均質な分析であって、リガンド/結合ドメイン相互作用、若しくは前記化合物による酵素触媒反応の阻害若しくは刺激の程度を決定するために、又は前記化合物の、ターゲット分子への結合の程度を決定するために行われる分析を提供する。前記化合物の、VLPへ入る能力を決定することもできる。この分析は、試験されるべき前記化合物と、前記リガンド及び前記結合ドメインとの接触、試験されるべき前記化合物と、前記酵素及び前記酵素のための基質との接触、試験されるべき前記化合物と、前記ターゲット分子との接触、並びに前記化合物とウイルス状粒子との接触からなる群から選ばれる段階を含む。結合ドメイン、又は酵素、又はターゲット分子は、上記のいずれかの方法により、ウイルス状粒子に取り込まれるか、又は被包される。1つ以上の前記化合物の阻害、刺激、結合又は導入により、前記分析中に存在する前記ウイルス状粒子と結合するか、若しくは被包された、光学的に検出され得るラベルの量の変化、及び/又は前記ウ

ウイルス状粒子の更なる性質の変化が引き起こされる。個々のVLPに結合するか、又は被包された光学的に検出され得るシグナルの量は、光学的な方法を使用することによって測定される。代わりに、又はそれに加え、VLP類の更なる性質が(例えば電気分野で)測定される。個々のウイルス状粒子に結合しているか、又は被包されている、前記光学的に検出され得るシグナルの前記量と、前記ウイルス状粒子と結合していないか、又は被包されていないラベルによって引き起こされる前記分析におけるバックグラウンドシグナルの量とを比較することによって、障害、刺激、結合又は導入の程度を決定することができる。それに加え、又はその代わりに、研究対象の前記ウイルス状粒子の前記更なる性質と、対照ウイルス状粒子の性質とを比較する段階が行われる。光学的な方法は、共焦点顕微鏡法又は分光法を含むことが好ましい。前記光学的に検出され得るラベルは、蛍光リガンド、又は蛍光基質、又は酵素反応の蛍光生成物であることが好ましく、前記光学的な方法は、蛍光技術、特に、蛍光相関分光法、蛍光相互相関分光法、蛍光強度分布分析、蛍光寿命測定、蛍光異方性測定、蛍光応答エネルギー遷移、又はそれらの組み合わせを含む。前記VLPの更なる性質は、例えば、インピーダンス又は二重電気泳動測定を含む電氣的な方法によって測定され得る。結合ドメイン、又は酵素、又はターゲット分子は、前記VLPの成分への融合によって、特に、対応する上記の章において詳細に説明した、キャプシド又はエンベロープ成分への融合によって、前記ウイルス状粒子に取り込まれるか、又は被包されることができる。しかし、それらは、前記VLP類と、前記結合ドメイン、酵素、又はターゲット分子との間の共有結合ではない物理的な力によっても、取り込み/被包され得る。

【0062】

結合分析の例は、膜結合レセプター分子と、その各リガンドとの間の相互作用の測定である。この分析では、2つの成分間で平衡が達成されたインキュベーション期間後に、結合していない(溶液中)リガンド、及び結合しているリガンドの濃度を決定することによって、天然又は合成由来の過剰のラベルされたりガンドと、低濃度のその各機能的レセプターとの間の相互作用が定量される。均質分析において、結合リガンドと結合していない物(the free from bound ligand)が

、物理的又は化学的方法によってお互いに分離され、それにより結合の程度が算出され得る。この相互作用を妨げる化合物又は分子の添加は、レセプターに結合したラベルされたりガンドの、検出可能な量の減少によって検出され得る。均質な分析形式において、分析の読み出しのために使用される検出系が、リガンド又はリガンド/レセプター複合体の物理的又は化学的性質に基づいて、これらの群をお互いに区別することができるので、結合リガンドと結合していない物は、お互いに分離されない。蛍光相関分光法(FCS)のような単一分子蛍光検出法は、そのような分析形式に理論上適している。これに関連して、(細胞から単離された小囊と比べて)混入蛋白質を含まない脂質エンベロープに取り込まれた特異的な機能的ターゲット分子を輸送するVLP群の調製物は、リガンド結合研究を行うための理想的な試薬を表す。ターゲットは均質であり、その本来の構造及び環境にあるので、レセプターリガンド結合分析のための理想的な材料となる。膜小囊調製物中の、精製されたレセプター又は濃厚レセプターのようなレセプターの分析のために使用される他の材料と比べて、その供給源のいずれも、上記の困難性及び欠点を有するので、機能的取り込み膜レセプターを輸送するVLP類は、いくつかの異なる利点をもたらす：

- ・各粒子の表面上のいくつかのターゲット分子に対する均質材料。
- ・ターゲット分子は、最少量の混入物を含む、濃厚かつ精製された状態で供給されるので、膜調製物において見られる複合体混合物と比べて、バックグラウンドが低減される。
- ・VLP類は、それらを生成する細胞から、容易に採取及び分離される。
- ・それらの合成及び生成の性質(nature)のため、それらは、非常に安定な試薬である。

【0063】

結合分析原理は、その正常な機能が、レセプターによって類型化される(typified)ものではない他のタイプの取り込み膜蛋白質にも適用され得る。本明細書では、小型無機イオン及び複合(complexed)物質の流入及び流出を調節するチャンネルとして機能する多数の取り込み膜蛋白質を、本原理に従って分析することもできる。細胞区画の外又は中の各イオンのポンピング(pumping)に応答し得るチ

チャンネル部と、高い親和性をもって結合するいくつかの小型分子又はペプチドミメティクス(mimetics)が特徴付けられた。従って、リガンドレセプター相互作用について説明したように、ラベルされたリガンドの結合の阻害の定量によって、不均質又は均質な形式で、チャンネルと相互作用する小型分子が再度検出され得る。更に、これらの包まれた粒子の表面上で、そのようなターゲット分子を、それらの正確な構造で、化学的環境において発現するVLP類の調製物は、そのような分析のための最適な試薬となる。

【0064】

より複雑な相互作用パートナーと特異的リガンドとの結合のためのこの原理は、取り込み膜蛋白質として見出されるレセプター又はイオンチャンネルに制限されないが、水溶性環境において、それらの自然な脂質環境から、可溶性機能的蛋白質として単離された、そのような分子にも適用され得る。

更に、この分析原理は、レセプター（例えば核ホルモンレセプター）として機能するか、又は酵素活性を有する、可溶性細胞質又は核蛋白質にも適用可能であり、この場合にも、レセプターのためのラベルされたリガンド、又はラベルされた加水分解され得ない(non-hydrolysable)酵素基質のいずれかを、問題となっている蛋白質と相互作用する化合物を検出するために使用することができる。不均質又は均質な形式での、この相互作用の定量は、実験対象のターゲットと相互作用する化合物を検出することができる分析の基礎を構成する。本明細書では、研究対象のターゲット分子は、包まれているVLP類に特異的に取り込まれることができるので、それにより天然の細胞境界(boundary)である血漿膜によってターゲット分子が取り囲まれる試薬を表す。このターゲットと相互作用する分子（特に、薬学的な関連性を有する小型分子）は、このバリアー、水性環境において精製された成分上で結合分析を使用する場合に直接分析されない面を横切らなければならない。しかし、この分析形式においてVLP類を使用する場合、小型の化合物の、その同系(cognate)レセプターに結合しているリガンド（又は酵素活性をもって相互作用している基質）に対する競争(competing)相互作用を決定することができるだけでなく、血漿膜、天然の生物学的バリアーを横切る性質を決定することもできるので、分析に価値が付加される。

【0065】

VLP固相相互作用

更なる態様において、本発明は、膜結合蛋白質（例えば、取り込み膜レセプター、イオンチャンネル、粘着性分子、又は細孔複合体）と、固相、特にビーズに結合した化合物との間の相互作用の測定に関する。コンビナトリアルケミストリー、特に、固相コンビナトリアルケミストリーの発達により、ターゲット分子と薬学的に関連する小型分子によって被覆されたビーズとの間の相互作用を検出し得る分析に大きな関心が集まっている。しかし、このような分析形式は、未だに主として、相互作用の分析及び定量に要する検出され得るラベル（例えば蛍光ラベル）と結合した、精製された可溶性ターゲット分子の使用に限られている。本特許出願の他の章に記載した理由により、この用途におけるより複雑な取り込み膜蛋白質の使用は、この要求によって妨げられている。脂質エンベロープに取り込まれたこのような取り込み膜蛋白質を提示するVLP類の使用により、以下に記載するような分析の開発が可能となる。対象となるターゲット分子を提示するVLP類は、光学的な方法によってVLP類の検出及び定量を可能にする膜透過性色素によって染色され得る。そのようなVLP類が複数の化学物質によって被覆されたビーズの混合物に添加されると、それらは、潜在的な結合パートナーを表し、平衡までインキュベートされ得て、次いで、ラベルされたVLP分子との相互作用により、その後のビーズの直接的なラベル化によって、結合パートナーが検出され得る。特異的な、好ましくは共焦点的な検出と、単一の積極的な(positive)ビーズ単離法とを組み合わせ、取り込み膜蛋白質と特異的に相互作用する化合物を検出することができる。更なる態様は、ルミネッセンスペプチド又はポリペプチドによるターゲット分子の直接的な融合によって、対象となるターゲット分子が取り込まれることにより、膜透過性色素を使用せずにVLPの直接的な検出及び定量を可能にするVLPの直接ラベル化を含む。この方法の更なる態様は、VLPの特異的なラベル化のために、対象となるターゲット分子を輸送するVLPの表面上で、又はその内部で、反応性チオール基と共有結合する蛍光共役を使用することにより、VLPと上記の各ビーズとの間の相互作用の検出を可能にすることであろう。

【0066】

VLP類に取り込まれたターゲット分子間の相互作用

更に別の態様において、本発明は、少なくとも2つのターゲット分子間の相互作用の阻害又は刺激の程度を決定するために、複数の化合物をスクリーニングするための分析を開示する。前記分析は、第一ウイルス状粒子に取り込まれた第一ターゲット分子の液体懸濁物、及び第二ウイルス状粒子に取り込まれた第二ターゲット分子の液体懸濁物を、複数の容器に添加することを含む。この分析は、前記阻害又は刺激をスクリーニングされるべき複数の化合物を、単独で、又は組み合わせさせて前記複数の容器へ添加すること、並びに、前記ウイルス状粒子に取り込まれた前記ターゲット分子及び前記化合物をインキュベートすることを更に含む。この分析は、前記ウイルス状粒子の少なくとも1つの性質を測定すること、及び1つ以上の前記化合物により、前記ターゲット分子間の前記相互作用の阻害又は刺激の程度を決定することによって分析される。前記ターゲット分子は、前記VLP類のキャプシド若しくはエンベロープ成分への融合によって、又は共有結合ではない上記方法によって、前記ウイルス状粒子に取り込まれることが好ましい。好ましくは、前記VLPの光学的に決定され得る性質は、例えば共焦点顕微鏡法若しくは分光法によって、上記蛍光技術（例えば、蛍光相互相関分光法、蛍光強度分布分析、蛍光寿命測定、蛍光異方性測定、蛍光応答エネルギー遷移、若しくはそれらの組み合わせ）、光散乱によって測定され、また、更なる性質は、インピーダンス測定、二重電気泳動測定などによって測定される。好ましい態様において、前記シグナル分子は、レポーター(reporter entity)、好ましくはルミネッセンスレポーター、特に緑色蛍光蛋白質又はその突然変異体を含む。

【0067】

細胞-細胞相互作用又は細胞マトリックス相互作用分析は、細胞と細胞マトリックス界面との間の相互作用が非常に重要である免疫学及び炎症の分野において、非常に重要である。この分析形式に関連する困難性は、uHTSスクリーニングバックグラウンドにおいて生育可能な(viable)細胞を利用する際の困難性に通常関連する。統計学的な分析及び品質制御の標準化を困難にする分析中の変化のため、そのような実施(undertaking)は、非常に時間と費用がかかる。このアプ

ローチは系の親和性を通常低下させるにもかかわらず、相互作用パートナーを過剰発現する組換え型細胞群から精製された成分を使用することができる。この親和性の低下には（もちろん、生理的な状態を反映していないが）、例えば、それらの天然の環境（例えば脂質二分子層）から成分を除去した後の構造的な変化などの、いくつかの原因がある。いくつかの場合には、そのような結合パートナー（ターゲット分子）は、単一分子ではないが、不可能でなければ、それらの精製を困難にする、相同性又は非相同性の成分の複合体である。実現可能な場合、膜調製物のような代替りの材料の使用は、分析の設計及び検出に制限を課す。VLP法の使用は、これらの問題のいくつかを軽減するので、このような分析の設計及び実施を進歩させる。原則として、1つのターゲット分子又は（相同性若しくは非相同性成分のいずれかからなる）ターゲット複合体を発現する1つの群は、（相同性若しくは非相同性成分のいずれかからなる）相互作用パートナーターゲット分子を発現するVLP類の第二群と共にインキュベートされ、相互作用は、平衡まで進行でき、その後相互作用VLP類の凝集体が生成されるであろう。これらの群の物理的特性（例えば光散乱性）、又は相互に区別され得る2つの異なるVLP群に取り込まれたレポーター分子の特異的設計のいずれかによって単一のVLP類とVLP類の凝集体とを区別することができる検出技術の使用により、この混合物中に見られる異なる群が、高感度で検出及び定量される。この原理は、異なるVLP群上で相互作用パートナーを妨げる化合物の添加が、対照と比べた、凝集したVLP群の割合に影響を及ぼすであろうuHTSに適用され得る分析形式の基礎を構成する。

【0068】

細胞内蛋白質 - 蛋白質相互作用

新たな薬剤の探求において非常に興味深い更なる分析形式は、小型分子によって蛋白質 - 蛋白質相互作用に影響を及ぼすことである。これは、多くの方法で用いられており、そのうちの1つは、水性環境下で精製された成分の見出しを付けた(rubric)リガンド - レセプター相互作用において既述されている。しかし、上記分析において単離される化合物は、通常細胞系において試験及び評価されなければならないので、蛋白質 - 蛋白質相互作用の分析のための、より生理的な環境

は非常に有利である。そのような細胞系は、薬剤になり得る見込みのあるものとして更に開発されるべき多数の潜在的な調節物が結果的に不足(failure)する、より単純な結合分析と比べて多くの難題を示す。

【0069】

更に、そのような制限の1つは、そのような化合物の、血漿膜によって表される細胞の天然の境界を横切る能力である。系の複雑さのため、真核生物細胞における蛋白質-蛋白質相互作用の分析は、uHTSレベルで制限され、かつ、薬学的な薬剤スクリーニングでは用途が少なく、蛋白質-蛋白質相互作用に関連する蛋白質パートナーを同定及びクローン化するための分析系として、ツーハイブリッド系(two-hybrid-system)が広範に使用される酵母中でのみ注目された。この系は、上記の用途のための方法として非常に有用であるが、いくつかの制限を受ける。第一に、分析は、いくつかの態様では実験をより容易にする酵母中で行われるが、もちろん特定の生化学的反応は、高度な(higher)真核生物中のものとは異なるので、ある程度余分なものが導入される。第二に、相互作用パートナーは核に移されなければならず、そのため、いくつかの場合には、各ターゲットのフラグメント又はドメインの下各蛋白質の分析を低下させ得る。これは、系の親和性及び特異性を低下させることもあり、その結果、分析からの情報が得られなくなる。最後に、この系は、誤った陽性(false positive)の割合の増加を引き起こす高レベルのバックグラウンドにも悩まされる。この分析形式において、VLP法は、上記の方法にいくつかの利点をもたらす。この分析は、シグナル分子が、2つのアミノ酸配列を含む、以下の形式に基づいている：アミノ酸配列の1つは、好ましくは細胞外環境に放出され、かつ選択された第一相互作用分子に融合されるVLP類を構築する能力を、シグナル分子に与える。選択されたターゲット分子は、2つのアミノ酸配列も含む：そのうちの1つは、第一相互作用分子と特異的に相互作用し、他方はそれに融合されるレポーター分子である。このレポーター分子は、VLPへの取り込み後、不均質又は均質分析のいずれかにおいて検出及び定量され得る。同じ宿主細胞におけるこれら2つの融合蛋白質の発現により、お互いに特異的に相互作用する2つのキメラ(chimaeric)分子が合成される。この場合、シグナル-ターゲットからなる複合体が形成されるであろう。

よって、2つの機能的な物、シグナル及びターゲットが一緒にもたらされ、その結果、その後細胞外環境へ放出されるVLP類の形成を誘発し、かつVLP類へ取り込まれるシグナル分子の性質により、好ましくは放出されるVLP類へのレポーターの取り込みが起こる。そのため、これらの成分を発現する細胞は、対象となる各蛋白質分子対による蛋白質-蛋白質相互作用の分析のために使用され得る分析形式の基礎を構成する。対照実験では、ある期間中の検出され得るVLP類の放出が定量され、血漿膜を横切ること、及び細胞内区画に局在化された(localised)各蛋白質分子の特異的蛋白質-蛋白質相互作用を調節することが潜在的に可能な化合物によって処理される細胞培養液からの検出され得るVLP類と比較される。従って、この分析によって、細胞外で測定される直接的な読み出しが得られるが、細胞内の生理的な環境において起こる相互作用が反映される。

【0070】

より一般的な表現(terms)をすると、本発明は、細胞内蛋白質-蛋白質相互作用を決定するための分析を提供する。前記分析は、以下のことを含む：

(a)(i)第一及び第二アミノ酸配列を含むターゲット分子、後者は、好ましくはルミネッセンスレポーターである、および(ii)第一及び第二アミノ酸配列を含むシグナル分子(後者は、好ましくは細胞外環境へ放出されるVLP類を構築する能力をシグナル分子に与える)の組換え型細胞における共発現；

(b)前記VLP類内での前記レポーターの存在及び不存在の測定；並びにそれによる

(c)ターゲットの第一アミノ酸配列とシグナル分子の第一アミノ酸配列との間の蛋白質-蛋白質相互作用の程度の決定。

【0071】

より一般的な表現では、本発明は、細胞内蛋白質-蛋白質相互作用の決定のための分析を提供する。前記分析は、少なくとも2つの物からなる第一融合蛋白質をコードする第一DNA、並びに少なくとも2つの物からなる第二融合蛋白質をコードする第二DNAを含む組換え型細胞の供給を含む。但し、第一融合蛋白質を構成する第一の物は、ウイルス状粒子の形成、及び好ましくは細胞外環境への放出を誘発し得る分子であり、第二の物は、研究対象の蛋白質であり、第二融合

蛋白質を構成する第一の物は、好ましくはルミネッセンスレポーターであり、第二の物は、研究対象のもう1つの蛋白質である。更なる変形では、組換え型細胞は、ウイルス状粒子の形成、及び好ましくは細胞外環境への放出を誘発し得る分子をコードする第一DNA；研究対象の蛋白質をコードする第二DNA、但し、研究対象の前記分子及び前記蛋白質はいずれも、お互いに共有結合せずに機能的に働くように適合される；少なくとも2つの物からなる融合蛋白質をコードする第三DNAを含む。但し、第三DNAを構成する第一の物は、好ましくはルミネッセンスレポーターであり、第二の物は、研究対象のもう1つの蛋白質である。別の変形では、組換え型細胞は、少なくとも2つの物からなる融合蛋白質をコードする第一DNA、但し、融合蛋白質を構成する第一の物は、ウイルス状粒子の形成及び好ましくは細胞外環境への放出を誘発し得る分子であり、第二の物は、研究対象の蛋白質である；好ましくはルミネッセンスレポーターをコードする第二DNA；及び研究対象のもう1つの蛋白質をコードする第三DNAを含む。但し、前記好ましくはルミネッセンスレポーター及び前記もう1つの蛋白質はいずれも、お互いに共有結合せずに機能的に働くように適合される。最後の変形では、組換え型細胞は、ウイルス状粒子の形成及び好ましくは細胞外環境への放出を誘発し得る分子をコードする第一DNA；研究対象の蛋白質をコードする第二DNA、但し、前記分子及び前記蛋白質はいずれも、お互いに共有結合せずに機能的に働くように適合される；好ましくはルミネッセンスレポーターをコードする第三DNA；及び研究対象のもう1つの蛋白質をコードする第四DNAを含む。但し、前記好ましくはルミネッセンスレポーター及び前記もう1つの蛋白質はいずれも、お互いに共有結合せずに機能的に働くように適合される。この分析では、これら成分が発現され、好ましくは細胞外環境へ放出される前記ウイルス状粒子内での前記好ましくはルミネッセンスレポーターの存在及び不存在を測定することにより、蛋白質-蛋白質相互作用の程度が決定される。この分析は、好ましくは均質である。前記ウイルス状粒子内の好ましくはルミネッセンスレポーターの存在又は不存在は、共焦点顕微鏡法又は分光法によって、特に、蛍光相関分光法、蛍光相互相関分光法、蛍光強度分布分析、蛍光寿命測定、蛍光異方性測定、蛍光応答エネルギー遷移、又はそれらの組み合わせのような蛍光技術の使用によ

って測定されることが好ましい。

【0072】

好ましくは、この分析原理は、前記蛋白質 - 蛋白質相互作用を妨げるそれらの能力がスクリーニングされるべき化合物 / 物質と、前記組換え型細胞との接触を含む。スクリーニングされるべき化合物 / 物質は、cDNA発現ライブラリー類、ゲノムDNAフラグメント類、mRNA類、ペプチド類、蛋白質類及び低分子量物質類を含む。好ましい態様において、この分析法は、細胞内の蛋白質 - 蛋白質相互作用を阻害する遺伝子生成物の同定のために使用され得る。cDNAライブラリーを添加する前に、形質転換された細胞が、上記構造を発現する。これらの蛋白質の相互作用により、検出され得るVLP類が放出される。第三蛋白質生成物を発現し得る単一又は多数のcDNA分子による細胞のトランスフェクトによって、更なる蛋白質生成物は、前記第一又は第二蛋白質分子の1つと相互作用し得る場合、検出され得るVLP類の放出に影響を及ぼすであろう。この方法では、第一及び第二蛋白質分子の間の、この相互作用に影響し得る分子が同定され得る。これら分子は、第一及び第二蛋白質分子の間の結合のみを妨げることもあり、又は前記第一若しくは第二蛋白質分子のための新たな結合パートナーをも構成することもある。このモデルには、いくつかの仮定が含まれる：

a) 導入されたcDNAは、レポーター分子に融合された蛋白質分子と相互作用する蛋白質をコードし、それによりシグナル融合物とレポーター融合物との間の相互作用を阻害する。その結果、レポーター分子を輸送しないVLP類が放出される。それにもかかわらず、これらVLP類は、レポーター分子を輸送するVLP類と区別され得る。

b) 導入されたcDNAは、シグナル分子に融合された蛋白質分子と相互作用する蛋白質をコードし、それによりレポーター融合物とシグナル融合物との間の相互作用を阻害する。その結果、レポーター分子を輸送しないが前記cDNAの導入された遺伝子生成物を被包するVLP類が放出される。その存在又は活性は、放出されたVLP類の集合において直接分析され得る。これらVLP類も、レポーター分子を輸送するVLP類から区別され得る。

c) 導入されたcDNA生成物と、シグナル又はレポーター融合生成物との間に

は相互作用がない。よって、検出され得るレポーターを輸送するVLP類の放出は妨げられない。

cDNAによる前記細胞のトランスフェクトの代わりに、例えばゲノムDNAフラグメント類若しくはmRNA類のような他のタイプの核酸を形質転換すること、又はペプチド類若しくは蛋白質類を細胞内に導入することも可能である。

【0073】

輸送(transport) / トランスロケーションポリペプチド類における分析

VLP法の更なる用途は、蛋白質を血漿膜へシグナル化し得る配列の同定を含む。そのような配列は、インビトロでの培養された細胞の細胞外培地内の細胞からのポリペプチド分子の分泌、又はインビボでの蛋白質の分泌に应答し得る特異的シグナル配列を含み得る。この用途では、特異的シグナル蛋白質(特に、レトロウイルスGag蛋白質)の突然変異体が使用される。その蛋白質は、宿主細胞において合成されるが、それが、VLP類の形成及び放出を引き起こす場所である血漿膜へ蛋白質を移す能力が欠如している。この欠如を引き起こすGag蛋白質における突然変異体は、ペプチド鎖の第2位にあるグリシン残基によってコードされることが好ましく、かつメチオニン開始コドンと隣り合っている。この用途では、cDNA分子の5'末端から得られたDNA配列が、標準的な分子生物学的な方法を用いて、欠乏(defective) gag 遺伝子へ融合される。これらの構造は、その後細胞へトランスフェクトされ、正しいリーディングフレーム(reading frame)で融合が起こると、添加された5'配列は、固有の蛋白質の血漿膜へのトランスロケーションに应答し得る配列を有する分泌蛋白質をコードするか、又は本当にcDNAによってコードされる固有の蛋白質自体が取り込み膜蛋白質であると、突然変異Gag蛋白質の欠乏(defect)が軽減されるであろう。従って、この助け(rescue)の結果、欠乏Gag蛋白質は、血漿膜へ輸送され、そこで、VLP類の形成及びその後の細胞外培地への放出を引き起こすであろう。更なる態様において、Gag蛋白質が、(ルミネッセンス蛋白質のように、)そのC末端にレポーターポリペプチド融合物を含むように修飾されると、この分子は、VLPに被包され、それにより放出されたVLPの効率的な検出が可能になるであろう。

【0074】

その結果、細胞内輸送ポリペプチド又は膜結合トランスロケーションポリペプチドをコードする核酸配列を同定するための分析が提供される。前記分析は、以下のことを含む：

(a) 第一及び第二アミノ酸配列を含む融合蛋白質をコードするDNAを含む組換え型蛋白質の供給、但し、前記第一アミノ酸配列は、VLP類を構築する能力を融合蛋白質に与え、かつ、その能力を細胞膜へ輸送されるべき融合蛋白質へは与えず、及び/又は、前記第一アミノ酸配列は、前記細胞膜を通る出芽プロセスによって細胞外環境へ放出される能力をVLP類に与えず、かつ、前記第二アミノ酸配列は、研究対象のポリペプチドである；

(b) 前記融合蛋白質の発現；

(c) 前記細胞外環境でのVLP類の存在又は不存在の測定；並びにそれによる

(d) 細胞内輸送ポリペプチド又は膜結合トランスロケーションポリペプチドをコードするDNA配列の同定。

【0075】

好ましくは、DNA分子のライブラリーは、複数の組換え型細胞においてスクリーニングされる。第一アミノ酸配列は、前記第二アミノ酸配列のC末端と共有結合していることが好ましい。この融合蛋白質は、前記第一アミノ酸配列のC末端と共有結合しているルミネッセンスレポーターを含むことが好ましい。レポーターは、例えばGFP又はその突然変異体である。第一アミノ酸配列は、ウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質をコードする突然変異体遺伝子によって、又はウイルスキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体をコードする突然変異体遺伝子によってコードされることが好ましい。しかし、その代わりに、それは、VLPのキャプシド若しくはエンベロープ蛋白質をコードする突然変異体遺伝子によって、又は、前記キャプシド若しくはエンベロープ蛋白質の前駆体をコードする突然変異体遺伝子によってコードされることもある。好ましくは、前記第一アミノ酸配列は、レトロウイルスのgag-遺伝子の突然変異体によってコードされる構造蛋白質である。この場合、突然変異体は、好ましくはシグナル分子のポリペプチド鎖における特異的位置での特異的蛋白質の置換から得ら

れる。好ましくは、開始コドンメチオニンの2つ後の位置が、ミリスチン化によって修飾され得ないアミノ酸をコードするいずれかの残基に変えられる。

【0076】

また、前記分析は、好ましくは均質である。もう一度、前記細胞外環境でのウイルス状粒子の存在又は不存在が、例えば光学的方法、好ましくは共焦点顕微鏡法又は分光法によって測定される。特に、前記細胞外環境でのウイルス状粒子の存在又は不存在は、蛍光技術、特に、蛍光相関分光法、蛍光相互相関分光法、蛍光強度分析、蛍光寿命測定、蛍光異方性測定、蛍光応答エネルギー遷移、又はそれらの組み合わせの使用によって測定される。

【0077】

細胞のシグナル経路又は生理的な状態の調節物。更なる機能的ゲノム態様。

多数の疾患又は生理的な状態は、特定の分子及びそれらの濃度、又は代理(surrogate)マーカーとしてのそのような分子の相互作用に反映される、良好に規定された(well defined)表現型に関連する。これらのマーカーは、そのようなシグナルカスケード又はシグナルネットワークにおける上流又は下流の、様々な他の更なる濃度又は相互作用の分子のための代理としても機能することができる。上記のように、これら分子又は分子の相互作用は、薬学的な、又はその他の生物活性を有する、阻害(interfering)分子の発見のための分子ターゲットであると考えられ得る。そのような阻害分子は、低分子量化合物、薬学的蛋白質、又は相互作用細胞若しくは形質転換遺伝子に基づく分子でもある。それらは、新たな対象物(hits)、手がかり(leads)、若しくは薬剤のための、又は天然のアゴニスト若しくはアンタゴニスト媒介物を同定するためのものになり得ると考えられ得る。

【0078】

マーカー分子、又はマーカー分子の相互作用、又はこれらマーカー分子の濃度変化若しくは相互作用の変化は、特に、従来知られていなかった生物学的機能を有する新しい遺伝子の活性を同定するために用いることができる。未知の新規遺伝子又は遺伝子生成物の生物学的機能を容易に同定するための道具は、新規遺伝子の生物学的な役割及び薬剤ターゲット又は薬剤自体としてのそれらの可能性を調べるための、いわゆる機能的ゲノム用途において、最も重要である。遺伝的材

料又は細胞内の遺伝子由来の生成物が、例えばそのようなマーカー分子の上流で、これら分子又はそのような分子の相互作用に影響を及ぼすように作用し得る場合に、そのようなアプローチが適用され得る。一時的又は安定的な形質転換細胞の大きな配列に適用され得る特徴的な細胞に基づく生理的な終点(endpoints)のための確固たる(robust)読み出し技術は、孤立遺伝子機能を、独立に、又はそれらのより大きな配列のために見出すために最も有利である。孤立遺伝子は、mRNA類の示差表示分析(differential display analysis)又はゲノムシーケンシング(sequencing)によってしばしば生成される。それらは、発現クローンのコンプリートバンク(complete bank)ともなり得る。

【0079】

ヒトゲノムのシーケンシングのようなマスシーケンシング(mass sequencing)の結果、孤立遺伝子は、それらの生成物が細胞内の特定のシグナル経路のために重要であるか否かを試験される必要がある。従って、例えば、いくらかの生理的な終点を説明するための、アポトシス(apoptosis)の誘発、又は分化(differentiation)因子としての表面抗原の分泌、又はアルツハイマー病原体のための指標としてのA_β42-ペプチドの分泌、又はストレス遺伝子若しくは毒性の指標の誘発であり得る生物学的シグナルの終点をVLP類が示すならば、細胞内へ移した後の未知の遺伝子は、それらがそのような生物学的な終点に影響を及ぼすか否かを明らかにされ得る。未知の遺伝子においてそのような情報を生み出すものは、機能的ゲノムであると考えられる。

【0080】

生物活性化合物との細胞の相互作用の結果、組換え型細胞から得られる検出され得るVLP類の上記生成又は変更(modification)は、1つ以上の遺伝的成分若しくはそれらのアンチセンス生成物の影響、又はそのような細胞若しくは細胞群による取り込み後の蛋白質若しくは蛋白質結合物(protein binding entity)の影響を示すためのシグナルとして好ましくは適用され得る。ペプチド若しくは蛋白質、若しくはセンス若しくはアンチセンスRNAのような遺伝子若しくは遺伝子生成物、又はPNA類若しくは中和(neutralizing)抗体のような、対応して反応する分子は、適当なベクター系による感染、細胞輸送メカニズムの使用、DNA

形質転換、結合又は注入のような、様々な周知の方法によって、細胞内部へ輸送され得る。

【0081】

mRNA、処理されたmRNA、部分的なRNA配列若しくはアンチセンスDNA若しくはRNA配列のような切形及び修飾型RNA、PNA若しくは蛋白質若しくはポリペプチドのような配列と相互作用するポリマー又はそれらの修飾型のような遺伝子材料又は遺伝子由来の生成物を導入するための効率的な技術により、機能的ゲノムのためのそのようなアプローチが可能になる。ヨーロッパ特許出願96 939 933.6、97 953 804.8、97 952 938.5、又は国際特許出願PCT/EP 97/07218、PCT/EP 98/08370、PCT/EP 99/02380、PCT/EP 99/04469及びPCT/EP 99/04470 (これらの内容は、本明細書に開示として援用される)に記載の、効率的な小型化形質転換技術、核酸の金結合導入(gold associated introduction of nucleic acids)、受精した卵母細胞におけるmRNAの顕微注射、組換え型ウイルスのような伝染性試薬による細胞の感染技術、又はエンドサイトーシス媒介(endocytotically mediated)取り込み、又は選択的及び/若しくは反応性抗体若しくはペプチドバインダーのような蛋白質レベルで遺伝的機能を特異的に破壊するための試薬の取り込み、並びに単一細胞及び小型細胞群の処理技術を、本明細書に記載されているような分析技術と組み合わせると、機能的な未知の遺伝的材料又は遺伝子由来の生成物の効果を機能的に解読することが可能になる。個々の、又は並行して行われた実験において、そのような遺伝的材料、又は遺伝子由来の生成物、又は蛋白質レベルのノックアウト(knock-out)試薬が、単一細胞又は細胞群に導入される。各遺伝的材料又は遺伝子由来の生成物が、細胞シグナル経路への応答として検出され得るVLPシグナルを誘発し得るならば、そのような機能が、そのような遺伝的材料又は遺伝子由来の生成物に与えられ得る。

【0082】

そのコードされた蛋白質、例えばプロテアーゼ、キナーゼ又はホスファターゼの機能によって、新たな遺伝的情報が、しばしば同定され得る。また、組織のタイプ及び発現の生理的な条件に関する情報がわかることもある。しかし、これは、そのようなターゲットを実証するために十分な情報ではない。本発明による技

術は、疾患の治療のための、又は、例えば農産物の設計(crop design)においてその経済的価値を高めるために、他の細胞の性質を妨げるための新規分子ターゲットの発見に重要な道具である。

【0083】

機能的ゲノム及び薬剤スクリーニングに関して、本発明による技術はまた、そのようなシグナル経路の構成要素(members)に影響を及ぼすことにより、シグナル経路及び/又は細胞の生理的な状態を特異的に調節する物質を同定するための方法を開示する。前記方法は、前記物質の存在下で、組換え型細胞において発現されたレポーター遺伝子生成物の量及び/又は性質を、前記物質の不存在下での生成物の量及び/又は性質と比較することを含む；

但し、

- 前記細胞は、前記シグナル経路のマーカ―又は代理マーカ―を含み、かつ、
- 前記レポーター遺伝子生成物の生成及び/又は性質、又は細胞からのその放出は、前記マーカ―若しくは代理マーカ―の性質及び/若しくは量、又は前記マーカ―若しくは代理マーカ―によって生成された細胞内シグナルに応答し、かつ、
- 前記レポーター遺伝子生成物は、(i)シグナル分子、及び任意に(ii)検出可能な部分を含む。但し、前記シグナル分子は、好ましくは細胞外培地へ放出されるウイルス状粒子を構築し得る。

【0084】

レポーター遺伝子生成物は、前記マーカ―若しくは代理マーカ―の性質及び/若しくは濃度、又は前記マーカ―若しくは代理マーカ―によって生成された細胞外シグナルに応答する転写調節成分を含むレポーター遺伝子構造によってコードされることが特に好ましい。好ましくは、転写調節成分は、血清応答成分、環状アデノシンモノホスフェート応答成分、及び細胞内カルシウムイオンレベルに応答する成分からなる群から選ばれる少なくとも1つの調節成分を含む。

【0085】

好ましい態様において、前記物質は、低分子量化合物類、核酸類、ペプチド類/蛋白質類、又はPNA類からなる群から選ばれる。核酸は、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、アンチセンス配列、又は前記核酸のフラグメント若しくは修

飾物からなる群から選ばれることもある。前記蛋白質は、好ましくは抗体である。

【0086】

本発明によるVLP技術の他の用途は、新規遺伝子の発現、又は細胞系における手がかりとなる化合物(lead compound)若しくは他の分子の活性の結果、若しくは所定の調節分子、遺伝子、アンチセンス分子若しくはmRNA若しくは蛋白質レベルで作用する選択的試薬による取り込みによる細胞系の形質転換工程の結果、新規遺伝子から得られる後転写シグナルの処理の誘発の研究である。1つの可能性は、そのような遺伝子の活性化又は不活性化後に、VLP類において検出され得るシグナルを発現する融合蛋白質を含む細胞の発現ライブラリーの使用である。特異的な刺激の作用により共発現したすべての遺伝子を観察するための直接的な方法は、シグナル鎖内での選択的な上流介入(upstream intervention)によって特定の生物学的機能を選択的に活性化するための更なるターゲットとなり得る物を選ぶために行うことが重要である。

【0087】

生理的な終点は、初期のADME/tox分析に記載されている試験のような、生物学的安全性及び生物学的利用能試験において試験されるストレス応答でもあり得る。

【0088】

本発明によって生成されたVLP類は、例えばイオンチャンネル又はイオンチャンネルの成分の機能的分析のためにも使用され得る。例えば、グルタメートレセプターは、Fura色素のようなCa指示色素を添加されたVLP類の膜に配置され得て、かつ遊離Ca²⁺の流入が、アンタゴニスト又はアゴニストの存在又は不存在下で観察され得る。

【0089】

VLPに基づく孤立レセプター分析

本発明によれば、VLP技術はまた、天然のリガンドが知られていない場合に必要であるGPCR類の特異的分子タグ(tagging)のための技術(この技術の詳細は、WO 98/39660に開示されている；この内容は、本明細書に開示として援用

される)と組み合わせで適用され得る。推定上のリガンド又は合成されたりガンドのいずれかとの相互作用において、GPCRは、その構造を変化させ、その結果、その後特異的色素と反応し得る反応性チオール基が露出(exposure)される。このリガンド誘発(ligand-induced)応答は、アゴニスト又はアンタゴニストのいずれかとしてレセプターを活性化するか、又は調節する化合物のスクリーニングのために使用され得る。このコンペティター(competitor)を含まない分析技術の用途には、以下のものが含まれる：

- ・リガンドライブラリーからの孤立レセプターのためのアゴニストの同定
- ・推定上のリガンドのためのレセプターの存在の同定
- ・アゴニストとアンタゴニストとの区別
- ・アゴニスト誘発ラベル化の阻害によるアンタゴニスト(アンチレセプター又はアンチアンタゴニスト)の検出

【0090】

本発明の更なる態様

本発明によるVLP技術により、固有の細胞環境を提供するが、細胞分析の落とし穴(pitfalls)を防ぐ、細胞状粒子に基づく独特な分析系が開発された。細胞から放出されたVLP類は、例えば、細胞膜に取り込まれた機能的GPCR類を含む。小型でかなり均質な粒子であり、個々の分子と同様の挙動を示すVLP類は、好ましくは共焦点単一分子検出プラットフォーム(platforms)に生物学的に完全に匹敵する。1つのVLPは、特異的GPCRのようなターゲット分子を100個まで運び、それにより各ターゲットの同時濃縮化(enrichment)及び読み出しの増幅が行われる。VLP類は、ターゲットの一段階生成、濃縮及び精製のための手段であり、安定的な貯蔵系としても機能する。VLP技術により、細胞に基づく分析は、前例のないスピードでスクリーニングに適用される。可溶性レセプター又は生化学的分析によって典型的に達成されるスピードと比較され得るこのスピードは、得られるデータの確実性(robustness)及び精度の改善と両立される。

【0091】

本発明によるVLP分析技術の利点は以下の通りである：

- ・カセット系(cassette-based)分析装置 迅速な分析の開発
- ・高濃度のターゲット分子 読み出し強度の増大
- ・選択的なターゲットの取り込み/被包 低バックグラウンド&高精度
- ・固有の細胞分析環境 GPCRのようなトランスメンブランレセプターの機能的分析
- ・誘発可能なターゲット - VLP精製 所望のターゲット
- ・ターゲット生成、一段階の濃縮及び精製 迅速かつ簡便な分析法
- ・均質な分析系 混合 - 及び - 測定法
- ・高感度 広い動的範囲(large dynamic range)
- ・データポイント当たりの代表的な細胞群の平均化 陽性/陰性の間違いの低下
- ・小型化された分析形式 貴重な化合物及び試薬の節約(save)
- ・ターゲットのための安定的な貯蔵系 再スクリーニングの容易性(easy re-screenability)
- ・共焦点検出技術、好ましくは蛍光技術の適用 高性能(high performance)スクリーニング

【0092】

この技術は、細胞内又は各細胞培養培地中の別の低濃度の蛋白質を生理的に濃縮し、同時に別の非常に複雑なマトリックスからの他の細胞成分と比べて、対象となる特定のタイプの分子を大きさの順に濃厚にする能力を有する。対象となる蛋白質が、真核生物細胞当たり1000個複製されるならば、約1 p lの細胞容量内のそれらの各濃度は、約1 n Mである。培地内の細胞密度が1 μ l当たり1000個と高密度であると、全試料内の濃度は約1 p Mである。しかし、そのような蛋白質が直径100 nmの粒子上で1粒子当たり約100個の複製数で発現されると、それらの局部的濃度は、約1 mMに増加する。エキソサイトーシス、溶解、出芽、又は関連するメカニズムによって培地から放出されたVLP類は、容易に10 p Mに濃縮することができる。これは、ちょうど対象となる蛋白質の細胞内の生理的濃度が約10 n Mであることを意味する。本発明による技術によって、GPCR類のようなターゲット分子を、表面上又は均質なVLP類内で濃縮することができ、その結果、読み出し技術(例えば共焦点蛍光測定)に関する

シグナルが増大される。

【0093】

この方法は、プロデューサー細胞中の、イオンチャンネルのような細胞毒を有する分子、又は、凝集、変性若しくは沈殿する傾向が強い分子を提示するためにも使用され得る。合成された生成物は、連続的に細胞から取り出されるので、細胞に有毒なレベルまで蓄積されない。

【0094】

前記VLP類の連続的な、又は誘発された生成により、長時間に亘る細胞のインビトロ培養の操作性(run kinetic)分析が可能となる。

【0095】

VLP試薬又は薬剤は、測定できるほどの生物学的活性の損失なく、長時間に亘り容易かつ都合よく貯蔵することができる。

【0096】

本発明により、抗体生成細胞の選択、並びに抗体及びFab生成VLP類の調製が可能となる。

【0097】

この系は、シグナルトランスダクション経路における調節された蛋白質/蛋白質相互作用の研究に適用され得る。シグナルトランスダクション経路は、治療的相互作用のためのターゲットであると考えられ得る選択的な蛋白質/蛋白質相互作用によってしばしば調節され、それにより、相互作用の親和性は、

- 蛋白質誘発
- 選択的なプロテアーゼ切断 / 異なる切断
- mRNA処理 / 成熟
- ホスホリル化 / 脱ホスホリル化
- 電気生理学的調節
- ミリスチン化、グリコシル化、及び他の修飾

によって調節される。

【0098】

蛋白質/蛋白質相互作用の範囲が大きい場合があるので、細胞内蛋白質/蛋白質

質相互作用は介在することが困難であるのに対し、1つの相互作用パートナーを適当に組織及び構成させる調節段階は、例えばキナーゼ阻害剤によって、効果的な治療的介在を良好に受け得る。

【0099】

ここで記載した方法は、細胞内蛋白質/蛋白質相互作用の適当な読み出しを報告する細胞に基づく機能的分析系に関する。生理的条件下の効果的な蛋白質/蛋白質相互作用は、VLP類によって示される。1つの相互作用パートナーは、例えば本発明の技術によって、Gag-シグナル蛋白質に結合する。恐らく相互作用している蛋白質が発現され、検出可能なマーカー、例えば蛍光蛋白質又はペプチドへ直接融合し、又はそれらと共有結合せずに細胞内でラベルされる。相互作用パートナーの両方又は一方が、上記の調節修飾系によって適当に処理されると、両蛋白質は、生理的に相互作用し、細胞に包まれ、そしてそこから取り出されるであろう。VLP類のラベルの分布、又はラベルされたか、又はされていないVLP類の割合が、修飾細胞系の機能的状態を報告するであろう。この形式の検出は、シグナルが調節の効果を実線的に(linearly)報告し、かつ培地内にVLPが放出された状態を“凍結する”という利点を有する。

【0100】

この検出系の変形は、被包されるであろう、分泌された蛋白質のための処理段階の検出に適用され得る。そのような検出系のための一例は、2つの異なるタイプのセクレターゼ(secretase)活性によって生成されるA₄₀及びA₄₂のような、C末端で異なる処理をされたペプチドの分泌に関する。両ペプチドは、外膜レセプターについて記載したような修飾されたシグナル配列とN末端で結合するか、又はシグナル配列と結合している蛋白質が有する細胞外C末端と結合することができる。A₄₀ペプチドの2つの異なるC末端を認識する、異なるラベル化を受けた抗体によって、放出されたVLP類を、両セクレターゼ活性の異なる活性を測定するために分析することができる。

【0101】

以下の図面は、本明細書の一部をなし、本発明の特定の態様を更に示すために含まれている。本発明は、これら図面の1つ以上を、ここで示される特異的態様

の詳細な説明と組み合わせて参照することにより更に理解され得る。

【0102】

図1は、宿主細胞からのVLP出芽の原理を図示したものである。レトロウイルスの構築は、細胞血漿膜における出芽プロセスによって行われる。数種のレトロウイルスによる研究は、他のウイルス成分の不存在下で発現されたGagポリペプチドが、この図に示すように、細胞表面での粒子形成及び出芽に対して自給自足であることを示した。Gag前駆体のアミノ末端領域は、細胞表面への輸送及びウイルス構築に必要な膜結合のためのターゲティング(targeting)細胞であることが報告された。

【0103】

図2は、(膜に結合していない)ターゲット分子のVLP被包の原理を図示したものである。VLP類のカプシド内の各ターゲット蛋白質の取り込みの特異性は、シグナル蛋白質(Gag)のC末端と共有結合した分子ペプチドタグと、対象となるターゲットと結合した相補性的の特異的ペプチドタグとの強い特異的相互作用の、又は対象となるターゲット蛋白質/ペプチドとGag蛋白質との直接的な共有結合による融合による結果である。Gag-タグ融合蛋白質は、分子内又はN若しくはC末端における特異的ペプチドタグも運ぶ、対象となる各分子と共に、細胞系において共発現される。各宿主細胞中での修飾されたGag蛋白質の発現の結果、Gag蛋白質のN末端部に存在するシグナルにより、血漿膜にGag蛋白質が蓄積される。血漿膜にこの蛋白質が高濃度で存在することにより、VLP類が細胞外環境へ放出される出芽プロセスが行われる。相補性タグを運ぶターゲット蛋白質が、同じ細胞において発現され、細胞内区画で濃縮されると、タグされたGag蛋白質との特異的相互作用により、血漿膜へのターゲットの共輸送が起こり、次いで放出されたVLP類への取り込みが起こる。

【0104】

図3は、血漿膜に結合したターゲット分子(この場合はG-蛋白質結合レセプター)のためのVLP提示の原理を図示したものである。VLP類のエンベロープ内での各ターゲット蛋白質の取り込みは、シグナル蛋白質(Gag)のC末端と共有結合した分子ペプチドタグと、対象となるターゲットに結合した相補性的

特異的ペプチドタグとの強い特異的相互作用の、又はG a g 蛋白質と対象となるターゲット蛋白質 / ペプチドとの直接的な共有結合による融合による結果である。G a g - タグ融合蛋白質は、分子内又はN若しくはC末端における特異的ペプチドタグも運ぶ、対象となる各分子と共に、細胞系において共発現される。各宿主細胞中での修飾されたG a g 蛋白質の発現の結果、G a g 蛋白質のN末端部に存在するシグナルにより、血漿膜にG a g 蛋白質が蓄積される。血漿膜にこの蛋白質が高濃度で存在することにより、V L P 類が細胞外環境へ放出される出芽プロセスが行われる。相補性タグを運ぶターゲット蛋白質が、同じ細胞において発現され、細胞の細胞内区画で、又は好ましくは高濃度で細胞膜において濃縮されると、タグされたG a g 蛋白質との特異的相互作用により、その後放出されたV L P 類への取り込みが起こる。

【0105】

図4は、ヒト表皮成長因子(E G F)レセプター(E G F R)に例示されるような単一のトランスメンブランスパニング(spanning)ドメインを含む膜挿入蛋白質のためのV L P 提示の原理を示す。モデル系は、単一のトランスメンブランスパニングセグメントを含むターゲット分子、特に、蛋白質のカルボキシル末端において特異的な巻きつきコイル配列を発現するように修飾されたヒトE G Fレセプター、この場合はK - コイルを使用する。K - コイルによってタグされたE G Fレセプター(ターゲット)のE - コイルによってタグされたG a g (シグナル)との宿主細胞における共発現の結果、各粒子の膜エンベロープに取り込まれたヒトE G Fレセプターを含むV L P 類の放出が起こる。

【0106】

図5は、タグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出されたV L P 類の表面上で発現されたヒトE G Fレセプター(E G F R)のウエスタンブロット分析を表す。この実験では、48時間に亘り、S f 9細胞が、シグナルG a g - E - コイル蛋白質及び / 又はターゲットE G F R - K - コイル蛋白質を発現する組換え型ウイルスに感染させられた。実験全体を通して、ターゲット(E G F R)に対して、一定量のウイルスが使用され(m.o.i.10)、異なる量のシグナルG a g ウイルスが、細胞の共感染(co-infect)のために使用され

た(m.o.i.10-0.1)。細胞培養上清を採取し、4℃で30分間、VLP類を100000gにペレット化した。得られたペレットを、PBS中で再懸濁し、アリコート(aliquot)をSDS PAGEで分離し、プロットした。得られたプロットを、シグナル(Gag、上方パネル)及びターゲット(EGFR、下方パネル)に向けられた抗体によって精密に検査した。結果から、放出されたVLP類におけるGagとEGFRとの共分離(co-segregation)が示される。

レーン#1 . EGFR-Kコイルウイルス m.o.i. 10.

Gag-Eコイルウイルス m.o.i. 10.

レーン#2 . EGFR-Kコイルウイルス m.o.i. 10.

Gag-Eコイルウイルス m.o.i. 5.

レーン#3 . EGFR-Kコイルウイルス m.o.i. 10.

Gag-Eコイルウイルス m.o.i. 1.

レーン#4 . EGFR-Kコイルウイルス m.o.i. 10.

Gag-Eコイルウイルス m.o.i. 0.1.

レーン#5 . Gag-Eコイルウイルス m.o.i. 10.

レーン#6 . EGFR-Kコイルウイルス m.o.i. 10.

【0107】

図6は、膜小胞上、並びにタグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出されたVLP類の表面上で発現されたヒトEGFレセプターのレセプター結合分析を示す。この実験では、48時間に亘り、Sf9細胞が、シグナルGag-E-コイル蛋白質及び/又はターゲットEGFR-K-コイル蛋白質を発現する組換え型ウイルスに感染させられた。実験全体を通して、ターゲット(EGFR)に対して、一定量のウイルスが使用され(m.o.i.10)、異なる量のシグナルGagウイルスが、細胞の共感染(co-infect)のために使用された(m.o.i.10-0.1)。細胞培養上清を採取し、4℃で30分間、VLP類を100000gにペレット化した。得られたペレットを、PBS中で再懸濁し、アリコートのTAMRAラベル化EGFの結合を分析した。リガンドTAMRAラベル化EGF(L)を、A431細胞から調製した小囊(V)と共に、又は、Gag-E-コイル及びK-コイルによってタグされたEGFレセプターを共発現する

Sf9細胞から得られたVLP類と共に、1 μ MのEGF(C)の存在下、又は不存在下でインキュベートした。小囊又はVLP類に結合した蛍光リガンドを、FIDA(詳細は、材料及び方法を参照)によって分析した。結果から、放出されたVLP類の表面上での機能的EGFレセプター分子の発現が示される。挿入は、このダイアグラムの1-3に示すようなA431細胞からの小囊調製物を用いるEGFR結合分析の結果を示すが、結合リガンドの%は、異なるスケールで表されている。

- #1: L + V
- #2: L + C + V
- #3 L
- #4: L + VLP (図5、レーン2と比較)
- #5: L + C + VLP (図5、レーン2と比較)
- #6: L + VLP (図5、レーン4と比較)
- #7: L + C + VLP (図5、レーン4と比較)
- #8: L + VLP (図5、レーン5と比較)
- #9: L + C + VLP (図5、レーン5と比較)
- #10: L (#3参照)

【0108】

図7は、ヒトエンドセリン(Endothelin)Aレセプターに例示されるような多数のトランスメンブランスパニングドメインを含む膜挿入蛋白質のためのVLP提示ストラテジーを表す。モデル系は、多数のトランスメンブランスパニングセグメント、特に、蛋白質のカルボキシル末端で特異的な巻きつきコイル配列を発現するように修飾されたG-蛋白質結合レセプター群の構成要素として、ヒトエンドセリンAレセプター(ET_Aレセプター)を含むターゲット分子、この場合はE-コイルを使用する。E-コイルによってタグされたET_Aレセプター(ターゲット)とK-コイルによってタグされたGag(シグナル)との宿主細胞での共発現により、各粒子の膜エンベロープに取り込まれたヒトET_Aレセプターを含むVLP類の放出が起こり得る。

【0109】

図8は、タグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出されたVLP類の表面上で発現されたヒトエンドセリンAレセプターのウエスタンブロット分析を示す。この実験では、48時間に亘り、Sf9細胞が、Gag-K-コイル蛋白質及び/又はターゲットET_AレセプターE-コイル蛋白質を発現する組換え型ウイルスに感染させられた。実験全体を通して、ターゲット(ET_Aレセプター)に対して、一定量のウイルスが使用され(m.o.i.10)、異なる量のシグナルGagウイルスが、細胞の共感染(co-infect)のために使用された(m.o.i.10-0.1)。細胞培養上清を採取し、4で30分間、VLP類を100000gにペレット化した。得られたペレットをPBS中で再懸濁し、アリコートでSDS PAGEで分離し、ブロットした。得られたブロットを、シグナル(Gag、下方パネル)及びターゲット(ET_Aレセプター、上方パネル)に向けられた抗体によって精密に検査した。結果から、放出されたVLP類におけるGagとET_Aレセプターとの共分離が示される。

- レーン#1. ET_Aレセプター-Eコイル(クローン#18)ウイルス m.o.i. 10.
Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 10.
- レーン#2. ET_Aレセプター-Eコイル(クローン#18)ウイルス m.o.i. 10.
Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 5.
- レーン#3. ET_Aレセプター-Eコイル(クローン#18)ウイルス m.o.i. 10.
Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 1.
- レーン#4. ET_Aレセプター-Eコイル(クローン#18)ウイルス m.o.i. 10.
Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 0.1.
- レーン#5. Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 10.
- レーン#6. ET_Aレセプター-Eコイル(クローン#18)ウイルス m.o.i. 10.
- レーン#7. ET_Aレセプター-Eコイル(クローン#20)ウイルス m.o.i. 10.
Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 10.
- レーン#8. ET_Aレセプター-Eコイル(クローン#20)ウイルス m.o.i. 10.
Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 5.
- レーン#9. ET_Aレセプター-Eコイル(クローン#20)ウイルス m.o.i. 10.
Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 1.

レーン#10. ET_A レセプター-Eコイル(クローン#20)ウイルス m.o.i. 10.

Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 0.1.

レーン#11. Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 10.

レーン#12. ET_A レセプター-Eコイル(クローン#20)ウイルス m.o.i. 10.

【 0 1 1 0 】

図9は、膜小囊上、並びにタグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出されたVLP類の表面上で発現されたヒトET_Aのレセプター結合分析を示す。この実験では、48時間に亘り、Sf9細胞が、シグナルGag-Kコイル蛋白質及び/又はターゲットET_Aレセプター-Eコイル蛋白質を発現する組換え型ウイルスに感染させられた。実験全体を通して、ターゲット(ET_Aレセプター)に対して、一定量のウイルスが使用され(m.o.i.10)、異なる量のシグナルGagウイルスが、細胞の共感染(co-infect)のために使用された(m.o.i.10-0.1)。細胞培養上清を採取し、4℃で30分間、VLP類を100000gにペレット化した。得られたペレットをPBS中で再懸濁し、アリコートのTAMRAラベル化エンドセリン-1の結合を分析した。リガンドTAMRAラベル化エンドセリン-1(L)を、ET_Aレセプターを発現する組換え型CHO細胞から調製された小囊(V)と共に、又はFlag及びEコイルによってタグされたGag-Kコイル及びET_Aレセプターを共発現するSf9細胞から得られたVLP類と共に、1μMのエンドセリン-1(C)の存在下、又は不存在下でインキュベートした。小囊又はVLP類に結合した蛍光リガンドを、FIDA(詳細は、材料及び方法を参照)によって分析した。挿入は、結合リガンドの割合が異なるスケールで表された、小囊に基づく結合分析を示す。データは、拡大した(large)ダイアグラムの試料1-3に相当する。結果から、放出されたVLP類の表面上での機能的ET_Aレセプター分子の発現が示される。

#1: L + V

#2: L + C + V

#3 L

#4: L + VLP (図8、レーン1と比較)

- #5: L + C + VLP (図8、レーン1と比較)
 #6: L + VLP (図8、レーン2と比較)
 #7: L + C + VLP (図8、レーン2と比較)
 #8: L + VLP (図8、レーン5と比較)
 #9: L + C + VLP (図8、レーン5と比較)

【0111】

図10は、膜小囊及びVLP類上のヒトET_Aレセプターの特異性を表す。TAMRAラベル化エンドセリン-1(L)は、E-コイルによってタグされたGag-K-コイル及びET_Aレセプターを共発現するSf9細胞から得られたVLP類と共に、1µMのエンドセリン-1(ET-1)若しくはビッグエンドセリン-1(Big ET-1)若しくはソマトスタチン(somatostatin)-14(SRIF-14)の存在下又は不存在下でインキュベートされた。小囊又はVLP類に結合した蛍光リガンドを、FIDA(詳細は材料及び方法を参照)によって分析した。

- #1: L + VLP (図8、レーン1と比較)
 #2: L + ET-1 + VLP (図8、レーン1と比較)
 #3: L + Big ET-1 + VLP (図8、レーン1と比較)
 #4: L + SRIF-14 + VLP (図8、レーン1と比較)
 #5: L + VLP (図8、レーン2と比較)
 #6: L + ET-1 + VLP (図8、レーン2と比較)
 #7: L + Big ET-1 + VLP (図8、レーン2と比較)
 #8: L + SRIF-14 + VLP (図8、レーン2と比較)
 #9: L + VLP (図8、レーン5と比較)
 #10: L + ET-1 + VLP (図8、レーン5と比較)
 #11: L + Big ET-1 + VLP (図8、レーン5と比較)
 #12: L + SRIF-14 + VLP (図8、レーン5と比較)

【0112】

図11は、EGFP分子(強化型(Enhanced)GFP分子)に例示されるような細胞質内で見られる蛋白質のための、膜に結合していないターゲットのVLP被包を示す。モデル系は、細胞の細胞質中の可溶性分子として見出され、本来は膜

に結合していないターゲット分子、特に、蛋白質のカルボキシル末端で特異的な巻きつきコイル配列を発現するように修飾されたEGFP分子、この場合はE-コイルを使用する。E-コイルによってタグされたEGFP(ターゲット)とK-コイルによってタグされたGag(シグナル)との宿主細胞における共発現の結果、各粒子のキャプシド構造内に被包されたEGFP分子を含むVLP類が放出され得る。

【0113】

図12は、タグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出されたVLP類のキャプシド内で発現されたEGFPのウエスタンブロット分析を示す。この実験では、48時間に亘り、Sf9細胞が、シグナルGag-K-コイル蛋白質及び/又はターゲットE-コイル蛋白質を発現する組換え型ウイルスに感染させられた。実験全体を通して、ターゲット(EGFP)に対して、一定量のウイルスが使用され(m.o.i.10)、異なる量のシグナルGagウイルスが、細胞の共感染(co-infect)のために使用された(m.o.i.10-0.1)。細胞培養上清が採取され、4で30分間、VLP類を100000gにペレット化した。得られたペレットをPBS中で再懸濁し、アリコートでSDS-PAGEで分離し、ブロットした。得られたブロットを、シグナル(Gag)及びターゲット(EGFP)に向けられた抗体によって精密に検査した。結果から、放出されたVLP類におけるGag及びEGFPの共分離が示される。

レーン#1 . EGFP-Eコイルウイルス m.o.i. 10.

Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 10.

レーン#2 . EGFP-Eコイルウイルス m.o.i. 10.

Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 5.

レーン#3 . EGFP-Eコイルウイルス m.o.i. 10.

Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 2.5.

レーン#4 . EGFP-Eコイルウイルス m.o.i. 10.

Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 1.

レーン#5 . EGFP-Eコイルウイルス m.o.i. 10.

Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 0.1.

レーン#6 . EGFP-Eコイルウイルス m.o.i. 10.

レーン#7. Gag-Kコイルウイルス m.o.i. 10.

【0114】

図13は、タグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出された蛍光VLP類のFIDA検出及び定量分析を表す。この実験では、48時間に亘り、Sf9細胞が、シグナル-K-コイル蛋白質及び/又はターゲットEGFP-E-コイル蛋白質を共発現する組換え型ウイルスに感染させられた。実験全体を通して、ターゲット(EGFP)に対して一定量のウイルスが使用され(m.o.i.10)、細胞の共感染のために、異なる量のシグナルGagウイルスが使用された(m.o.i.10-0.1)。細胞培養上清が採取されて濾過され(0.45 μ M)、4で30分間、VLP類が100000gにペレット化された。得られたペレットをPBS中で再懸濁し、混合物をFIDA(詳細は材料及び方法を参照)によって分析した。VLP調製物を培地によって希釈し、そこから、それらをペレット化した(VLP上清)。懸濁物中のVLP粒子数に相当する、相対的な(relative)粒子数を決定した。

- #1: 未希釈VLP懸濁物
- #2: 9 vol. VLP 懸濁物 + 1 vol. VLP 上清
- #3: 8 vol. VLP 懸濁物 + 2 vol. VLP上清
- #4: 7 vol. VLP 懸濁物 + 3 vol. VLP 上清
- #5: 6 vol. VLP 懸濁物 + 4 vol. VLP 上清
- #6: 5 vol. VLP 懸濁物 + 5 vol. VLP 上清
- #7: 4 vol. VLP 懸濁物 + 6 vol. VLP 上清
- #8: 3 vol. VLP 懸濁物 + 7 vol. VLP 上清
- #9: 2 vol. VLP 懸濁物 + 8 vol. VLP 上清
- #10: 1 vol. VLP 懸濁物 + 9 vol. VLP 上清
- #11: VLP 上清
- #12: 滅菌細胞培養培地

【0115】

図14は、アゴニストによって誘発された、膜に基づくレセプターの刺激の検

出のためのVLPに基づくレポーター分析の原理を示す。膜結合レセプター又はイオンチャンネル(ダイアグラムではGPCR)の刺激により、次にこの刺激の情報を細胞核に伝える第二メッセンジャー系が刺激される。転写因子が活性化され、特異的DNA配列(応答成分)に結合し、この応答成分の制御下にあるように設計された各レポーター遺伝子の転写活性化がその後開始される。レポーター遺伝子の翻訳生成物、この場合はGag-EGFP融合蛋白質が、その後、細胞内に、次いで細胞の膜表面に蓄積される。血漿膜でのGag-EGFP融合物の濃縮は、VLP類の形成、及び、それらが採取された後に定量され得るか、又は例えば共焦点顕微鏡法/分光法によって直接検出され得る細胞外培地への放出を引き起こす。

【0116】

図15は、Gag融合レポーター遺伝子生成物の合成を引き起こす、ホルスコリン(Forskolin)によって誘発された細胞内cAMPの蓄積の効果を示す。レポーター遺伝子融合物の転写を調節するチミジンキナーゼ基礎プロモーター(エンハンサー(enhancer)を含まない)と結合したcAMP応答成分からなる構造によって安定的にトランスフェクトされたCHO細胞が、蛍光顕微鏡法によって分析される前に、2µMのホルスコリンの存在下又は不存在下で24時間培養された。各パネルの上列は、細胞中で検出され得る蛍光を表すのに対し、各パネルの下列は、蛍光によって分析された、照らされた(illuminated)領域を表す。各パネルは、いくつかの独立した分析された培養の代表的な様子を表す。

【0117】

図16は、上記のGag-EGFPレポーター分析のFIDA分析を表す。レポーター遺伝子融合物の転写を調節するチミジンキナーゼ基礎プロモーター(エンハンサー(enhancer)を含まない)と結合したcAMP応答成分からなる構造によって安定的にトランスフェクトされたCHO細胞が、2µMのホルスコリンの存在下又は不存在下で48時間培養された。細胞培養上清を濾過し(0.45µm)、FIDA(詳細は材料及び方法を参照)によって分析した。培養培地へ放出されたVLP粒子数に相当する、相対的な粒子数を決定した。

#1: 誘発されていない

- #2: 2 μ Mのホルスコリンにより誘発
- #3: 誘発されていない
- #4: 2 μ Mのホルスコリンにより誘発
- #5: 滅菌細胞培養培地

【0118】

図17は、VLPに基づくトランスロケーション分析の原理を示す。この図は、VLP類の形成及び細胞培養培地への放出を通常促進することができる欠乏シグナル配列を移し(translocating)得る複数の配列(cDNAライブラリー)からの配列の同定のために使用され得る分析原理を説明する。第一の分析概念では、単一分子を血漿膜へ向ける(target)ことができない欠乏シグナル分子(例えば開始コドンの2つ後の位置で突然変異されたGag)は、レポーター分子(ダイアグラムでは緑色蛍光蛋白質)と、共有結合により、又は共有結合ではなく、機能的に結合する。このハイブリッド分子は、機能的シグナル分子から構成される場合、血漿膜に移すことができ、かつVLP類は、細胞外環境へ放出され、そこで、それらはいくつかの検出法によって測定及び定量され得る。レポーター分子ハイブリッドを含む欠乏シグナル分子が、分泌された膜結合蛋白質に特異的な、特異的トランスロケーションシグナルの添加により、そのアミノ末端で修飾される場合、トランスロケーション欠乏が軽減され、VLP類は細胞外培地へ放出される。

【0119】

図18は、VLPに基づく蛋白質-蛋白質相互作用分析の原理を表す。このダイアグラムは、細胞内で起こる蛋白質-蛋白質相互作用が観察され得る、この分析形式の原理を示す。第一の場合には、VLP類の形成及び細胞外培地への放出を誘発し得る機能的シグナル分子(Gag)は、対象となる蛋白質-蛋白質相互作用の第一パートナーを-共有結合して、又は共有結合せずに-含む。次の場合には、対象となる蛋白質-蛋白質相互作用の第二パートナーは、共有結合するか、又は共有結合せずに、レポーター分子、特に、ダイアグラムに表すようにルミネッセンス蛋白質と融合/結合する。第一及び第二パートナーが相互作用すると、これら分子を含む複合体が形成され、それは、その後VLP類を形成すること

ができ、その結果、それらはその後細胞外環境へ放出され、そこでいくつかの方法によって検出及び定量され得る。蛋白質-蛋白質相互作用をインサイチュで更に分析するために、研究対象の化合物が、細胞に添加され、それらが血漿膜を横切ることができ、この相互作用を変更し得るならば、細胞外環境へのルミネセンスVLP類の放出が影響を受けるであろう。そしてその放出は、その後定量され得る。

【0120】

図19は、細胞内で発現された蛋白質及びシグナル及びターゲット融合分子を共発現する宿主細胞から放出されたVLP類内に取り込まれた蛋白質の両方のウエスタンブロット分析を示す。この実験では、Gag-Ras融合物、完全長Raf又はRaf-EGFP融合物のいずれかを発現する構造によって、Sf9細胞が一時的にトランスフェクトされた。96時間のトランスフェクションの後、細胞培養上清を採取し、4℃で30分間、VLP類を100000gにペレット化した。トランスフェクトされた細胞を、50mMのTris-HCl、150mMのNaCl、1%のNP40、pH7.8、及びプロテアーゼ阻害剤中に20分間氷上で溶解させる前に、PBSによって1回洗浄した。溶解した細胞を、その後10分間10000gで遠心分離し、可溶性蛋白質画分を、その後SDS PAGE分析のために使用した。VLP類又は可溶性蛋白質溶解物のいずれかのアリコートを、2倍希釈した(2x)SDS PAGE試料バッファー(20mMのTris-HCl pH 6.8、2%のSDS、20mMのDTT、2%のME、10%のグリセロール)中で再懸濁し、1分間沸騰させ、試料を変性された。その後、標準的な分子生物学的方法に従って、蛋白質試料を12%のSDS PAGEゲル上で分離した。得られたブロットを、Gag-Ras融合物(アンチ-Ras)、完全長Raf(アンチ-Raf)、及びRaf-EGFP融合物(アンチ-GFP)に向けられた抗体によって精密に検査した。結果から、Gag-Rasと、完全長Raf又はRaf-EGFP融合物との放出されたVLP類における細胞内共発現及び共分離が示される。

A: Sf9全細胞溶解物における蛋白質分析

レーン#1 . 完全長Raf及びRaf-EGFPの共発現

レーン#2 . 完全長R a f、R a f - E G F P及びG a g - R a sの共発現

レーン#3 . G a g - R a sの発現

B : トランスフェクトされた細胞から放出されたペレット状V L Pの蛋白質分析

レーン#1 . G a g - R a s及びR a f - によってトランスフェクトされた細胞から放出されたV L P類

レーン#5. G a g - R a s及び完全長R a fによってトランスフェクトされた細胞から放出されたV L P類

【0121】

結果から、細胞内のすべての各蛋白質は、検出可能なレベルで発現され、誤りのない完全な状態であることが示される。更に、G a g - R a sと完全長R a f又はR a f - E G F P融合物のいずれかとの共発現後に放出されたV L P類は、前記R a f分子とG a g - R a sパートナーとの蛋白質蛋白質相互作用の結果、R a f / レポーター蛋白質を取り込む。これにより、この原理が示される。

【0122】

図20は、V L Pに基づく細胞 - 細胞分析の原理を示す。相同性又は非相同性相互作用。この図は、この分析形式の重要性を示す(underlining)原理を示す。研究対象の相互作用する細胞表面は、上記の方法を用いて、2つの異なるV L P群と結合する。対象となる機能的分子を運ぶ、得られた2つの群は、その後所定の割合で混合され、相互作用させられる。相互作用が特異的であると、凝集していないV L P群と区別され得る凝集体が形成されるであろう。これらのターゲット相互作用を妨げる化合物が、その後混合物に添加され、次いで、様々な方法によって、対照と比較した凝集体の分離が定量され、その結果、ターゲット - ターゲット阻害の指標(index)が得られる

【0123】

図21は、V L Pに基づく分析技術の概観を表す。先記分析形式において記載した技術のための適用の概観。上記の分析及びそれらの変形が、このダイアグラムに示され、かつ使用された各V L P系も、放出されたV L P (1 - 3) の脂質エンベロープへの取り込み又は放出されたV L P (4 - 6) 内への被包のいずれかによって表される。分析形式1は、細胞血漿膜におけるその通常の配置と似た

ように、ターゲットが成熟VLPの脂質エンベロープ膜に取り込まれる、細胞表面 - 化合物相互作用（ここで、細胞表面分子はレセプター又はイオンチャンネルであることができ、かつターゲットである）を表す。化合物は、細胞/組織抽出物、又は天然の供給源から分泌された分子から得られた合成由来又は天然由来の外部分子として表され得る。更に、そのようなVLP類の細胞外培地への放出はまた、いずれかの外部化合物の刺激によって、又はパラクリン(paracrine)及び/若しくはオートクリン(autocrine)調節メカニズムによって媒介され得る。（2）に図示したような細胞 - 細胞相互作用は、対象となる細胞表面分子（相同性及び非相同性のレセプター - リガンド、粘着性分子相互作用）を運ぶ2つの独立したVLP調製物を使用することによって分析され得る。分泌経路は、欠乏シグナル分子を助けることができるターゲット - シグナル融合物の被包によって、VLP類の形成及び細胞外培地への放出が行われる、VLPに基づく分析（2）によっても分析され得る。蛋白質 - 蛋白質相互作用（3）は、2つの既知/未知のポリペプチド/ペプチドドメインの積極的な(positive)相互作用の結果、シグナル及びレポーター分子の共存局在化が行われ、検出され得るキメラVLP類の細胞外培地への放出が次いで行われる、更なるVLPに基づくシステムの基礎が構成される。この分析の更なる変形は、効率的に機能させるためには蛋白質 - 蛋白質相互作用が必須である、後転写/後翻訳分析である（4 - 5）。更なる分析形式では、例えばCRE又はEREなどの応答DNA成分の制御下にある場合に、この成分に影響を及ぼすシグナル（刺激されていない細胞と比較して転写が増加）に応答して、シグナル - レポーター融合物が合成される。転写及びそれに続く翻訳の結果、検出され得るVLP類が（被包後に）形成及び放出される（4）。最終的に、活性酵素がVLP類に被包されると、膜に包まれた活性成分の均質調製物が得られる。その活性は、この活性に影響を及ぼし得るだけでなく、生物学的膜バリアーを横切ることにもできる化合物に対して決定され得る。

【0124】

図22は、本発明の好ましい態様を表す。この分析法は、細胞内の蛋白質 - 蛋白質相互作用を妨げる遺伝子生成物の同定のために使用され得る。cDNAライブラリーの添加前に、形質転換された細胞は、その中でシグナル分子が、共有結

合しているか、又は共有結合ではなく結合している最初に選択される蛋白質分子を含み、レポーター分子が、2番目に選択される蛋白質分子と共有結合しているか、又は共有結合ではなく結合している構造を発現する。これら蛋白質の相互作用の結果、検出され得るVLP類が放出される。3番目の蛋白質生成物を発現し得る、単一又は複数のcDNA分子によって細胞をトランスフェクトすることにより、この更なる蛋白質生成物は、前記第一又は第二蛋白質分子のいずれかと相互作用し得る場合に、検出され得るVLP類の放出に影響を及ぼすであろう。この方法では、第一蛋白質分子と第二蛋白質分子との間の、この相互作用に影響を及ぼし得る分子が同定され得る。これら分子は、第一蛋白質分子と第二蛋白質分子との間の結合だけを妨げることもあり、また、それらは、前記第一又は第二蛋白質分子のいずれかに対する新たな結合パートナーさえも構成することもある。このモデルには、いくつかの仮定が含まれる：

a) 導入されたcDNAは、レポーター分子に融合した蛋白質分子と相互作用する蛋白質をコードすることにより、シグナル融合物とレポーター融合物との間の相互作用を阻害する。この結果、レポーター分子を運ばないVLP類が放出される。それにもかかわらず、これらVLP類は、レポーター分子を運ぶVLP類と区別され得る。

b) 導入されたcDNAは、シグナル分子に含まれる研究対象の蛋白質分子と相互作用する蛋白質をコードすることにより、レポーター融合物とシグナル融合物との間の相互作用を阻害する。この結果、レポーター分子を運ばないが、導入された前記cDNAの遺伝子生成物を被包するVLP類が放出される。その存在又は活性は、放出されたVLP群中で直接分析され得る。これらVLP類は、レポーター分子を運ぶVLP類と区別され得る。

c) 導入されたcDNA生成物と、シグナル又はレポーター融合生成物のいずれかとの間には相互作用がない。従って、検出可能なレポーターを運ぶVLP類の放出は妨げられない。

【0125】

図23は、本発明のもう1つの好ましい態様を表す。この分析法により、細胞内のシグナルカスケードを妨げる遺伝子生成物の同定が可能になる。形質転換さ

れた細胞系は、特異的プロモーターの制御下で、レポーター構造を発現する。このレポーターに結合したシグナルカスケードが刺激される場合、VLP類の放出を観察及び定量することができる。蛋白質生成物を発現し得る単一又は複数のcDNA分子による、このような細胞のトランスフェクションの結果、この更なる蛋白質生成物が前記シグナルトランスダクション経路を調節し得るならば、刺激された細胞におけるVLP類の放出が影響を受ける。異なる読み出しの仮定が可能である：

1. アゴニストによって刺激されたシグナルトランスダクションカスケードに関する成分と、導入されたcDNA生成物との相互作用の結果、検出され得るVLP類の生成及び放出が阻害される。

2. アゴニストによって刺激されたシグナルカスケードに関する成分と、導入されたcDNA生成物との相互作用の結果、検出され得るVLP類の生成及び放出が増加する。

【0126】

図24は、アゴニストの不存在下での、シグナルカスケードに関する成分と、導入されたcDNA生成物との相互作用を示す。この相互作用の結果、VLP類の生成及び放出が刺激される。

【0127】

材料及び方法

細胞培養

27 の湿潤環境下、補足成分(supplements)及び10%昆虫細胞培養用(certified)FBSを添加したグレースの(Grace's)昆虫培地中で、Sf9細胞を成長させた。プラスチック培養フラスコ、又は様々な大きさ(50-500mlの培養容量)の回転(spinner)培養容器中で、絶えず攪拌しながら細胞を成長させた。開始時の密度が 5×10^5 細胞/mlであった細胞を、継代培養前に $1 - 2 \times 10^6$ 細胞/mlの密度に成長させた。その代わりに、上記のように、血清を含まないインセクトエクスプレス(Insect Express)培養培地において、細胞を培養した。

【0128】

37 の5%CO₂雰囲気中で、グルタミン(2mM)及び10%FCSを含

むDMEM中で、CHO細胞を成長させた。プラスチック培養容器中で成長させた細胞を、80%の集密度(confluence)で継代培養した。基礎チミジンキナーゼ(TK)プロモーターと共に、ヒトソマトスタチンレセプタープロモーター由来のCRE (cAMP responsive element)に相当する5つの繰り返し配列が、MoMuLV Gag-EGFP融合遺伝子の5'に配置された構造によって、CHO細胞がトランスフェクトされた。G418(400 µg/ml)によって安定な細胞系が選択され、(下記に示すように)ホルスコリンによって個々のクローンが刺激され、(非刺激条件と比べて)蛍光を示すクローンが、更なる研究のために選ばれた。フェノールレッドを含まないCHO規格(formulated)血清未含有培地中で、ホルスコリン(2 µM)によって細胞を刺激した。刺激を受けたEGFPによって発せられた蛍光を検出するための各フィルターを備えた蛍光顕微鏡を使用して、直接蛍光によって細胞を分析した。VLP検出のために、ホルスコリンによって異なる期間、細胞を刺激し、細胞培養上清を除去し、0.45 µMのフィルターによって濾過した後、FIDA(EPA 99 112 104.7及び97 945 816.3(これらの内容は、本明細書に開示として援用される)に記載されているような蛍光強度分布分析)によって直接分析した。

【0129】

昆虫細胞における一時的な発現

60 mmの皿において、血清を含まないインセクトエクスプレス(Insect Express)培地中に、 2×10^6 個のSf9細胞を植え付け、細胞を2~3分間左右に静かに振り動かし、細胞を均一に分布させた。このインキュベーション後、細胞の集密度は50~60%であった。細胞を皿の底部に完全に結合させるために、細胞を、少なくとも15分間、振り動かさずに更にインキュベートし、細胞の単一層を形成した。

各トランスフェクション混合物を調製するために、1.5 mlのマイクロ遠心分離(microcentrifuge)管を使用し、以下の順序で試薬を添加した。

1 mlのインセクトエクスプレス(Insect Express)培地(バイオホワイトッカー社(Biowhittaker Corp.))

プラスミド構造(TE中に1 µg / 1 µl、pH 8) 10 µl (10 µg)

インセクチン - プラス(Insectin-Plus) (登録商標) リポソーム 20 μ l (インビトロゲン社(InVitrogen Corp.))

混合物を10秒間徹底的かつ強力に混合し、15分間室温でインキュベートした。この後、単一層を壊さずに、細胞から培地を注意深く除去し、全トランスフェクション混合物を、60mmの皿に滴下した。プラットフォームを揺り動かしながら、これらの皿の両面(side-to-side)を、室温で4時間インキュベートした。60mmの皿それぞれに、1-2mlのインセクトエクスプレス(Insect Express)を添加した後、蒸発を防ぐために、それらを、湿ったペーパータオルを入れた密封したプラスチックバッグの中に入れ、27°Cでインキュベートした。トランスフェクション後、特定の時間で細胞を採取した。

【0130】

組換え型バキュロウイルス及び高力価ウイルスストック(stocks)の生成

対象となる遺伝子(ターゲット及びシグナル分子)を、標準バキュロウイルス輸送ベクターの多数のクローニング部位にクローン化し、標準的な分子生物学的手法のためにも、組換え型ウイルス群を選択した。1ml当たり 1×10^6 個の細胞密度における、感染多重度(m.o.i.)0.1のSf9培養物の感染によって、高力価ウイルスストックを生成した。培養物を72-96時間インキュベートした後、細胞デブリ(debris)を除去するために500gで細胞を遠心分離することにより、ウイルスを採取した。0.45 μ Mのフィルターによってウイルスストックを濾過し、等分して(in aliquots)4°Cで保存した。標準的な方法によるSf9細胞におけるプラーク滴定によって、ウイルス力価を決定した。

【0131】

巻きつきコイルによってタグされた(coiled coil tagged)ターゲット及びシグナル分子の構成

ターゲット分子とシグナル分子との相互作用を引き起こすために、高親和性をもってお互いに特異的相互作用を形成することが示された、巻きつきコイル構造を形成し得る2つのペプチド配列を使用した。問題となっているペプチド配列は、以下のものである：

1) ${}_{\text{NH}_2}$ -E-V-S-A-L-E-K- ${}_{\text{COOH}}$ E-コイル

2) NH_2 -K-V-S-A-L-K-E- COOH K-コイル

【0132】

哺乳動物の後翻訳(back translation)及び各ヌクレオチド配列のコンカタメリゼーション(concatamerisation)の後、これらのヘプタマーが、五量体(pentameric)繰り返し配列として構成された。

1) 5'-GAG GTG TCC GCC CTG GAG AAG-3' E-コイル

2) 5'-AAG GTG TCC GCC CTG AAG GAG-3' K-コイル

【0133】

小型グリシンリンカーによって、残りの分子から各タグを分離した：

E-コイルタグ

NH_2 -GGGEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK- COOH

K-コイルタグ

NH_2 -GGGKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKE- COOH

【0134】

グリシンリンカーに相当する5'配列を有するヘプタマー(heptameric)配列に相当するオリゴヌクレオチドが構成され、標準的な分子的手法によって、二本鎖にアニールされた生成物がクローンされ、その後、dsDNAシーケンシングによって配列が確認された。その後、正しい配列を増幅して、各ターゲット及びシグナル分子上へ、その分子の3'末端でライゲートした。

【0135】

【実施例】

実験プロトコル

実施例#1 (Gag - Kコイル / EGFP - Eコイル)

ウエスタンブロット分析：

以下のようにSf9細胞を感染させるために、カルボキシル末端がタグされたMoMuLVgag遺伝子(Gag - Kコイル、シグナル分子)を含む組換え型バキュロウイルス、及びカルボキシル末端につながれた(tailed)EGFP分子(EGFP - Eコイル、ターゲット分子)を使用した。27の湿潤雰囲気中で、補足成分及び10%細胞培養用FBSを含むグレースの(Grace's)昆虫培地2

1 ml 中で、35 mmの皿において、1 ml 当たり 5×10^5 個の密度で細胞を平板培養した(plated)。細胞が付着した(室温で1時間)後、培地を除去し、両ウイルスを、対応するm.o.iで、総容量1 ml となるように添加した。27の湿潤雰囲気中で細胞を48時間インキュベートした。細胞を採取し、細胞培養上清を注意深く除去して、4で5分間、1000 gで遠心分離し、細胞及びデブリを除去した。上清をデカンテーションし、0.45 μ Mのフィルターによって濾過した。濾過した細胞培養上清を、4において100000 gで30分間遠心分離することにより、VLP類を濃縮した。ペレット化したVLP類をPBS中で再懸濁させ、4で保存した。感染させた細胞を、PBSによって1回洗浄した後、50mMのTris-HCl、150mMのNaCl、1%のNP40、pH7.8及びプロテアーゼ阻害剤に、氷上で20分間溶解させた。溶解させた細胞を、その後10000 gで10分間遠心分離した後、可溶性蛋白質画分をSDS PAGE分析のために使用した。VLP類又は可溶性蛋白質溶解物のいずれかのアリコート、2倍希釈した(2x)SDS PAGE試料バッファー(20 mMのTris-HCl pH 6.8、2%のSDS、20 mMのDTT、2%のME、10%のグリセロール)中で再懸濁させ、1分間沸騰させて試料を変性させた。その後、標準的な分子生物学的方法によって、12%のSDS PAGEゲル上で蛋白質試料を分離した。その後、(48 mMのTris、39 mMのグリシン、20%のメタノール、0.037%のSDS)中で1時間、セミドライブロッキング(semi-dry blotting)装置を用いて150 mAで、分離した蛋白質をPVDF膜へ移した。その後、プロットを以下のように処理した。ブロッキング(blocking)溶液(TBST; 20 mMのTRIS-HCl、pH 7.6、137 mMのNaCl、0.05%のツイーン(TWEEN) 20、0.1%のカゼイン加水分解物含有)中で1時間、膜をインキュベートした。このインキュベーションの後、シグナル分子(ラビット アンチ - Gag、最終希釈率1:10000)、又はターゲット分子(ラビット アンチ - GFP、最終希釈率1:5000)のいずれかに向けられた第一抗体を含むブロッキング溶液10 mlを添加する前に、TBST中で5分間、フィルターを洗浄した。室温で1時間、絶えず攪拌しながら、この溶液中でフィルターをインキュベートした後、TBSTによって5分間3回洗浄した。その後、ペルオキシダーゼに結合した第二抗体(ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合したヤギ アンチラビット抗体、1:2500)を

含むブロッキング溶液10mlを、絶えず攪拌しながら、室温で1時間、膜と共にインキュベートした後、TBS Tによって5分間3回洗浄した。その後、蒸留水によってフィルターを簡単にすすぎ洗いし、ECL検出試薬1及び2並びに3%のBSA(最終濃度)を60秒間添加することにより、成長させた。検出溶液からフィルターを除去し、ECL検出フィルムに触れさせる(exposed)前に、2つのペーパータオルの間で乾燥させた。シグナルの強度は、触れさせる時間に依存していた。

【0136】

FIDA分析

FIDAによる蛍光性VLP類の定量分析

Gag-Kコイル及びEGFP-Eコイルを共発現するSf9細胞の上清を濾過し(0.45 μ m)、FIDA分析のために直接使用するか(a)、又はVLP類を採取するために遠心分離(100000g、4、30分)した(b)。上清を除去し、PBS中でペレットを再懸濁させた。FIDA分析の前に、0.01%(v/v)のツイーン(Tween)-20の存在下で超音波によって試料を簡単に均質化し、0.01%(v/v)のツイーン(tween)-20をそれぞれ含む、滅菌細胞培養培地(a)又はPBS(b)によって希釈した。PCT/EP97/03022(この内容は、本明細書に開示として援用される)に開示されているようなビームスキャナー(beam scanner)、及び488nmの励起用レーザー光を使用して、FIDAによってVLP類を分析した。

【0137】

実施例#2(Gag-Eコイル/EGFR-Kコイル)

ウエスタンブロット分析

以下のようにSf9細胞を感染させるために、カルボキシル末端がタグされたMoMuLVgag遺伝子(Gag-Eコイル、シグナル分子)を含む組換え型バキュロウイルス、及びカルボキシル末端につながれたEGFR分子(EGFR-Kコイル、ターゲット分子)を使用した。27の湿潤雰囲気中で、補足成分及び10%細胞培養用FBSを含むグレースの(Grace's)昆虫培地2ml中で、35mmの皿において、1ml当たり 5×10^5 個の密度で細胞を平板培養し

た。細胞が付着した(室温で1時間)後、培地を除去し、両ウイルスを、対応するm.o.iで、総容量1mlとなるように添加した。27の湿潤雰囲気中で細胞を48時間インキュベートした。細胞を採取し、細胞培養上清を注意深く除去して、4で5分間、1000gで遠心分離し、細胞及びデブリを除去した。上清をデカンテーションし、0.45µMのフィルターによって濾過した。濾過した細胞培養上清を、4において100000gで30分間遠心分離することにより、VLP類を濃縮した。ペレット化したVLP類をPBS中で再懸濁させ、4で保存した。感染させた細胞を、PBSによって1回洗浄した後、50mMのTris-HCl、150mMのNaCl、1%のNP40、pH7.8及びプロテアーゼ阻害剤に、氷上で20分間溶解させた。溶解させた細胞を、その後10000gで10分間遠心分離した後、可溶性蛋白質画分をSDS PAGE分析のために使用した。VLP類又は可溶性蛋白質溶解物のいずれかのアリコート、2倍希釈した(2×)SDS PAGE試料バッファー(20mMのTris-HCl pH 6.8、2%のSDS、20mMのDTT、2%のME、10%のグリセロール)中で再懸濁させ、1分間沸騰させて試料を変性させた。その後、標準的な分子生物学的方法によって、12%のSDS PAGEゲル上で蛋白質試料を分離した。その後、(48mMのTris、39mMのグリシン、20%のメタノール、0.037%のSDS)中で1時間、セミドライプロットング装置を用いて150mAで、分離した蛋白質をPVDF膜へ移した。その後、プロットを以下のように処理した。ブロッキング溶液(TBST; 20mMのTRIS-HCl、pH 7.6、137mMのNaCl、0.05%のツイーン(TWEEN) 20、0.1%のカゼイン加水分解物含有)中で1時間、膜をインキュベートした。このインキュベーションの後、シグナル分子(ラビット アンチ - G a g、最終希釈率1:10 000)、又はターゲット分子(ラビット アンチ - E G F R、最終希釈率1:1000)のいずれかに向けられた第一抗体を含むブロッキング溶液10mlを添加する前に、TBST中で5分間、フィルターを洗浄した。室温で1時間、絶えず攪拌しながら、この溶液中でフィルターをインキュベートした後、TBSTによって5分間3回洗浄した。その後、ペルオキシダーゼに結合した第二抗体(ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合したヤギ アンチラビット抗体、1:2500)を含むブロッキング溶液10mlを、絶えず攪拌しながら、室温で1時間、膜と共にインキュベートした後、TBSTによって

5分間3回洗浄した。その後、蒸留水によってフィルターを簡単にすすぎ洗いし、ECL検出試薬1及び2並びに3%のBSA(最終濃度)を60秒間添加することにより、成長させた。検出溶液からフィルターを除去し、ECL検出フィルムに触れさせる前に、2つのペーパータオルの間で乾燥させた。シグナルの強度は、触れさせる時間に依存していた。

【0138】

FIDA分析

EGFレセプター結合分析及びFIDA分析

A431細胞から調製した膜小囊、又はGag-E-コイル及びK-コイルによってタグされたEGFレセプターを共発現するSf9細胞から得られたVLP類と共に、1 μ Mの非ラベル化EGFの存在下又は不存在下で、分析バッファー[20 mMのHEPES、140 mMのNaCl、5 mMのKCl、1.2 mMのMgCl₂、1.8 mMのCaCl₂、0.35 g/lのNaHCO₃、1g/lのグルコース、0.01% (w/v)のプルロニック(Pluronic) F-127、pH 7.4]中で、5 nMのTAMRAラベル化EGFをインキュベートした。室温で30分間インキュベートした後、ビームスキャナー及び543 nmの励起用レーザー光を用いて、FIDAによって混合物を分析した。

【0139】

実施例#3 (Gag-Kコイル/ET_Aレセプター-Eコイル)

ウエスタンブロット分析

以下のようにSf9細胞を感染させるために、カルボキシル末端がタグされたMoMuLV gag遺伝子(Gag-Kコイル、シグナル分子)を含む組換え型バキュロウイルス、及びカルボキシル末端につながれたET_Aレセプター分子(ET_Aレセプター-Eコイル、ターゲット分子)を使用した。27の湿潤雰囲気中で、補足成分及び10%細胞培養用FBSを含むグレースの(Grace's)昆虫培地2 ml中で、35 mmの皿において、1 ml当たり5 \times 10⁵個の密度で細胞を平板培養した。細胞が付着した(室温で1時間)後、培地を除去し、両ウイルスを、対応するm.o.iで、総容量1 mlとなるように添加した。27の湿潤雰囲気中で細胞を48時間インキュベートした。細胞を採取し、細胞培養上清を注意深く除去して、4で5分間、1000 gで遠心分離し、細胞及びデブリ

を除去した。上清をデカンテーションし、 $0.45\ \mu\text{M}$ のフィルターによって濾過した。濾過した細胞培養上清を、4 において $100000\ \text{g}$ で30分間遠心分離することにより、VLP類を濃縮した。ペレット化したVLP類をPBS中で再懸濁させ、4 で保存した。感染させた細胞を、PBSによって1回洗浄した後、 $50\ \text{mM}$ のTris-HCl、 $150\ \text{mM}$ のNaCl、1%のNP40、 $\text{pH}7.8$ 及びプロテアーゼ阻害剤に、氷上で20分間溶解させた。溶解させた細胞を、その後 $10000\ \text{g}$ で10分間遠心分離した後、可溶性蛋白質画分をSDS PAGE分析のために使用した。VLP類又は可溶性蛋白質溶解物のいずれかのアリコート、2倍希釈した(2x)SDS PAGE試料バッファー($20\ \text{mM}$ のTris-HCl $\text{pH}6.8$ 、2%のSDS、 $20\ \text{mM}$ のDTT、2%のME、10%のグリセロール)中で再懸濁させ、1分間沸騰させて試料を変性させた。その後、標準的な分子生物学的方法によって、12%のSDS PAGEゲル上で蛋白質試料を分離した。その後、($48\ \text{mM}$ のTris、 $39\ \text{mM}$ のグリシン、20%のメタノール、0.037%のSDS)中で1時間、セミドライプロットング装置を用いて $150\ \text{mA}$ で、分離した蛋白質をPVDF膜へ移した。その後、プロットを以下のように処理した。ブロッキング溶液(TBST; $20\ \text{mM}$ のTRIS-HCl、 $\text{pH}7.6$ 、 $137\ \text{mM}$ のNaCl、0.05%のツイーン(TWEEN) 20、0.1%のカゼイン加水分解物含有)中で1時間、膜をインキュベートした。このインキュベーションの後、シグナル分子(ラビット アンチ - Gag、最終希釈率1:10 000)、又はターゲット分子(ラビット アンチ - E T_Aレセプター、最終希釈率1:1000)のいずれかに向けられた第一抗体を含むブロッキング溶液 $10\ \text{ml}$ を添加する前に、TBST中で5分間、フィルターを洗浄した。室温で1時間、絶えず攪拌しながら、この溶液中でフィルターをインキュベートした後、TBSTによって5分間3回洗浄した。その後、ペルオキシダーゼに結合した第二抗体(ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合したヤギ アンチラビット抗体、1:2500)を含むブロッキング溶液 $10\ \text{ml}$ を、絶えず攪拌しながら、室温で1時間、膜と共にインキュベートした後、TBSTによって5分間3回洗浄した。その後、蒸留水によってフィルターを簡単にすすぎ洗いし、ECL検出試薬1及び2並びに3%のBSA(最終濃度)を60秒間添加することにより、成長させた。検出溶液からフィルターを除去し、ECL検出フィルムに触れさせる前に、2つのペーパータオルの間で乾燥

させた。シグナルの強度は、触れさせる時間に依存していた。

【0140】

F I D A分析

E T_Aレセプター結合分析及びF I D A分析：

1 μ Mの非ラベル化エンドセリン - 1 (競争(competing)リガンド)若しくはビッグエンドセリン - 1 (非競争リガンド)若しくはソマトスタチン - 14 (非競争リガンド)の存在下、又は不存在下において、分析バッファー[50 mMのTris-HCl、pH 7.4、1 mMのCaCl₂、0.1%の(w/v) BSA、0.05%の(v/v)ツイーン(Tween)-20]中で、E T_Aレセプターを発現する組換え型C H O細胞から調製された膜小嚢、又はG a g - K - コイル並びにF l a g及びE - コイルによってタグされたE T_Aレセプターを共発現するS f 9細胞から得られたV L P類と共に、2 nMのT A M R Aラベル化エンドセリン - 1をインキュベートした。室温で30分間インキュベートした後、ビームスキャナー及び543 nmの励起用レーザー光を用いて、F I D Aによって混合物を分析した。

【0141】

実施例#4 G a g - E G F Pレポーター系

蛍光顕微鏡分析

基礎T Kプロモーター及びヒトソマトスタチンレセプター由来の5つの連続したC R E類からなるプロモーターの下流のM o M u L V G a g - E G F P融合遺伝子を運ぶ構造によって安定的にトランスフェクトされたC H O細胞を、5% C O₂雰囲気中、37 °Cで、グルタミン(2mM)及び10%のF C S及び400 μ g / m lのG 4 1 8を含むD M E M中で成長させた。フェノールレッドを含まないC H O規格血清未含有培地中で、ホルスコリン(2 μ M)によって細胞を刺激した。刺激を受けたE G F Pによって発せられた蛍光を検出するための各フィルターを備えた蛍光顕微鏡を使用して、直接蛍光によって細胞を分析した。V L P検出のために、ホルスコリンによって異なる期間、細胞を刺激し、細胞培養上清を除去し、0.45 μ Mのフィルターによって濾過した後、F I D Aによって直接分析した。

【0142】

F I D Aによる蛍光性V L P類の定量分析

G a g - E G F P融合遺伝子を発現するC H O細胞の上清を濾過し(0.45 μ m)、F I D A分析のために直接使用した。F I D A分析の前に、0.01%(v/v)のツイーン(Tween) - 20の存在下で、超音波によって試料を簡単に均質化した。ビームスキャナー及び488nmの励起用レーザー光を用いて、F I D AによってV L P類を分析した。

【0143】

実施例#5 蛋白質-蛋白質相互作用：R a s融合蛋白質とR a f融合蛋白質との相互作用

G a g - ヒトR a s融合物、完全長ヒトR a f又はR a f - E G F P融合物のいずれかを発現する構造によって、インセクトエクスプレス(Insect Express)血清未含有培地において成長させたS f 9細胞を、(インビトロゲン(InVitrogen)のリポソームに基づくトランスフェクション試薬を用いて)一時的にトランスフェクトした。96時間後、細胞を採取し、細胞培養上清を注意深く除去し、4で5分間、1000gで遠心分離して細胞及びデブリを除去した。上清をデカンテーションし、0.45 μ Mのフィルターによって濾過した。濾過した細胞培養上清を、4で30分間、100000gで遠心分離することにより、V L P類を濃縮した。ペレット化したV L P類を、P B S中で再懸濁させ、4で保存した。トランスフェクトした細胞を、P B S中で1回洗浄した後、50mMのTris-HCl、150mMのNaCl、1%のNP40、pH7.8及びプロテアーゼ阻害剤中に、氷上で20分間溶解させた。その後、溶解させた細胞を、10000gで10分間遠心分離した後、可溶性蛋白質画分を、S D S P A G E分析のために使用した。V L P類又は可溶性蛋白質溶解物のいずれかのアリコート、2倍希釈した(2 \times) S D S P A G E試料バッファー(20 mMのTris-HCl pH 6.8、2%のSDS、20 mMのDTT、2%のME、10%のグリセロール)中に再懸濁させ、1分間沸騰させて試料を変性させた。その後、標準的な分子生物学的方法によって、12%のS D S P A G Eゲル上で、蛋白質試料を分離した。その後、(48 mMのTris、39 mMのグリシン、20%のメタノール、0.037%のSDS)中で1時間、セミドライプロッティング装置を用いて150mAで、分離した蛋白質をP V D F膜へ移した。その後、プロットを

以下のように処理した。ブロッキング溶液(TBST; 20 mMのTRIS-HCl、pH 7.6、137 mMのNaCl、0.05%のツイーン(TWEEN) 20、0.1%のカゼイン加水分解物含有)中で1時間、膜をインキュベートした。このインキュベーションの後、G a g - R a s融合分子(ラビット アンチ - R a s、最終希釈率1:1000)、完全長R a f分子(ラビット アンチ - R a f、最終希釈率1:1000)、又はR a f - E G F P融合分子(ラビット アンチ - G F P、1:1000)のいずれかに向けられた第一抗体を含むブロッキング溶液10mlを添加する前に、T B S T中で5分間、フィルターを洗浄した。室温で1時間、絶えず攪拌しながら、この溶液中でフィルターをインキュベートした後、T B S Tによって5分間3回洗浄した。その後、ペルオキシダーゼに結合した第二抗体(ホースラディッシュペルオキシダーゼと結合したヤギ アンチラビット抗体、1:2500)を含むブロッキング溶液10mlを、絶えず攪拌しながら、室温で1時間、膜と共にインキュベートした後、T B S Tによって5分間3回洗浄した。その後、蒸留水によってフィルターを簡単にすすぎ洗いし、E C L 検出試薬1及び2並びに3%のB S A(最終濃度)を60秒間添加することにより、成長させた。検出溶液からフィルターを除去し、E C L 検出フィルムに触れさせる前に、2つのペーパータオルの間で乾燥させた。シグナルの強度は、触れさせる時間に依存していた。

【図面の簡単な説明】

【図1】ホスト細胞からのV L P出芽の原理を図示したものである。

【図2】(膜に結合していない)ターゲット分子のV L P被包の原理を図示したものである。

【図3】結晶膜に結合したターゲット分子のためのV L P提示の原理を図示したものである。

【図4】ヒト表皮成長因子(E G F)レセプター(E G F R)に例示されるような単一のトランスメンブランスパニングドメインを含む膜挿入蛋白質のためのV L P提示の原理を示す。

【図5】タグされたシグナル及びターゲット分子を共発現するホスト細胞から発現されたヒトE G Fレセプター(E G F R)のウエスタンブロット分析を表す。

【図6】膜小胞上、並びにタグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する

宿主細胞から放出されたVLP類の表面上で発現されたヒトEGFレセプターのレセプター結合分析を示す。

【図7】ヒトエンドセリンAレセプターに例示されるような多数のトランスメンブランスパニングドメインを含む膜挿入蛋白質のためのVLP提示ストラテジーを表す。

【図8】タグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出されたVLP類の表面上で発現されたヒトエンドセリンAレセプターのウエスタンブロット分析を示す。

【図9】膜小嚢上、並びにタグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出されたVLP類の表面上で発現されたヒトET_Aのレセプター結合分析を示す。

【図10】膜小嚢及びVLP類上のヒトET_Aレセプターの特異性を表す。

【図11】EGFP分子（強化型GFP分子）に例示されるような細胞質内で見られる蛋白質のための、膜に結合していないターゲットのVLP被包を示す。

【図12】タグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出されたVLP類のキャプシド内で発現されたEGFPのウエスタンブロット分析を示す。

【図13】タグされたシグナル及びターゲット分子を共発現する宿主細胞から放出された蛍光VLP類のFIDA検出及び定量分析を表す。

【図14】アゴニストによって誘発された、膜に基づくレセプターの刺激の検出のためのVLPに基づくレポーター分析の原理を示す。

【図15】Gag融合レポーター遺伝子生成物の合成を引き起こす、ホルスコリンによって誘発された細胞内cAMPの蓄積の効果を示す。

【図16】図15のGag-EGFPレポーター分析のFIDA分析を表す。

【図17】VLPに基づくトランスロケーション分析の原理を示す。

【図18】VLPに基づく蛋白質-蛋白質相互作用分析の原理を表す。

【図19】細胞内で発現された蛋白質及びシグナル及びターゲット融合分子を共発現する宿主細胞から放出されたVLP類内に取り込まれた蛋白質の両方のウエスタンブロット分析を示す。

【図20】VLPに基づく細胞 - 細胞分析の原理を示す。

【図21】VLPに基づく分析技術の概観を表す。

【図22】本発明の好ましい態様を表す。

【図23】本発明のもう1つの好ましい態様を表す。

【図24】アゴニストの不存在下での、シグナルカスケードに関する成分と、導入されたcDNA生成物との相互作用を示す。

【图1】

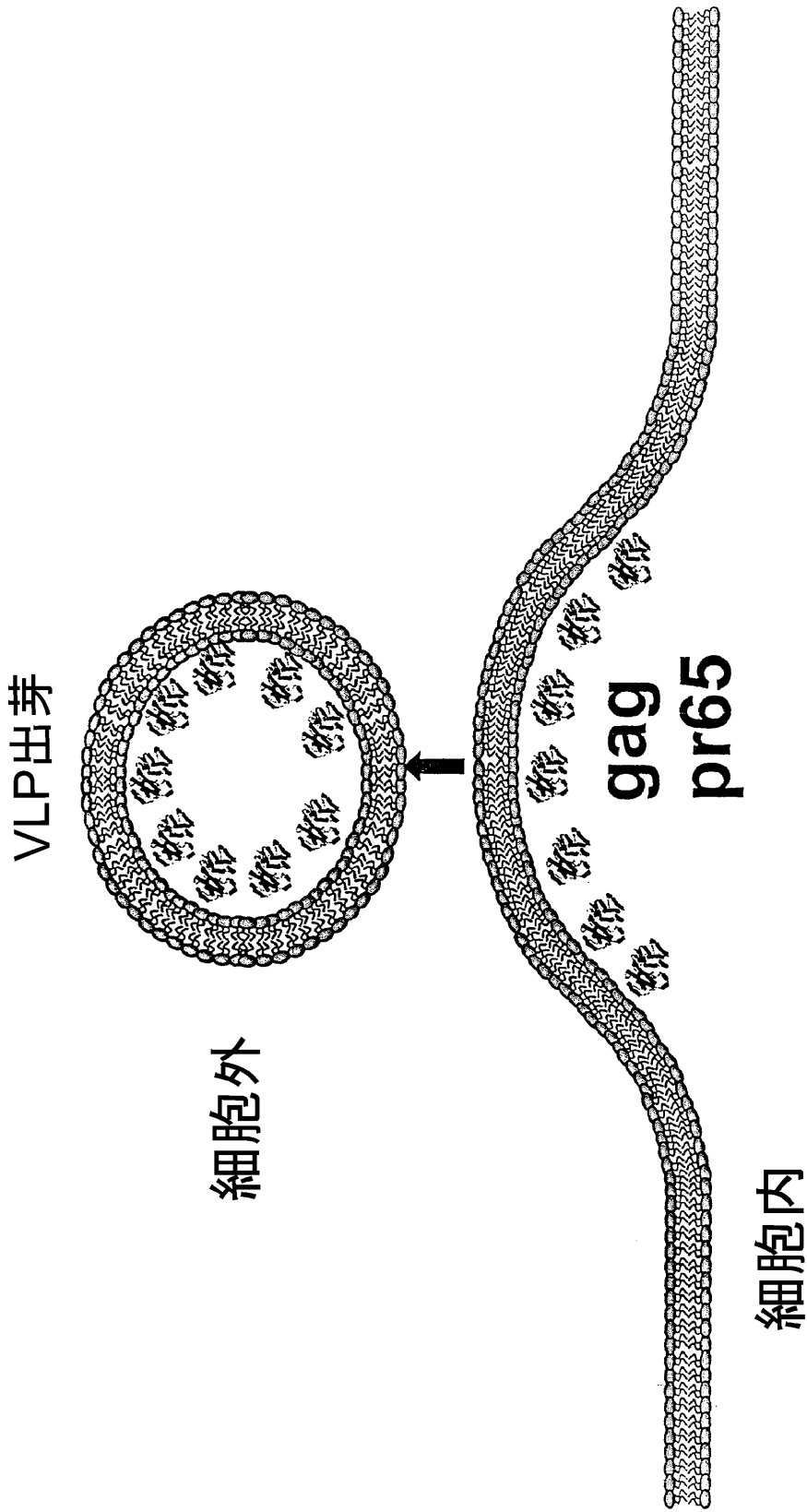


图1

【图2】

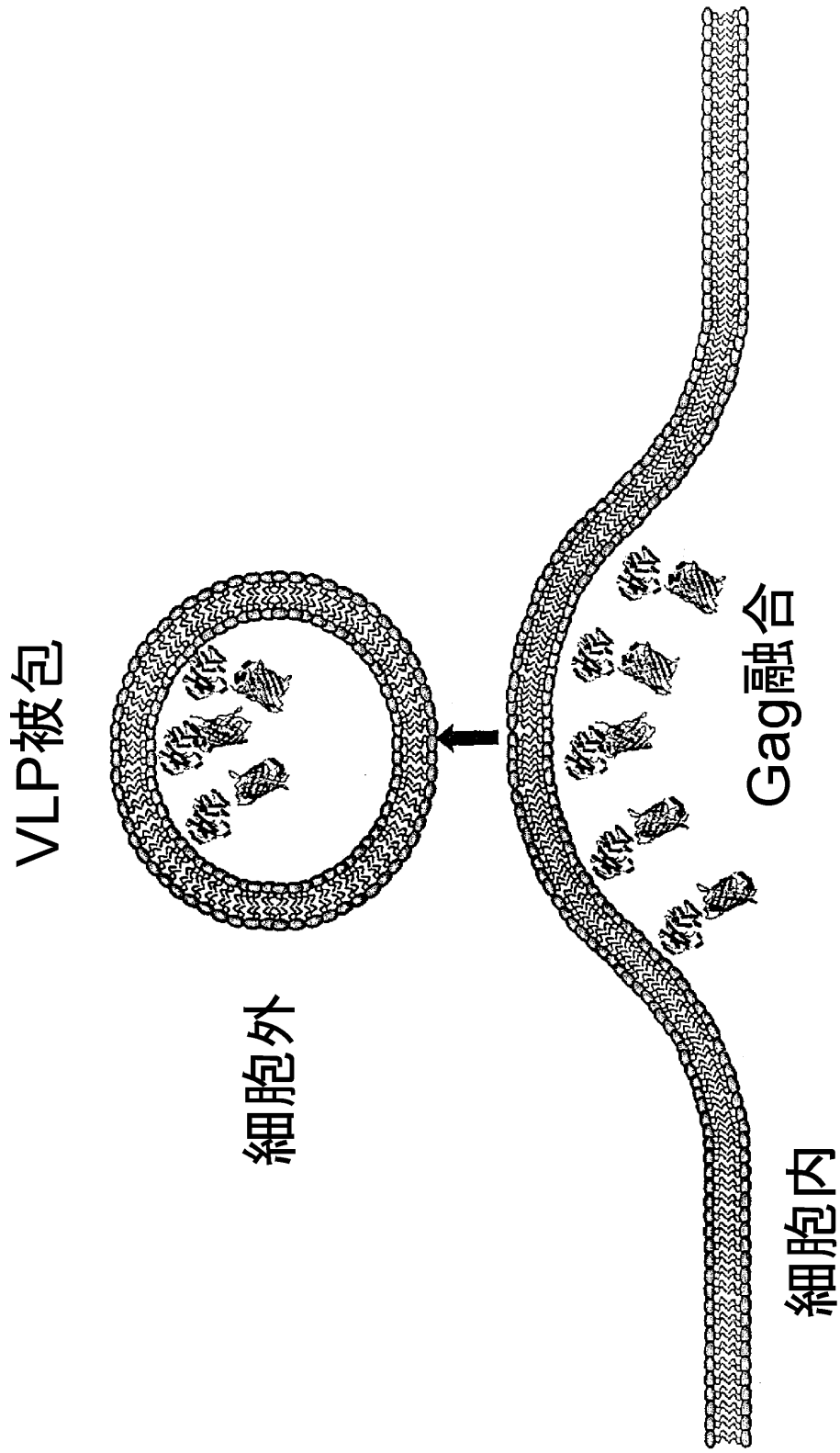


图2

【図3】

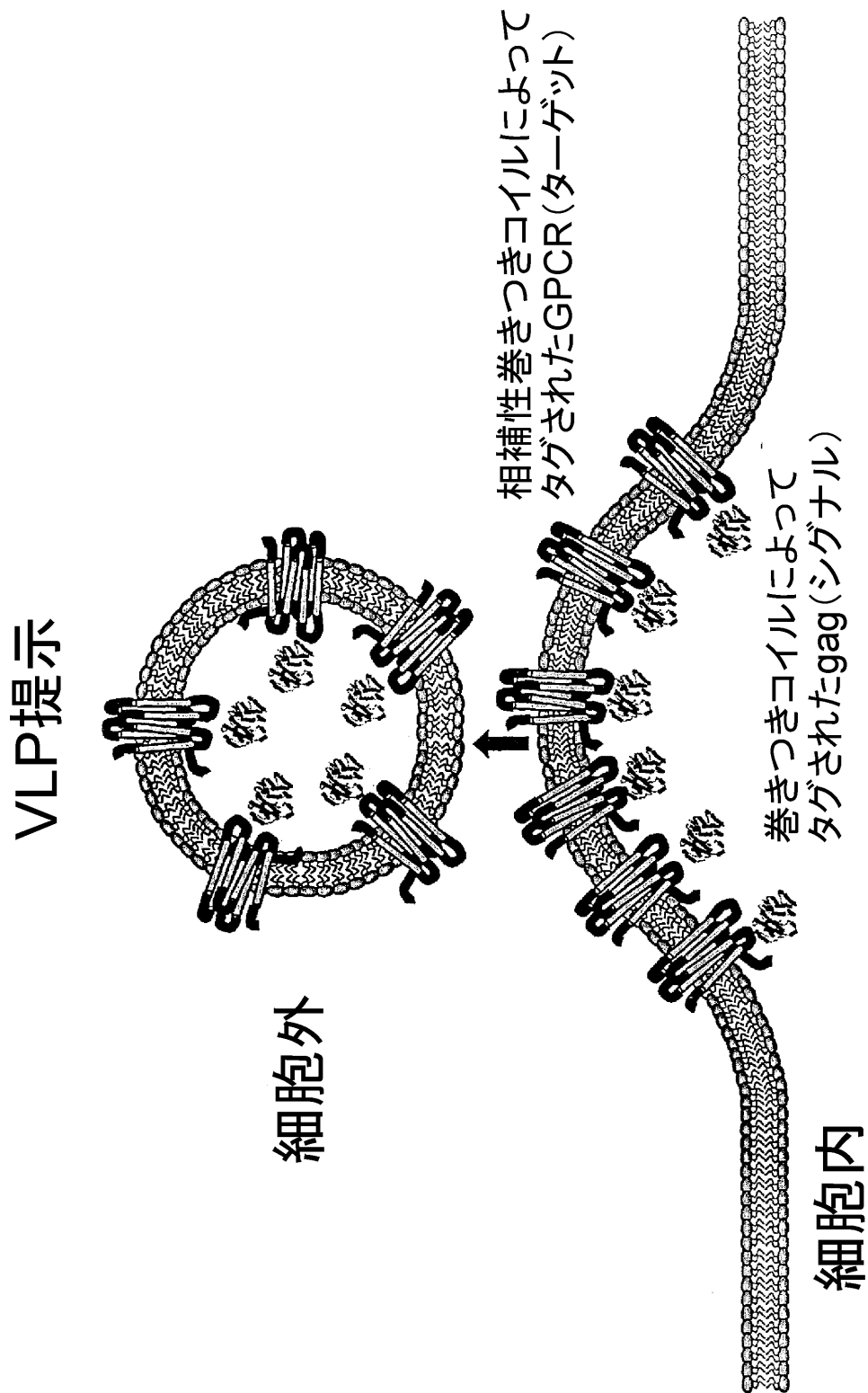


図3

【図4】

ヒトEGFレセプターに例示されるような
単一トランスメンブランスパニングドメインを含むターゲット

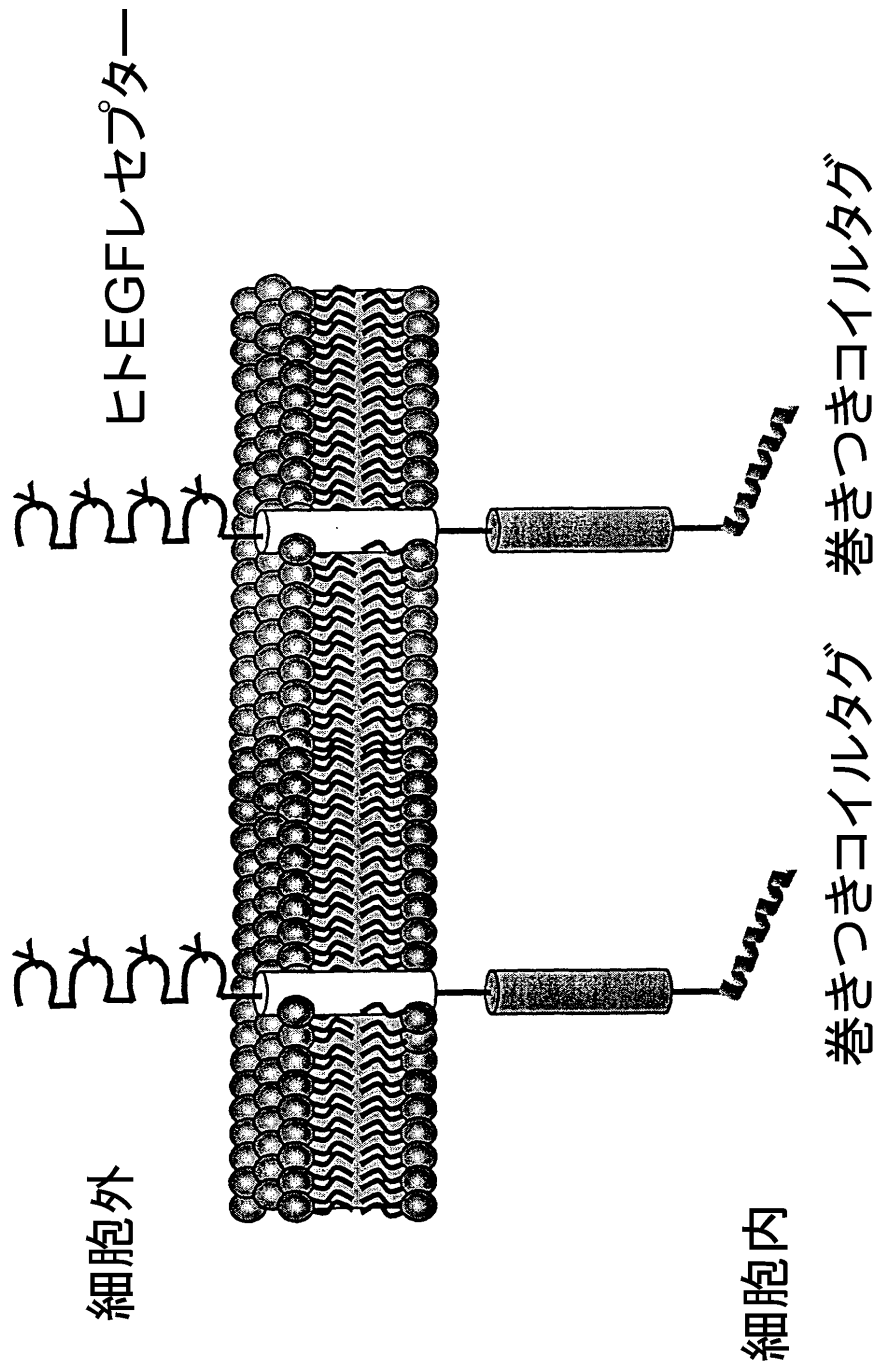


図4

【図5】
VLP類の表面上でのヒトEGFLレセプター発現

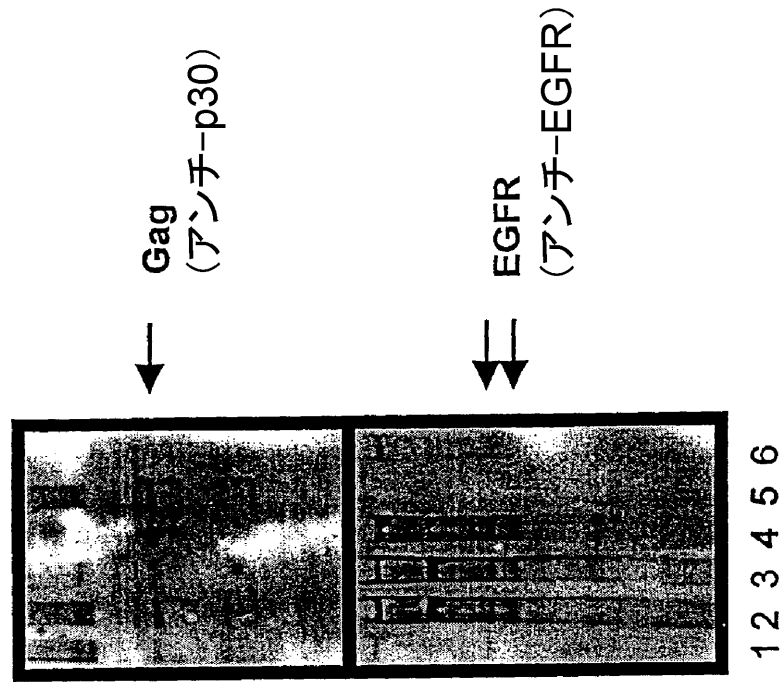


図5

【図6】

膜小囊及びVLP類上のヒトEGFレセプターへの
TAMRAラベル化EGFの結合

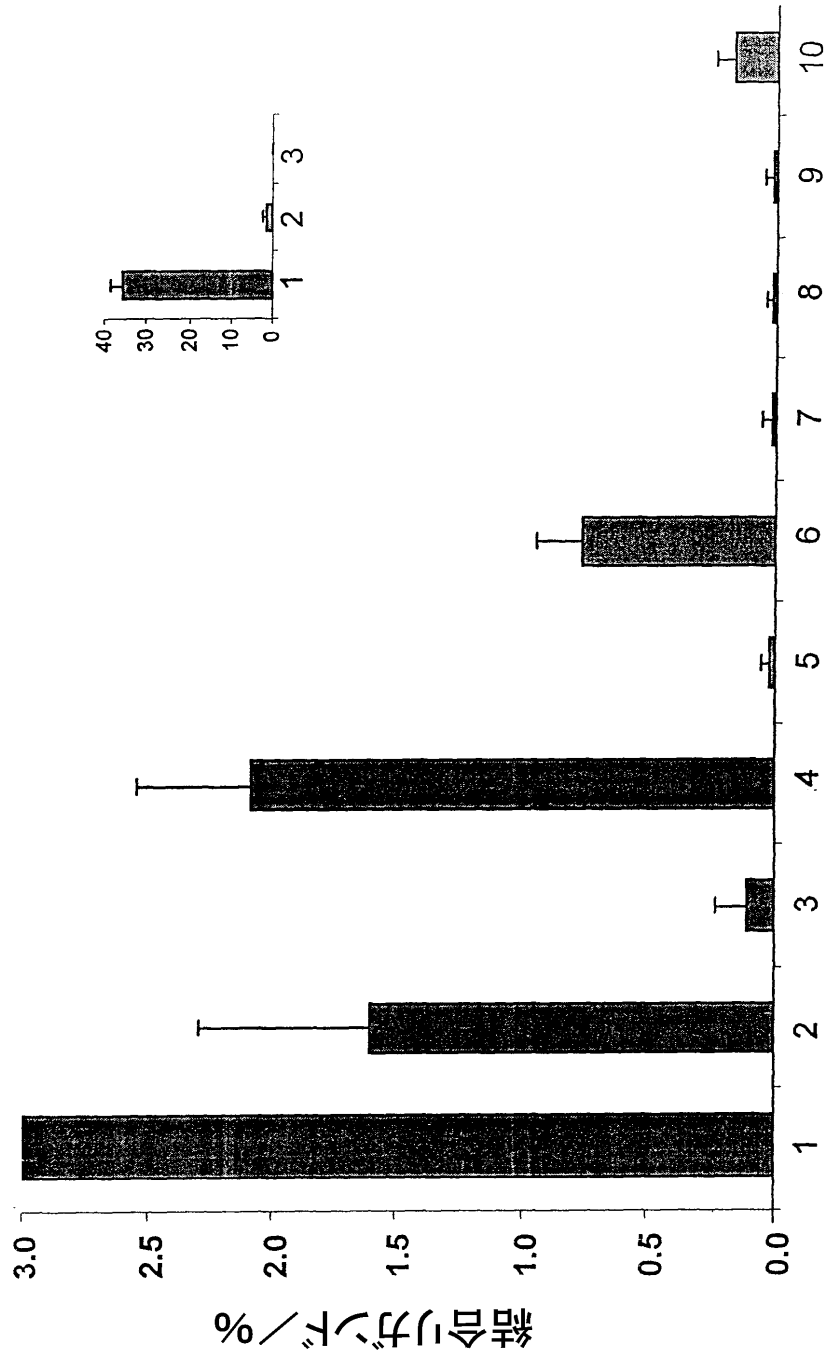


図6

【図7】
ヒトエンドセリンAレセプターに例示されるような多数の
トランスメンブランスパニングドメインを含むターゲット

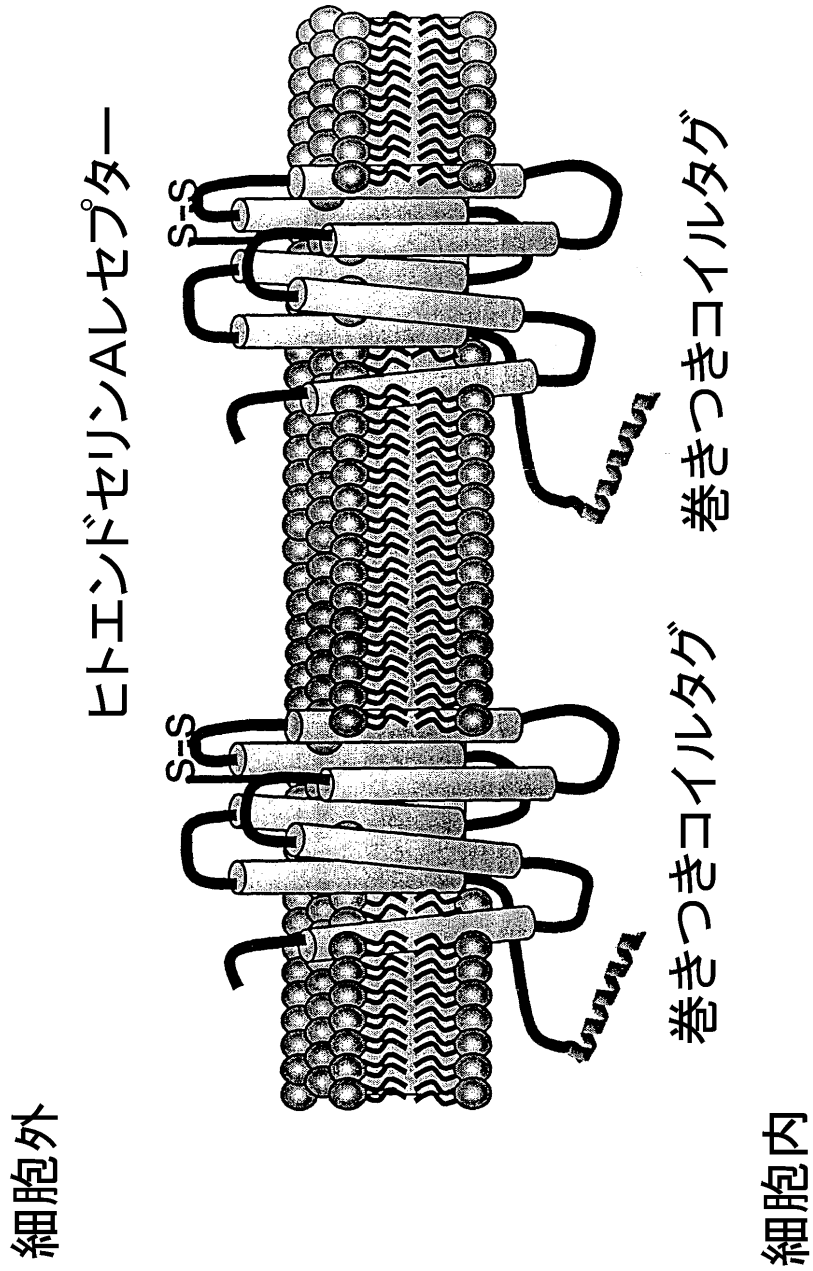


図7

【図8】

VLP類の表面上でのヒトエンドセリンAレセプター発現

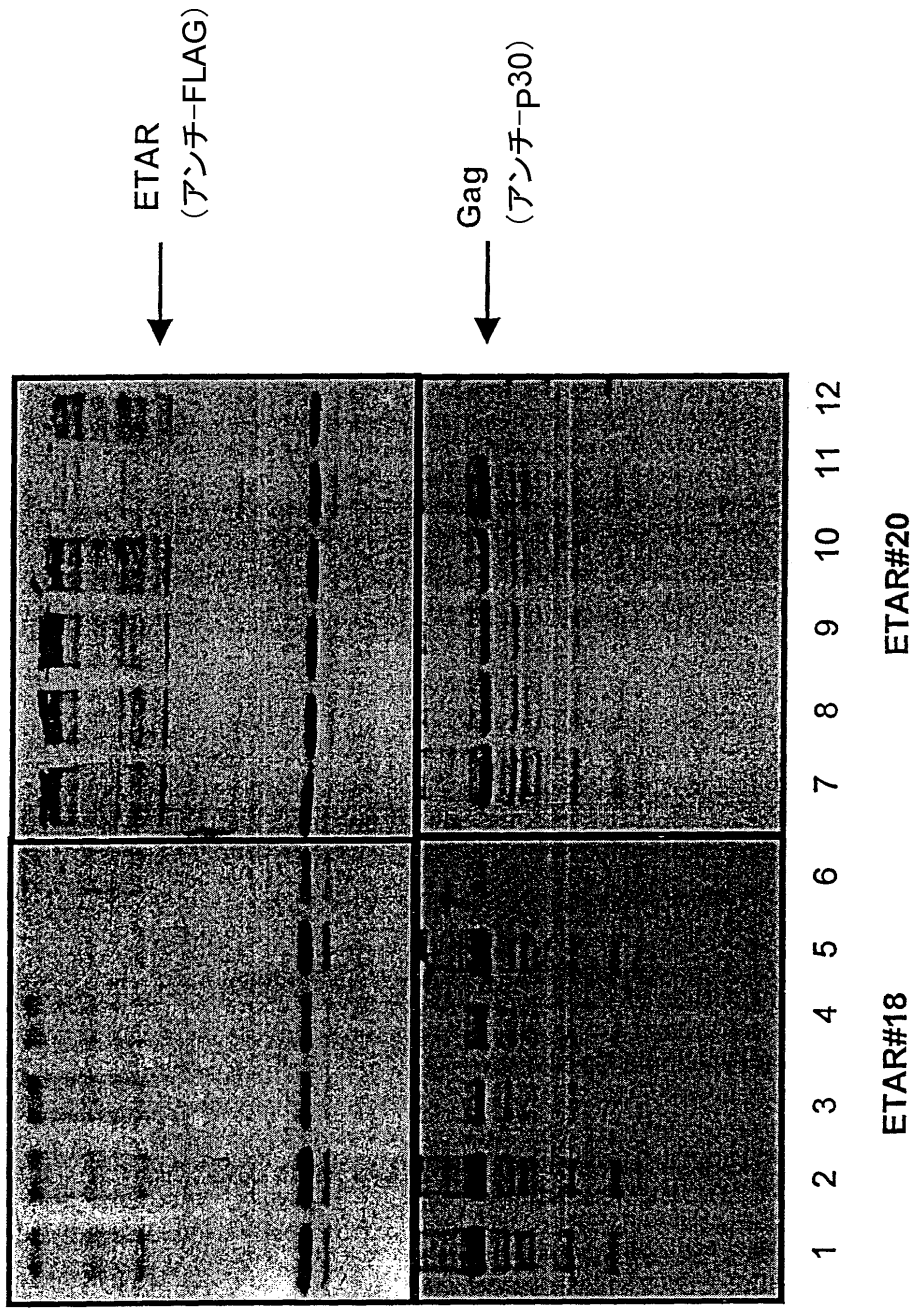


図8

【図9】

膜小囊及びVLP類上でのヒトETLレセプターへの
TAMRAラベル化エンドセリン-1の結合

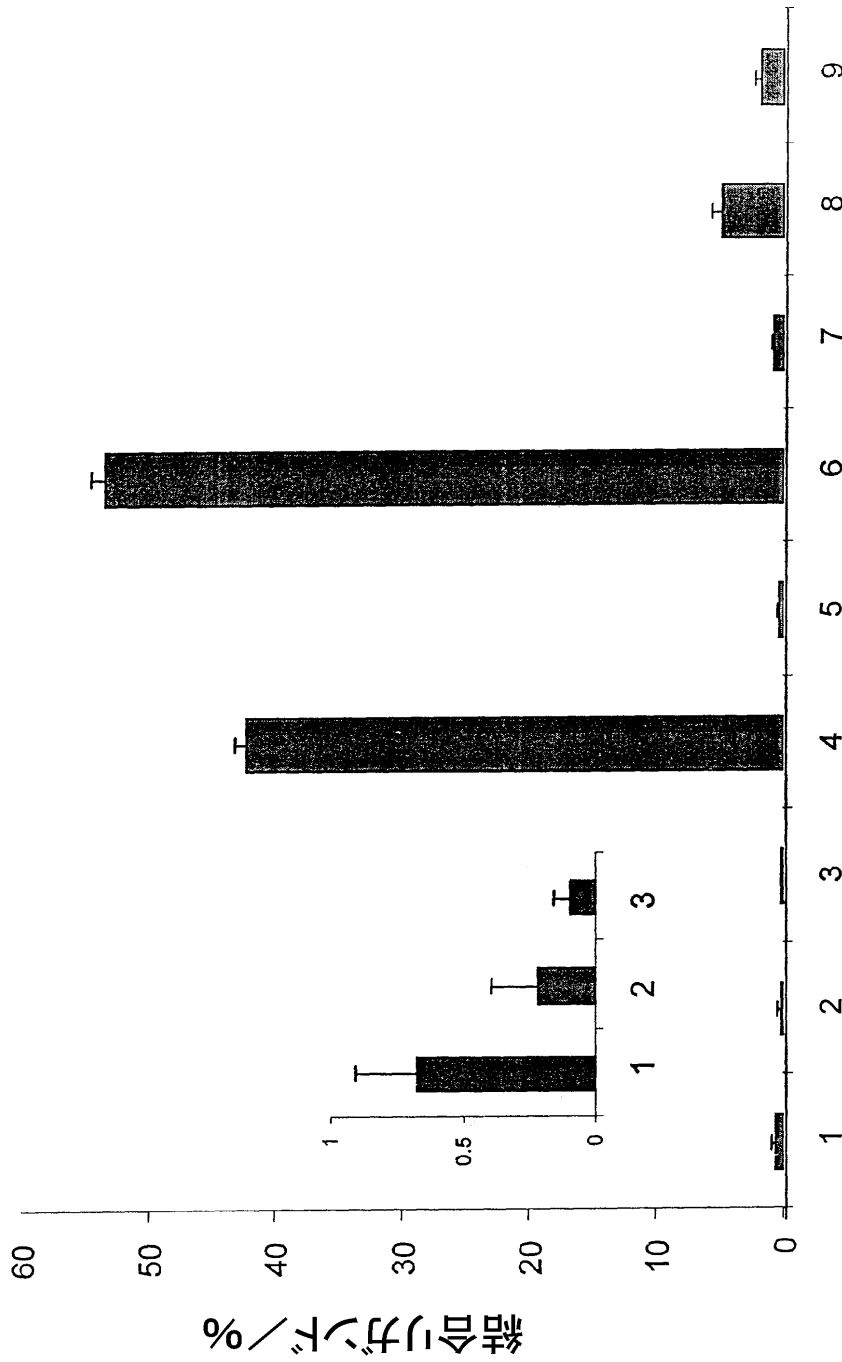


図9

【図10】

VLP類上のヒトETLレセプターの特異性

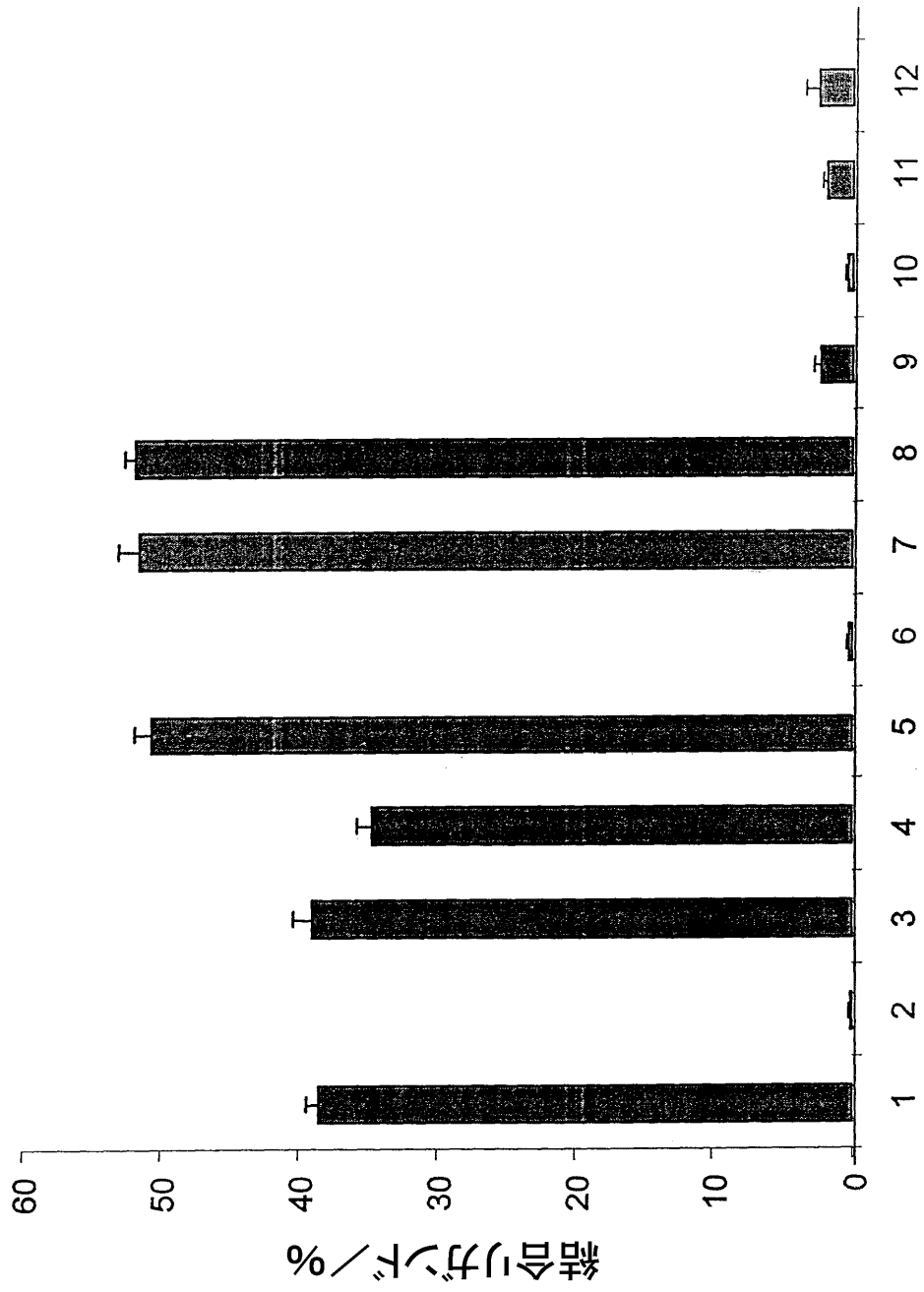


図10

【図11】

被包を引き起こすGag-Pr65EGFP相互作用

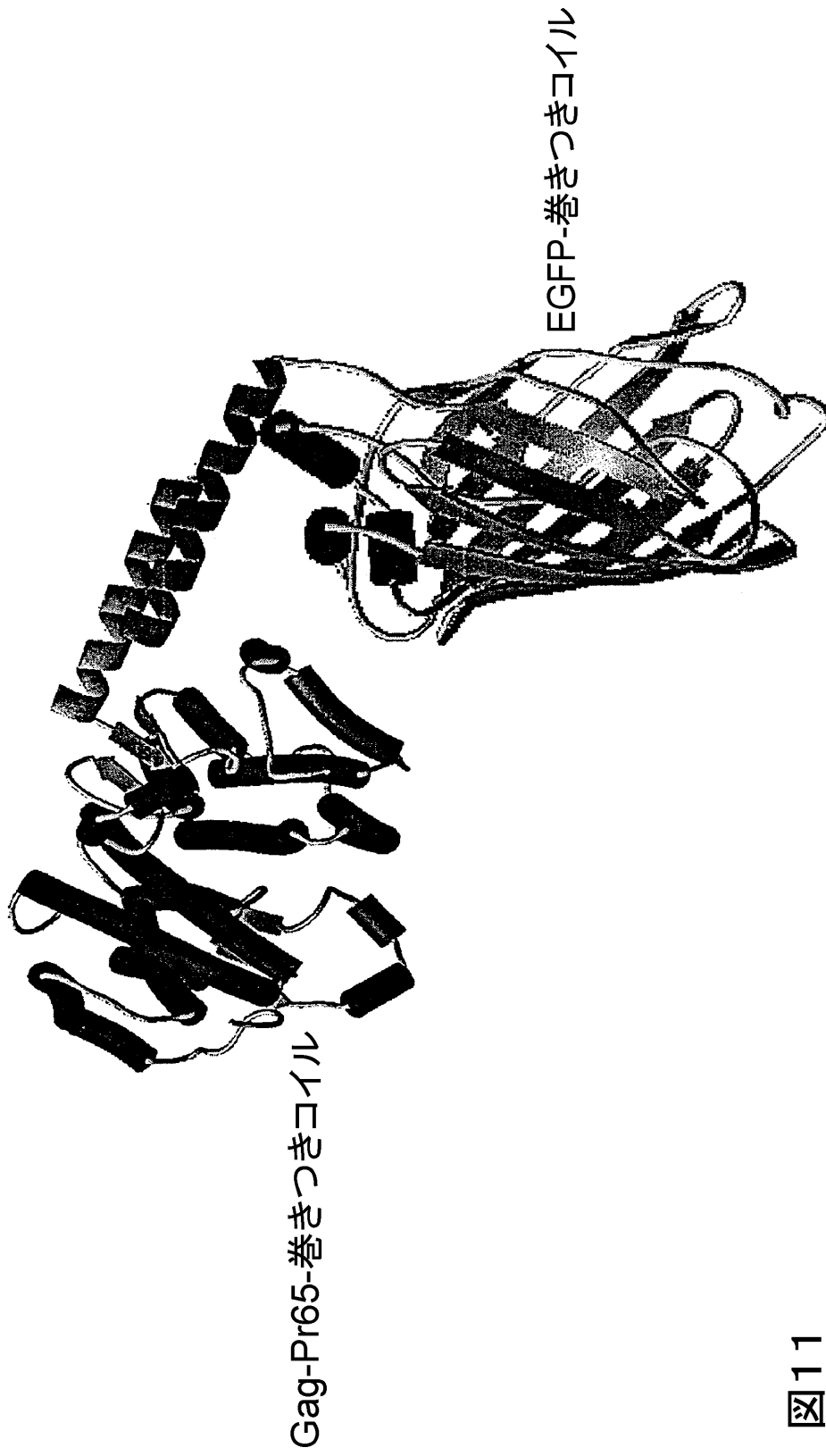


図11

【図12】

細胞培養上清中のVLP巻きつきコイル相互作用

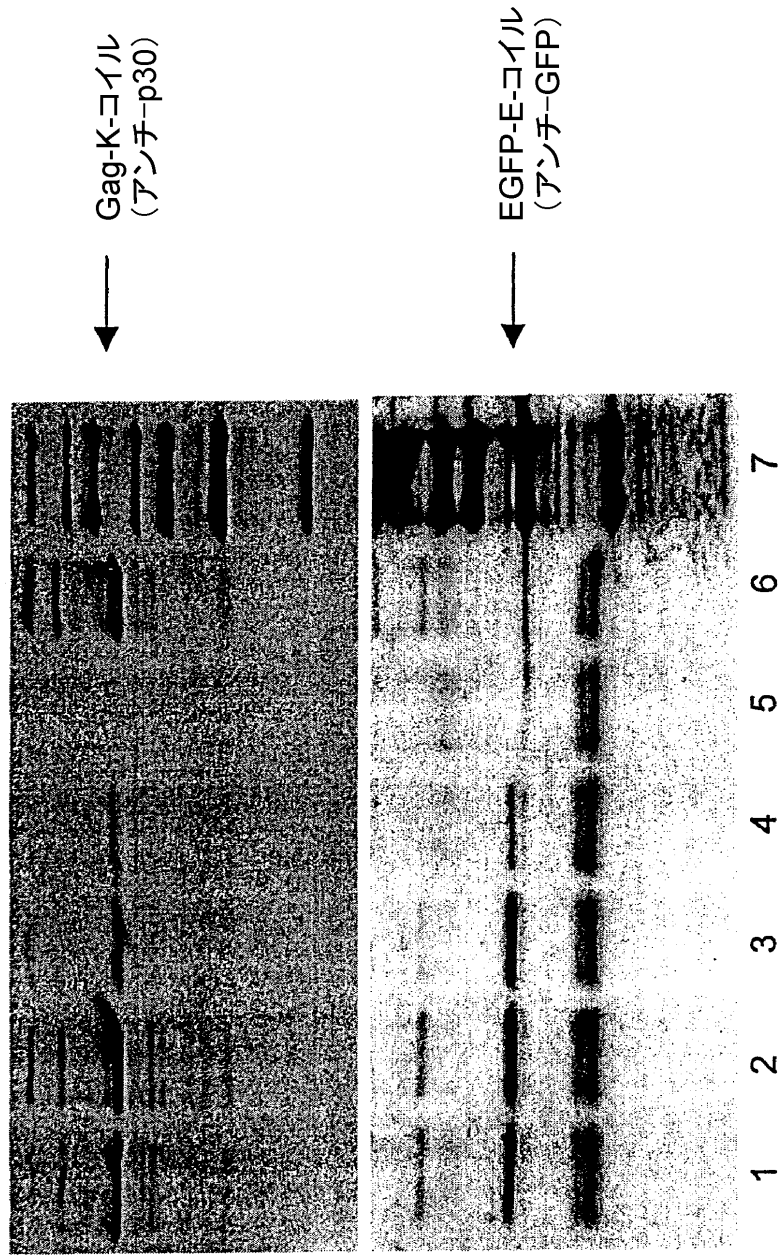


図12

【図13】

FIDAによる蛍光VLP類の定量分析

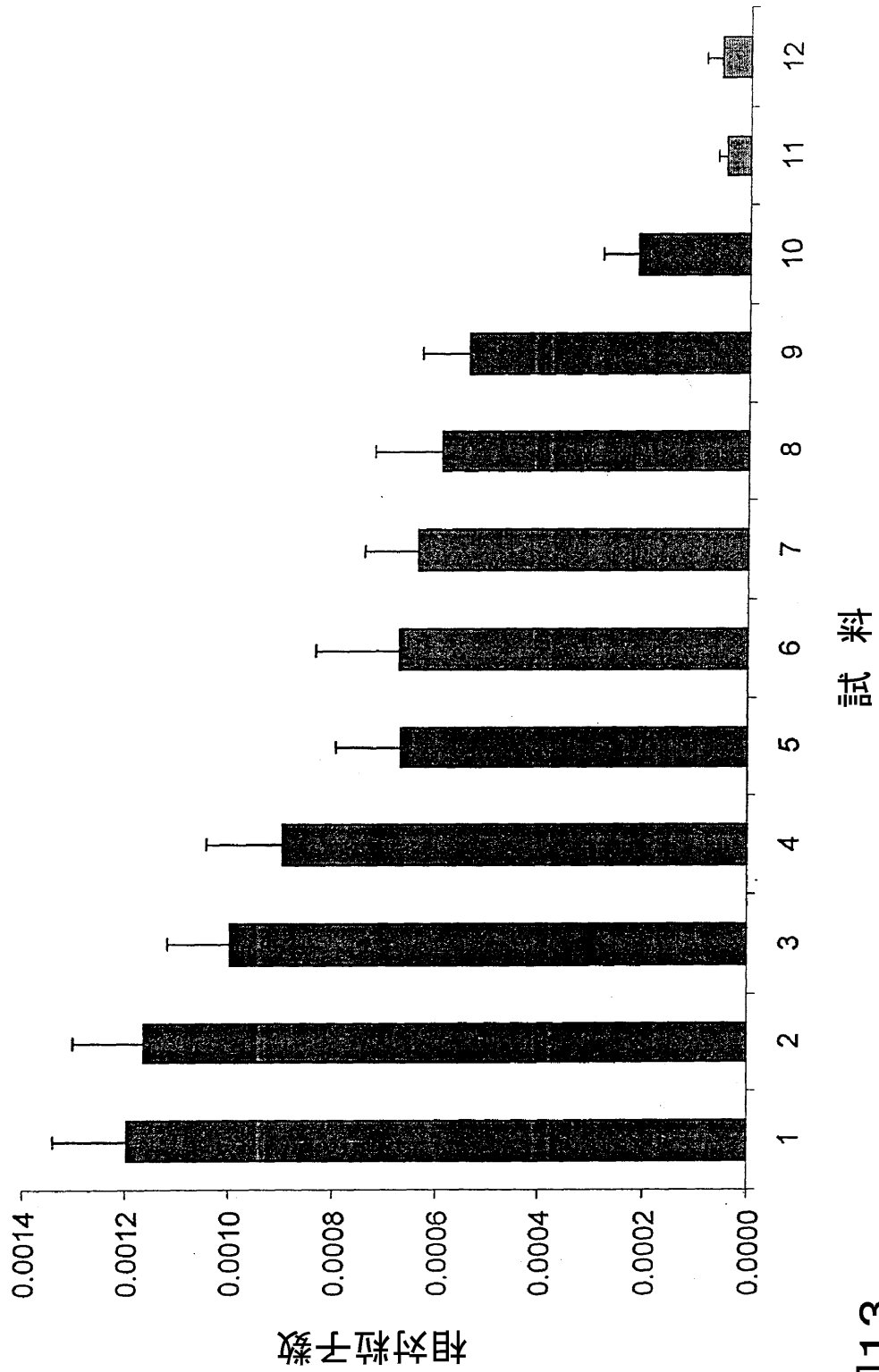


図13

【図14】

VLPに基づくレポーター分析

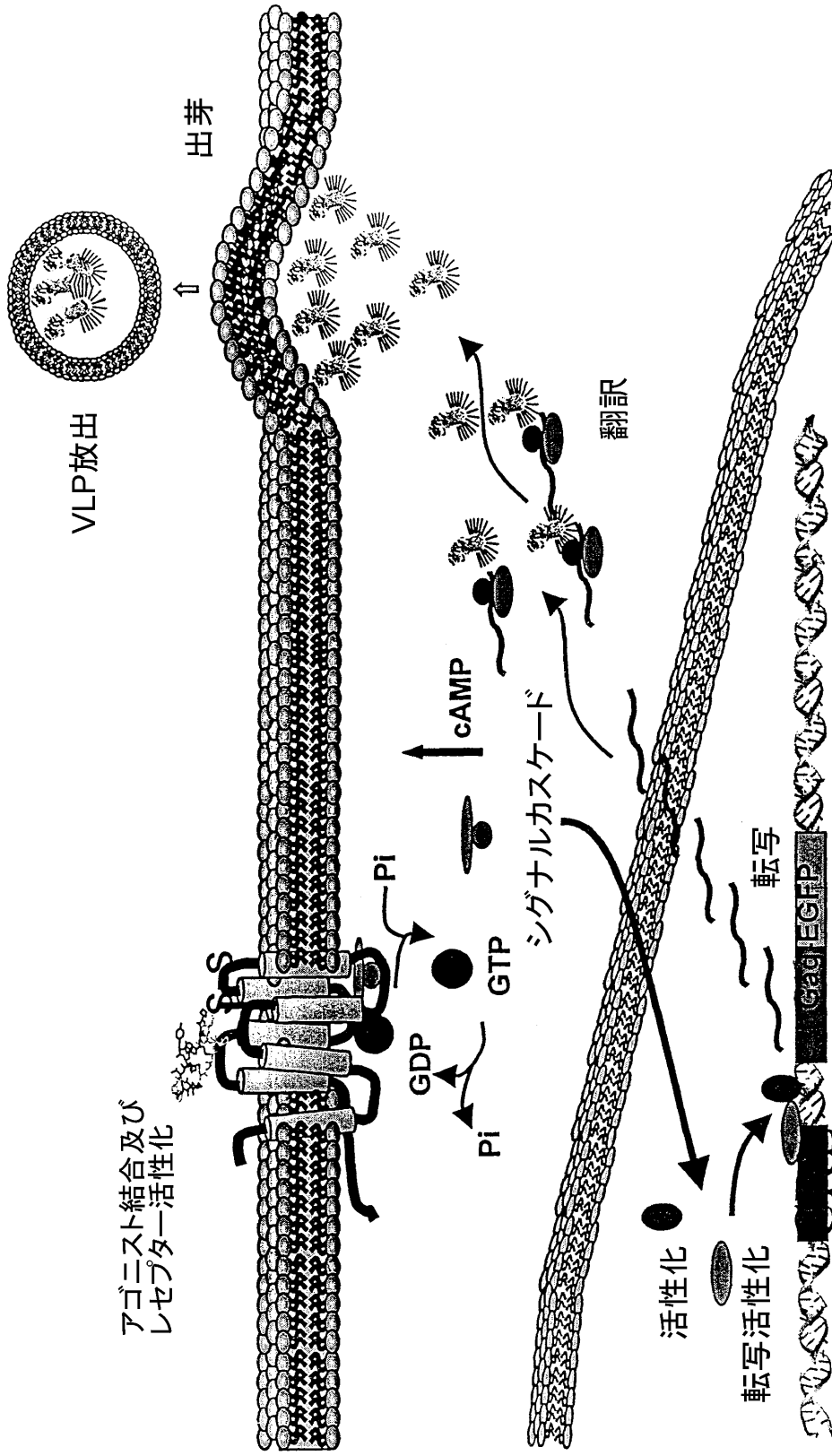


図14

【図15】

VLPに基づくレポーター分析

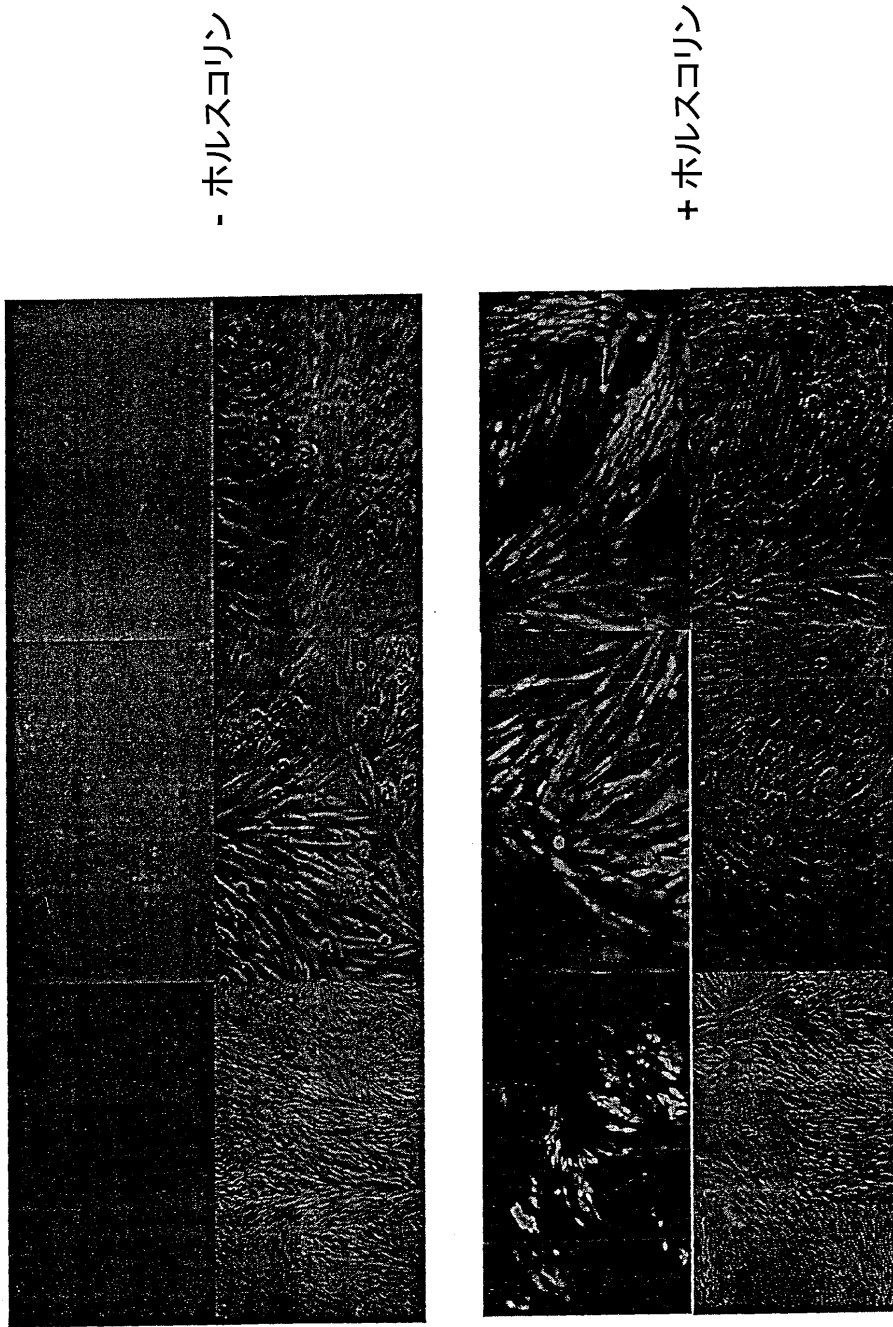


図15

【図16】

Gag-EGFPレポーター分析のFIDA分析

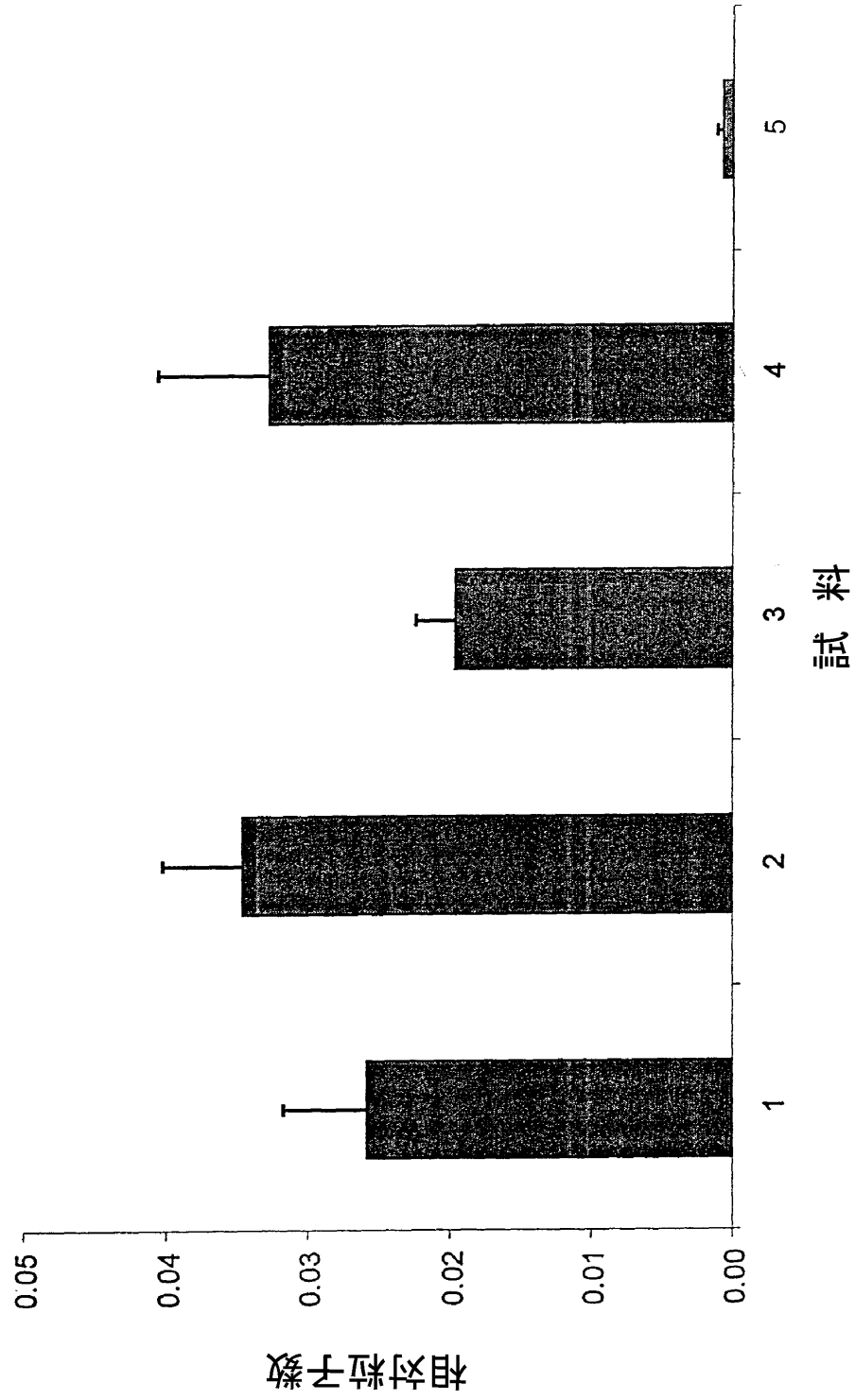


図16

【図17】

VLPに基づく蛋白質トランスロケーション分析

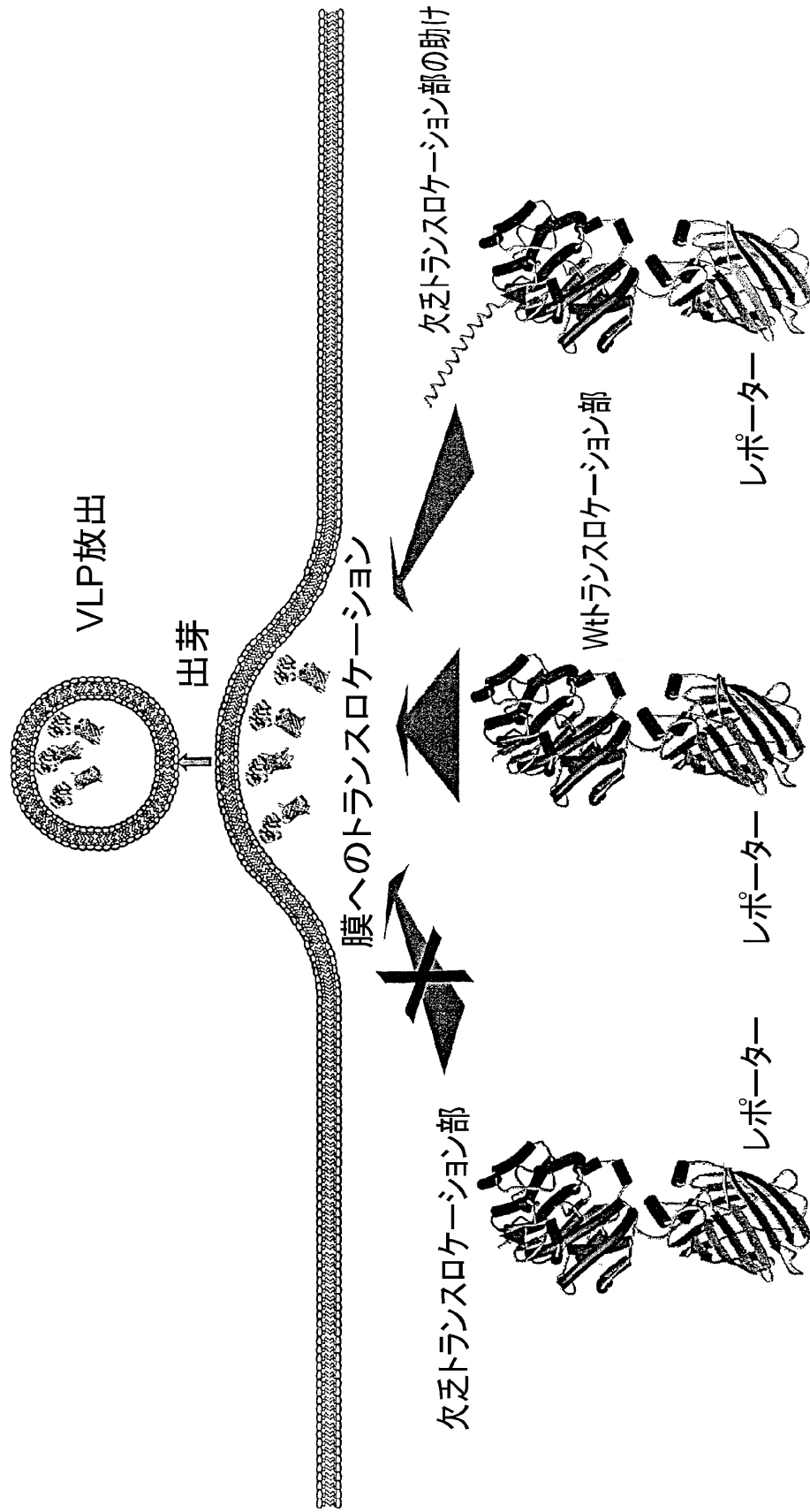


図17

【図18】

VLPに基づく蛋白質-蛋白質相互作用分析

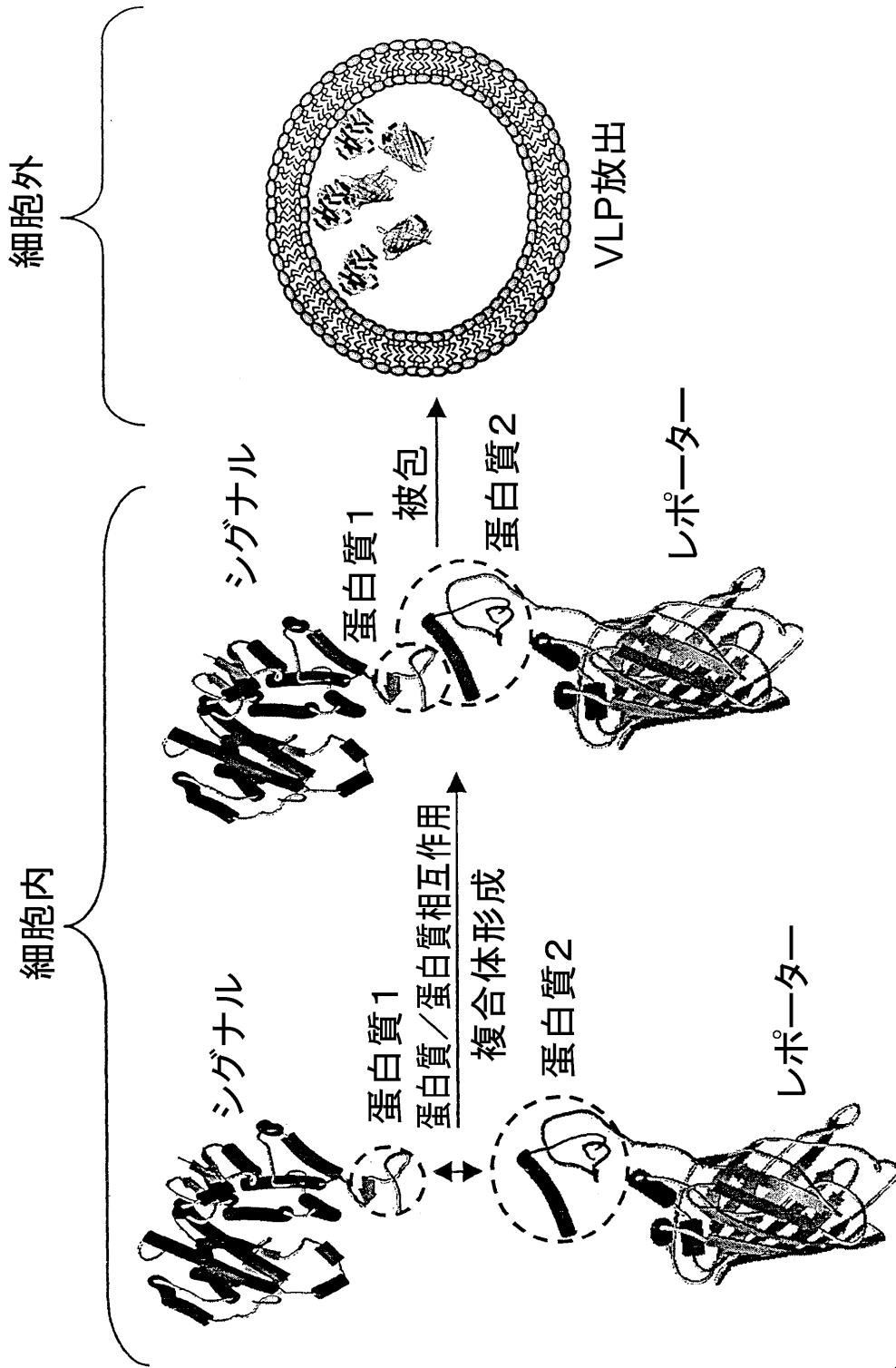


図18

【図19】

VLPに基づく蛋白質-蛋白質相互作用分析

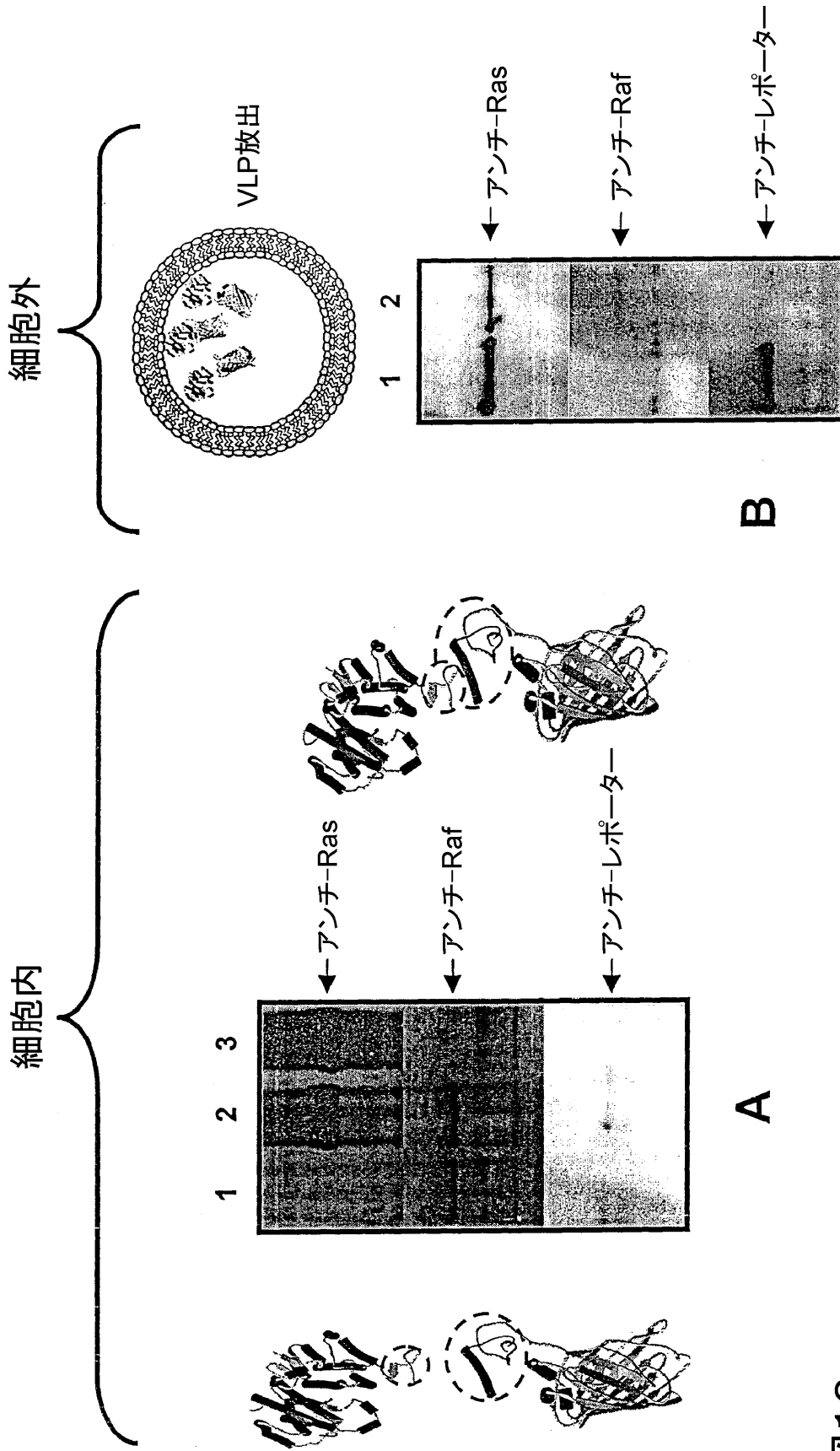


図19

【図20】

VLPに基づく細胞-細胞相互作用分析
相同性又は非相同性相互作用

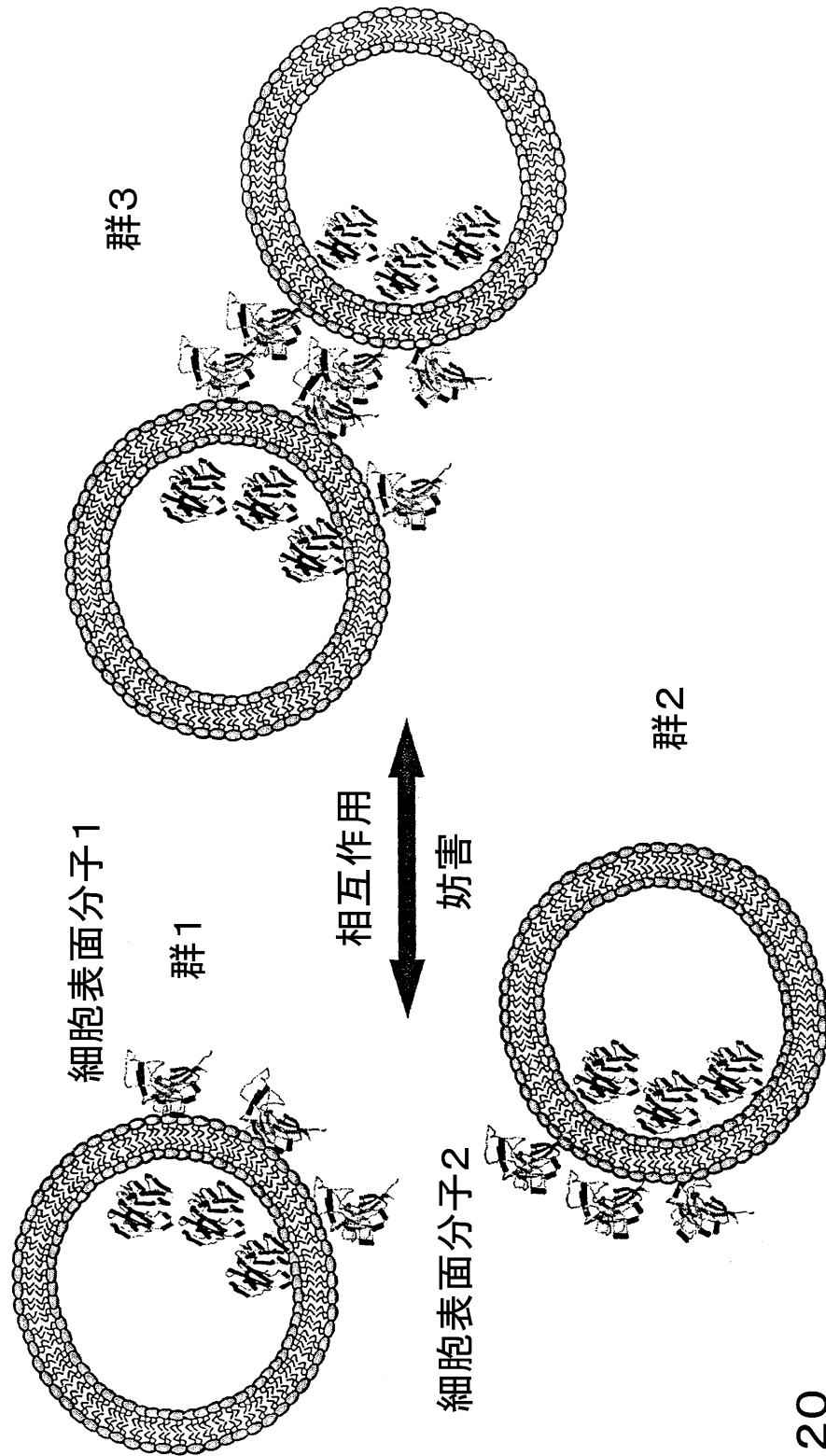


図20

【図21】

VLPに基づく分析技術

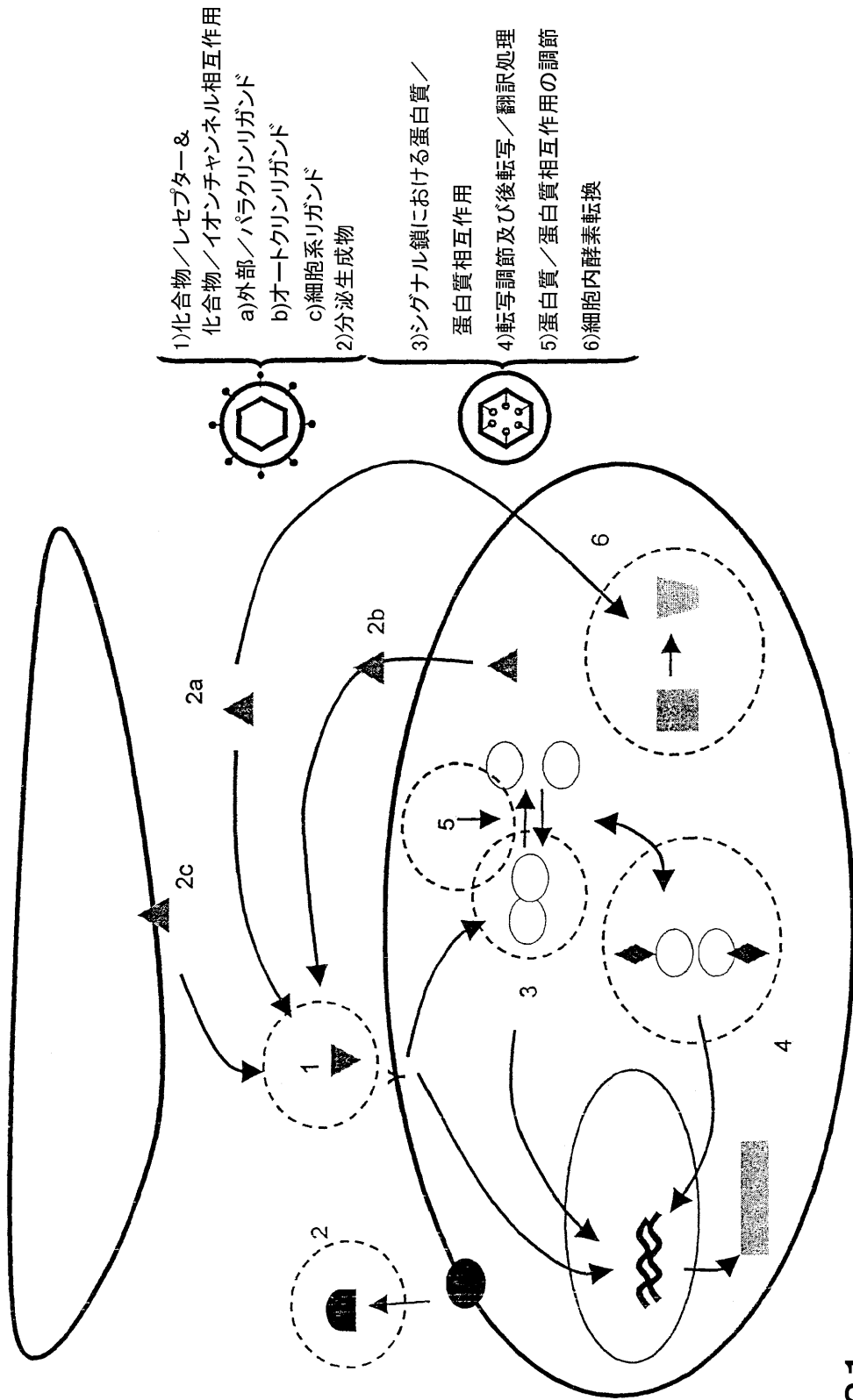


図21

【図22】

VLP法を用いる遺伝的配列の生物学的機能の解読

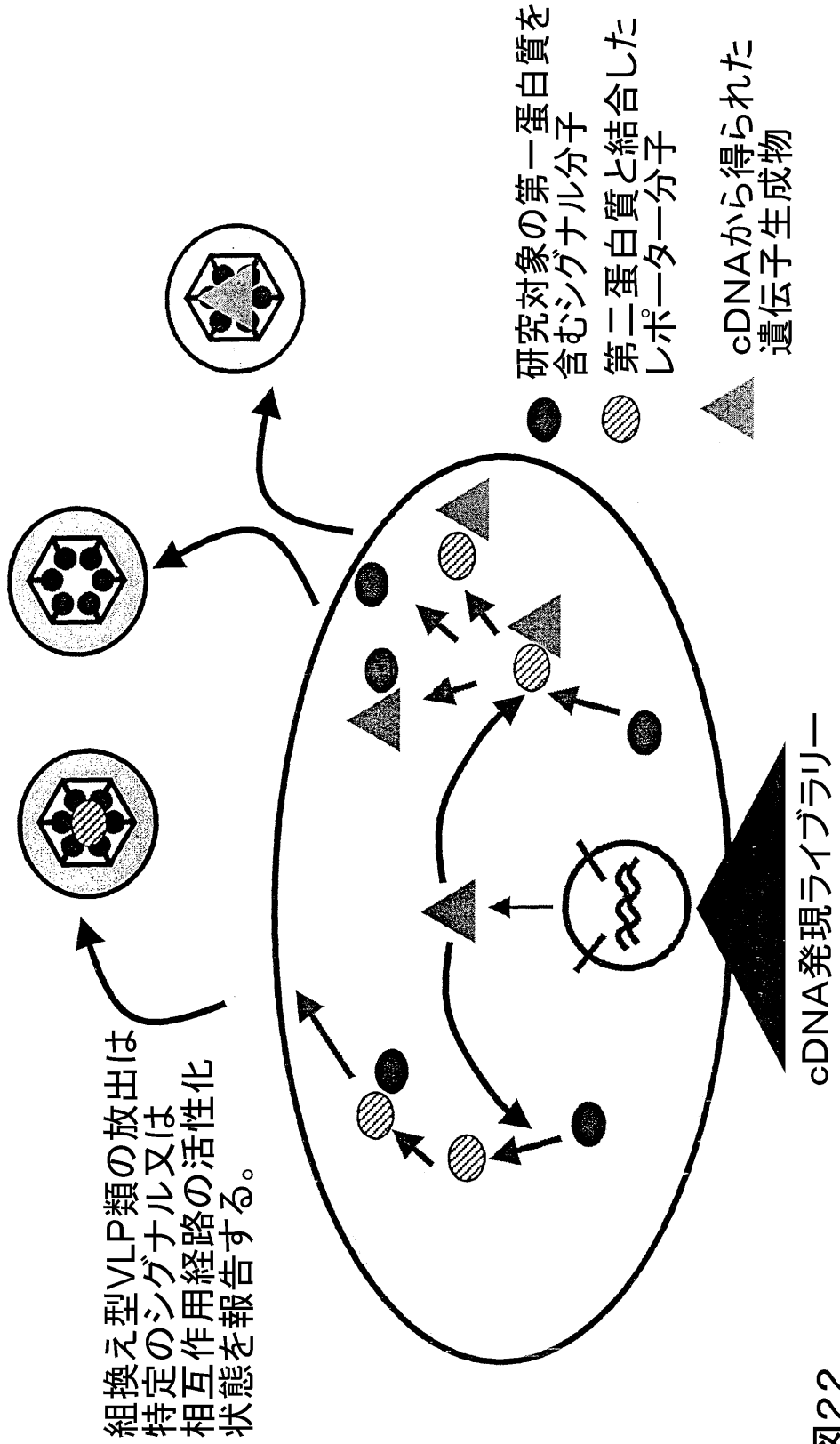


図22

【図23】

VLP法を用いる遺伝的配列の生物学的機能の解読

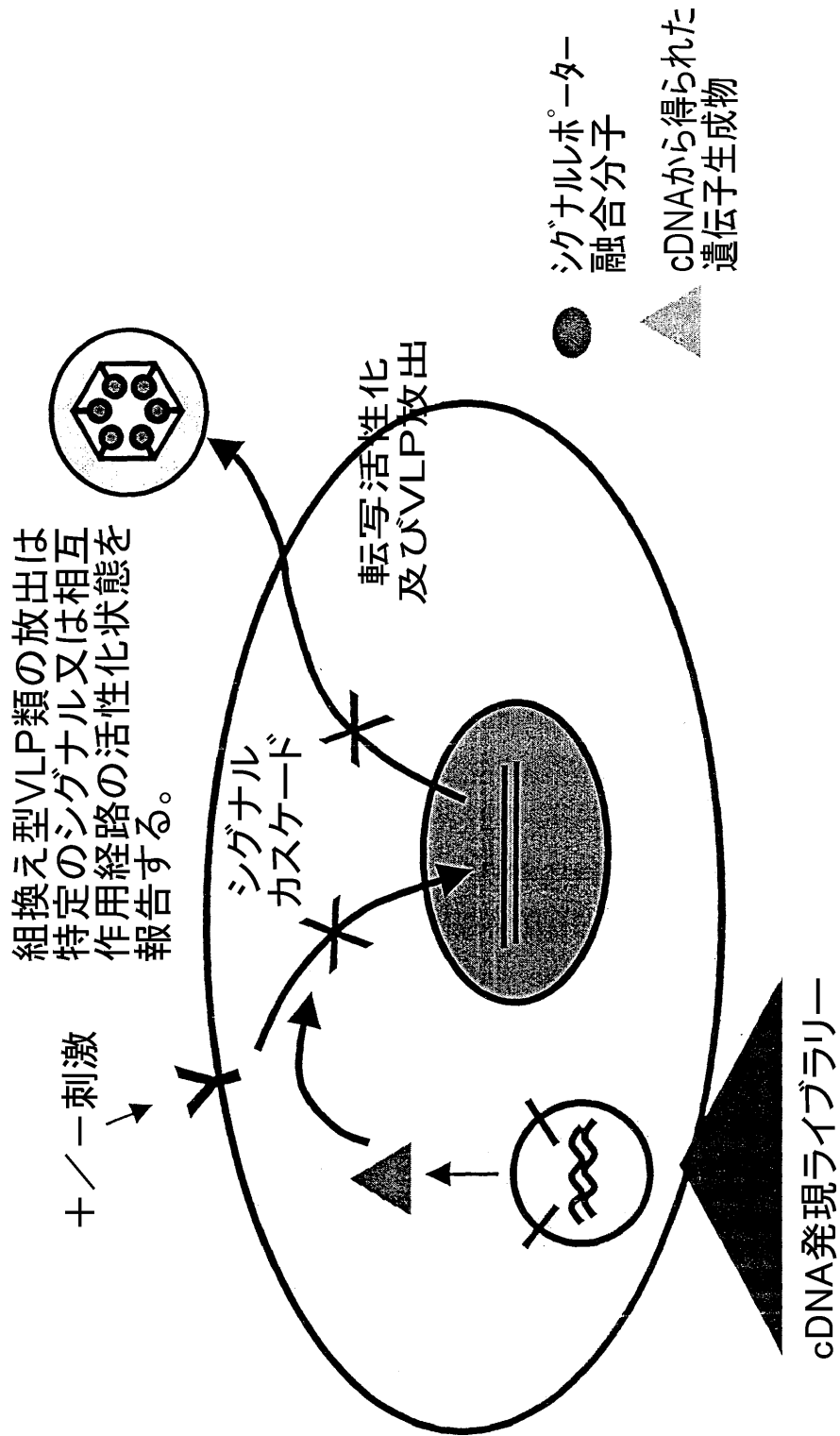


図23

【図24】

VLP法を用いる遺伝的配列の生物学的機能の解読

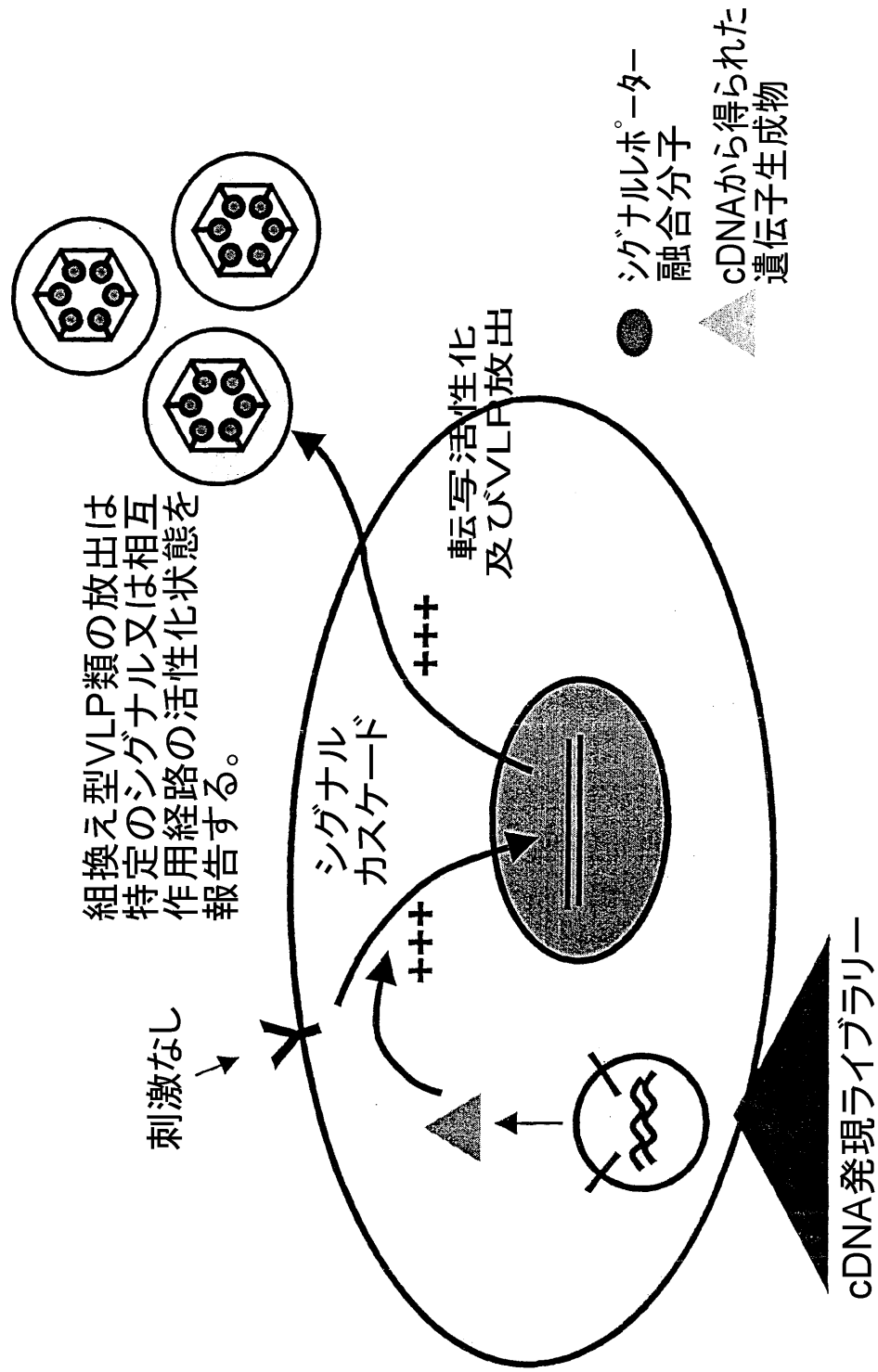


図24

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/06144

| | | |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/86 C12Q1/70 G01N33/58 | | |
| 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 C12N C07K A61K 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) PAJ, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P, X | EP 0 960 942 A (INTROGENE BV) 1 December 1999 (1999-12-01) claims page 2, line 49 -page 3, line 15 page 6, line 11 - line 19 --- | 1-24, 44-58 |
| P, X | EP 0 959 135 A (INTROGENE BV) 24 November 1999 (1999-11-24) claims page 2, line 43 -page 3, line 3 page 6, line 10 - line 18 example 4 --- | 1-24, 44-58 |
| P, X | WO 99 50424 A (STANLEY MARGARET ANNE ;ZHANG WEI (GB)) 7 October 1999 (1999-10-07) claims page 2, line 11 - line 24 --- | 1-24, 44-58 |
| -/- | | |
| <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 : | | *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 |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | *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 |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date | | *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. |
| *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) | | *B* document member of the same patent family |
| *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 | | |
| Date of the actual completion of the international search 10 May 2001 | Date of mailing of the international search report 22.05.2001 | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Routledge, B | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 00/06144

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P, X | WO 00 29555 A (LAROCCA DAVID ;BAIRD ANDREW (US); KASSNER PAUL (US); SELECTIVE GEN) 25 May 2000 (2000-05-25) claims 1-4,10,16,24,30-32,38,66-68,76,80,90,113,1 16 page 10, line 5 - line 18 page 14, line 1 - line 9 page 16, line 9 - line 21 page 32, line 20 -page 33, line 25 | 44-75 |
| P, X | WO 00 09157 A (LOWE ROBERT S ;JOYCE JOSEPH G (US); MERCK & CO INC (US); COOK JAME) 24 February 2000 (2000-02-24) claims page 2, line 8 - line 26 page 4, line 15 -page 5, line 32 | 1-24, 44-58 |
| P, X | WO 99 35282 A (KEES URSULA R ;WATT PAUL M (AU); TVW TELETHON INST CHILD HEALTH (A) 15 July 1999 (1999-07-15) claims page 15, line 4 - line 7 page 16, line 10 - line 15 | 44-75 |
| X | EP 0 768 377 A (PROTEIN ENG CORP) 16 April 1997 (1997-04-16) claims page 12, line 23 - line 34 | 59-75 |
| X | WO 99 29723 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;PENTAMER PHARMACEUTICALS (US)) 17 June 1999 (1999-06-17) claims page 6, line 27 - line 32 page 17, line 4 -page 18, line 19 | 1-24,50, 53 |
| X | WO 98 49195 A (ROTTIER PETRUS JOSEPHUS MARIE ;UNIV UTRECHT (NL)) 5 November 1998 (1998-11-05) claims page 3, line 22 - line 31 page 13, line 21 -page 15, line 28 page 11, line 14 | 1-24, 44-58 |
| X | WO 98 28004 A (GOWANS ERIC JAMES ;CROWN IN THE RIGHT OF THE QUEE (AU); MACNAUGHTO) 2 July 1998 (1998-07-02) claims page 10, line 9 - line 18 | 1-24, 44-58 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/06144

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 98 02548 A (US HEALTH ;LOWY DOUGLAS R (US); SCHILLER JOHN T (US); RODEN RICHA) 22 January 1998 (1998-01-22) claims page 2, line 22 -page 3, line 3 page 4, line 5 - line 12 --- | 1-24,50, 53 |
| X | WO 97 40381 A (XENOGEN) 30 October 1997 (1997-10-30) claims page 6, line 12 - line 24 page 7, line 17 - line 33 page 8, line 12 - line 21 page 10, line 23 -page 11, line 11; figures 1,2,4 page 13, line 12 - line 18 page 23, line 24 - line 32 --- | 25-94 |
| X | WO 96 35798 A (INTROGENE BV ;VOGELS RONALD (NL); BOESEN JOHANNES JOZEPHES BERNA ()) 14 November 1996 (1996-11-14) claims 1-10,18-20 --- | 1-24,50, 53 |
| Y | page 4, line 13 - line 22 page 9, line 5 - line 19 example 5 --- | 1-24,50, 53 |
| X | WO 96 30523 A (WOLF HANS ;WAGNER RALF (DE); DEML LUDWIG (DE); OSTERRIEDER KLAUS ()) 3 October 1996 (1996-10-03) claims the whole document --- | 1-24,50, 53 |
| X | WO 94 20621 A (BRITISH BIO TECHNOLOGY ;CZAPLEWSKI LLOYD GEORGE (GB)) 15 September 1994 (1994-09-15) --- | 1-24, 44-58 |
| Y | page 7, paragraph 3 -page 10, paragraph 2 page 14, paragraph 2 -page 16, paragraph 3 page 17, paragraph 2 --- | 1-24,50, 53 |
| X | WO 94 02173 A (OXFORD UNIVERSITY ;ROY POLLY (GB)) 3 February 1994 (1994-02-03) claims page 4, paragraph 2 -page 5, paragraph 3 --- | 1-24,50, 53 |
| X | WO 88 03563 A (OXFORD GENE SYSTEMS) 19 May 1988 (1988-05-19) claims page 4, line 12 - line 32 page 6, line 12 - line 22 examples 1,8 --- | 1-24,50, 53 |
| | -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Patent Application No
PCT/EP 00/06144

| 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 5 885 808 A (EPENETOS AGAMEMNON ANTONIOU ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) claims | 1-24, 44-58 |
| X | DE 195 43 553 A (DEUTSCHES PRIMATENZENTRUM GMBH) 28 May 1997 (1997-05-28) claims page 2, line 32 -page 3, line 13 page 3, line 27 -page 4, line 17 | 1-24, 44-58 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 international application No.
 PCT/EP 00/06144
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-24, 50, 53(part)

Method to selectively incorporate or encapsulate proteinaceous target molecules into a virus like particle (VLP) comprising expressing in cells a first target molecule comprising first and second amino acid sequences and a signal molecule comprising first and second amino acid sequences wherein the first sequence of the signal molecule interacts in a non-covalent manner with the first sequence of the target molecule so as to incorporate or encapsulate said target molecule into the VLP, said ability being present due to the second amino acid sequence of the signal molecule, VLPs produced by said method, kit or medicament comprising said VLPs, use of said VLPs.

2. Claims: 25-43, 76-94

Method for identifying modulating compounds of cell surface protein mediated activity by detecting intracellular transduction of a signal generated upon interaction of said compound with said cell surface protein comprising the use of a reporter gene construct containing (a) transcriptional control element responsive to said intracellular signal generated by interaction of agonist of the said cell surface protein; (b) reporter gene that encodes a transcriptional signal molecule and which interacts with said control element wherein said signal molecules are able to assemble VLP and comparing cells with said construct with a second cell not expressing said cell surface protein or expressing said cell surface protein at a predefined level in the presence or absence of said compounds, cells containing said construct.

3. Claims: 44-49, 51, 52, 53(part), 54-58

Assay for screening compounds which inhibit or stimulate ligand/binding domain interaction, enzyme catalysis by said compounds, degree of binding to said compounds to a target molecule or capability to enter a VLP comprising (a) contacting said compounds with ligand/binding domain, enzyme and substrate, target molecule or VLP wherein said ligand/binding domain, enzyme and substrate and target molecule is incorporated or encapsulated by said VLP and wherein inhibition, stimulation, binding or entry of compound into the VLP changes an optical property of said VLP, comparison and determination with reference VLP

4. Claims: 59-64

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Assay for determining protein-protein interactions comprising co-expressing in a cell (a) target molecules comprising a first and second amino acid sequence, the second sequence being a reporter, (b) signal molecules comprising a first and second amino acid sequence, the second sequence conferring on the signal molecules the ability to assemble VLP and measuring the presence or absence of the reporter within the VLP and determining the protein-protein interaction between the two first amino acid sequences

5. Claims: 65-75

Assay for identifying nucleic acid sequences encoding intracellular transport proteins or membrane associated polypeptides comprising providing a recombinant cell comprising a nucleic acid encoding a fusion protein comprising first and second amino acid sequences, said first sequence conferring on the fusion proteins the ability to assemble VLPs and wherein said first sequence does not confer on the fusion protein to be transported to a cellular membrane and/or wherein said first sequence does not confer on the VLPs the ability to be released into the extracellular environment and said second sequence is a polypeptide under study, expressing the fusion proteins and measuring the presence or absence of VLPs and thereby identifying nucleic acid sequences which code for intracellular transport proteins or membrane associated polypeptides.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/06144

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|---|--|
| EP 0960942 A | 01-12-1999 | EP 0959136 A AU 4064099 A WO 9960147 A | 24-11-1999 06-12-1999 25-11-1999 |
| EP 0959135 A | 24-11-1999 | AU 4064199 A EP 0972841 A WO 9960148 A | 06-12-1999 19-01-2000 25-11-1999 |
| WO 9950424 A | 07-10-1999 | AU 3159499 A EP 1066391 A | 18-10-1999 10-01-2001 |
| WO 0029555 A | 25-05-2000 | AU 1329900 A | 05-06-2000 |
| WO 0009157 A | 24-02-2000 | AU 5469999 A | 06-03-2000 |
| WO 9935282 A | 15-07-1999 | AU 2258799 A EP 1053347 A | 26-07-1999 22-11-2000 |
| EP 0768377 A | 16-04-1997 | EP 1026240 A AT 151110 T AU 4308689 A CA 1340288 A DE 68927933 D DE 768377 T EP 0436597 A IL 91501 A JP 4502700 T US 5403484 A US 5571698 A WO 9002809 A US 5663143 A US 5837500 A US 5223409 A | 09-08-2000 15-04-1997 02-04-1990 29-12-1998 07-05-1997 02-01-1998 17-07-1991 10-03-1998 21-05-1992 04-04-1995 05-11-1996 22-03-1990 02-09-1997 17-11-1998 29-06-1993 |
| WO 9929723 A | 17-06-1999 | US 6171591 B AU 1714699 A EP 1037917 A | 09-01-2001 28-06-1999 27-09-2000 |
| WO 9849195 A | 05-11-1998 | AU 7350798 A | 24-11-1998 |
| WO 9828004 A | 02-07-1998 | AU 7871698 A | 17-07-1998 |
| WO 9802548 A | 22-01-1998 | AU 3725697 A CA 2257822 A EP 0922105 A JP 2000515741 T | 09-02-1998 22-01-1998 16-06-1999 28-11-2000 |
| WO 9740381 A | 30-10-1997 | AU 2736197 A BR 9708713 A CA 2251826 A CN 1219239 A EP 0900376 A JP 2001502048 T | 12-11-1997 04-01-2000 30-10-1997 09-06-1999 10-03-1999 13-02-2001 |
| WO 9635798 A | 14-11-1996 | AU 5703796 A CA 2218808 A EP 0835320 A JP 11511651 T | 29-11-1996 14-11-1996 15-04-1998 12-10-1999 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06144

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9630523 A | 03-10-1996 | CN 1185811 A | 24-06-1998 |
| | | EP 0817854 A | 14-01-1998 |
| WO 9420621 A | 15-09-1994 | AU 6006394 A | 26-09-1994 |
| WO 9402173 A | 03-02-1994 | AU 4773293 A | 14-02-1994 |
| | | CN 1084218 A | 23-03-1994 |
| | | IL 106362 A | 06-12-1998 |
| | | MX 9304310 A | 31-01-1995 |
| | | PT 101310 A | 31-05-1994 |
| | | US 5667782 A | 16-09-1997 |
| | | ZA 9305164 A | 02-03-1994 |
| WO 8803563 A | 19-05-1988 | AT 100146 T | 15-01-1994 |
| | | AT 100145 T | 15-01-1994 |
| | | AU 606896 B | 21-02-1991 |
| | | AU 8105787 A | 01-06-1988 |
| | | AU 606627 B | 14-02-1991 |
| | | AU 8153487 A | 01-06-1988 |
| | | CA 1339263 A | 12-08-1997 |
| | | DE 3788806 D | 24-02-1994 |
| | | DE 3788807 D | 24-02-1994 |
| | | DK 362088 A | 30-06-1988 |
| | | DK 362188 A | 30-06-1988 |
| | | EP 0330661 A | 06-09-1989 |
| | | EP 0329671 A | 30-08-1989 |
| | | ES 2010230 A | 01-11-1989 |
| | | ES 2010231 A | 01-11-1989 |
| | | WO 8803562 A | 19-05-1988 |
| | | HU 50875 A | 28-03-1990 |
| | | JP 9248191 A | 22-09-1997 |
| | | JP 2501107 T | 19-04-1990 |
| | | JP 2501026 T | 12-04-1990 |
| | | JP 2708046 B | 04-02-1998 |
| | | NO 177793 B | 14-08-1995 |
| | | NO 177794 B | 14-08-1995 |
| US 5041385 A | 20-08-1991 | | |
| US 5008373 A | 16-04-1991 | | |
| US 5463024 A | 31-10-1995 | | |
| US 5885808 A | 23-03-1999 | AT 198769 T | 15-02-2001 |
| | | DE 69329879 D | 22-02-2001 |
| | | DK 672158 T | 29-01-2001 |
| | | EP 1038967 A | 27-09-2000 |
| | | EP 0672158 A | 20-09-1995 |
| | | WO 9410323 A | 11-05-1994 |
| | | GB 2286593 A,B | 23-08-1995 |
| | | JP 8506239 T | 09-07-1996 |
| DE 19543553 A | 28-05-1997 | CA 2236159 A | 29-05-1997 |
| | | WO 9719174 A | 29-05-1997 |
| | | EP 0862633 A | 09-09-1998 |
| | | JP 2000500973 T | 02-02-2000 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-コ-ト' (参考) |
|--------------------------|-------|---------------|-----------------|
| A 6 1 P 37/00 | | A 6 1 P 43/00 | 1 0 5 4 C 0 8 4 |
| 43/00 | 1 0 5 | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/15 | | 1/19 | |
| 1/19 | | 1/21 | |
| 1/21 | | 7/00 | |
| 5/10 | | C 1 2 Q 1/70 | |
| 7/00 | | G 0 1 N 33/15 | Z |
| C 1 2 Q 1/70 | | 33/483 | C |
| G 0 1 N 27/447 | | | E |
| 33/15 | | 33/50 | Z |
| 33/483 | | 33/53 | D |
| | | 33/569 | G |
| 33/50 | | 33/58 | Z |
| 33/53 | | 37/00 | 1 0 3 |
| 33/569 | | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| 33/58 | | 5/00 | A |
| 37/00 | 1 0 3 | G 0 1 N 27/26 | 3 3 1 Z |

(31)優先権主張番号 0 0 1 0 6 1 0 9 . 2

(32)優先日 平成12年3月21日(2000.3.21)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(E P)

(31)優先権主張番号 0 0 1 1 0 3 6 3 . 9

(32)優先日 平成12年5月15日(2000.5.15)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(E P)

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

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA20
DA36 DB07 FA11 FA34 FB01
FB03 FB07 FB12 GC16
4B024 AA01 AA11 BA32 BA63 CA03
CA04 CA11 CA12 DA02 EA02
EA03 FA18 GA11 HA08 HA11
4B063 QA01 QA08 QA19 QQ02 QQ10
QQ12 QQ43 QQ58 QR08 QR14
QR20 QR31 QR33 QR38 QR42
QR50 QR55 QR58 QR59 QR62
QR66 QR72 QR79 QS05 QS16
QS25 QS34 QX01 QX02
4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01
BA02 BA25 CA23 CA24 CA44
CA46
4C076 AA95 CC07 CC26 CC27 CC31
EE41
4C084 AA16 MA05 NA13 ZB072
ZB212 ZB262 ZB312 ZC542

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 病毒颗粒，它们的制备，优选它们的药物筛选及其在功能基因组中的用途 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003504014A | 公开(公告)日 | 2003-02-04 |
| 申请号 | JP2001508324 | 申请日 | 2000-06-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 埃沃技术哦啊Iaku陈GESELLSCHAFT | | |
| 申请(专利权)人(译) | Evotec OAI股份公司 | | |
| [标]发明人 | フントニコラス | | |
| 发明人 | フント ニコラス | | |
| IPC分类号 | G01N33/483 A61K45/00 A61K47/42 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/15 C07K14/16 C07K14/47 C07K14/705 C07K14/71 C07K14/82 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N7/04 C12N15/09 C12N15/62 C12N15/86 C12N15/87 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N27/447 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/58 G01N37/00 | | |
| CPC分类号 | A61K2039/525 A61K2121/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/005 C07K14/4722 C07K14/705 C07K14/71 C07K14/82 C07K2319/00 C07K2319/02 C07K2319/03 C07K2319/73 C07K2319/735 C12N7/00 C12N15/62 C12N15/87 C12N2740/13022 C12N2740/13023 C12N2740/16122 C12Q1/6897 G01N33/586 G01N2333/005 | | |
| FI分类号 | A61K45/00 A61K47/42 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00.105 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12Q1/70 G01N33/15.Z G01N33/483.C G01N33/483.E G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/569.G G01N33/58.Z G01N37/00.103 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A G01N27/26.331.Z | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DB07 2G045/FA11 2G045/FA34 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC16 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/BA63 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/FA18 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ10 4B063/QQ12 4B063/QQ43 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR20 4B063/QR31 4B063/QR33 4B063/QR38 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR58 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR79 4B063/QS05 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/CC07 4C076/CC26 4C076/CC27 4C076/CC31 4C076/EE41 4C084/AA16 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/ZB072 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB312 4C084/ZC542 | | |
| 优先权 | 1999112451 1999-06-30 EP 60/141268 1999-06-30 US 2000106109 2000-03-21 EP 2000110363 2000-05-15 EP | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及病毒颗粒，其制备及其在药物筛选和功能基因组中的用途。通过在细胞中共表达靶分子和信号分子来产生颗粒。但是，信号和靶分子在功能上没有共价结合，因此靶分子被掺入或封装在病毒样颗粒中。

