

(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 - 516767

(P2003 - 516767A)

(43)公表日 平成15年5月20日 (2003.5.20)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09		1/02	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02		1/66	4 B 0 6 3
1/66			
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
		33/50	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 52数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 545593(P2001 - 545593)

(86) (22)出願日 平成12年12月13日 (2000.12.13)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月14日 (2002.6.14)

(86)国際出願番号 PCT/US00/34232

(87)国際公開番号 W001/044516

(87)国際公開日 平成13年6月21日 (2001.6.21)

(31)優先権主張番号 09/461,508

(32)優先日 平成11年12月14日 (1999.12.14)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 テュラリク インコーポレイテッド
アメリカ合衆国94080カリフォルニア州 サ
ウス・サン・フランシスコ、トゥー・コー
ポレイト・ドライブ (番地の表示なし)

(71)出願人 ピーティシー・セラピューティクス・イ
ンコーポレイテッド
P T C T H E R A P E U T I C S ,
I N C .

アメリカ合衆国08855ニュージャージー州ピ
スカタウェイ、ルーム713、リサーチ・タワ
ー、ホーズ・レイン675番、ロバート・ウッ
ド・ジョンソン・メディカル・スクール

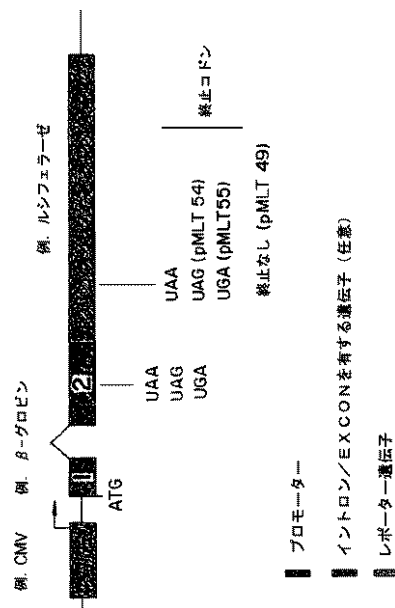
(74)代理人 弁理士 青山 稔 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 早期翻訳終結およびナンセンス媒介性RNA崩壊を阻害する化合物を検定する方法

(57)【要約】

本出願は、細胞における早期翻訳終結およびナンセンス媒介性RNA崩壊を阻害する化合物のアッセイ方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 早期翻訳終結およびナンセンス媒介性mRNA崩壊を調節する化合物のインビトロスクリーニング方法であって、

(i) インビトロ翻訳細胞抽出物；ポリペプチドをコードする核酸（ここにこのポリペプチドのコード配列は早期終止コドンを含む）；および調節化合物候補を含む翻訳検定物をインキュベートする工程；および

(ii) この核酸から翻訳されたポリペプチドを検出する工程を含む方法。

【請求項2】 該核酸が酵素をコードしている、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該核酸が免疫グロブリンをコードしている、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 該核酸がルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、キナーゼ、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ、または β -ガラクトシダーゼをコードしている、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 該核酸がインビトロで転写されたRNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 該細胞抽出物が酵母、植物、哺乳類、または両生類由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 該細胞抽出物が真核生物の網状赤血球ライセートである、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 該細胞抽出物がウサギ網状赤血球ライセートである、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 該細胞抽出物が哺乳類の組織培養細胞抽出物である、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 該細胞抽出物がHeLa細胞S100抽出物である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 該ポリペプチドがELISA、光放射、比色測定、酵素活性、または放射能によって検出される、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 該検定がマイクロタイター皿のウェルで行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 該マイクロタイター皿が96または384ウェルを有するものである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 ミクロタイタープレート形式で工程(i)-(ii)を並行して繰り返すことをさらに含み、ここでは少なくとも約100から少なくとも約6,000の範囲の種々の化合物が試験される、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 該検定が、自動ピペットステーション、ロボット電機子、およびロボットコントローラーを含む高処理量の統合系で行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項16】 早期翻訳終結およびナンセンス媒介性mRNA崩壊を調節する化合物のインビボスクリーニング方法であって、

(i)細胞内でポリペプチドをコードする核酸を発現させる工程(ここにこのポリペプチドのコード配列は早期終止コドンを含む)；

(ii)この細胞を調節化合物候補と接触させる工程；および

(iii)この核酸から翻訳されたポリペプチドまたはこの核酸から転写されたRNAを検出する工程

を含む方法。

【請求項17】 該ポリペプチドをコードする異種核酸に作動可能に連結されているプロモーターを該核酸が含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 該ポリペプチドをコードする異種核酸がイントロンおよび、コード配列を含む少なくとも2つのエキソンを含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 該早期終止コドンが最後のエキソン内に位置している、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 該異種核酸がキメラポリペプチドをコードしている、請求項18に記載の方法。

【請求項21】 該核酸が、ルシフェラーゼおよび - グロビンをコードする核酸を含む、キメラポリペプチドをコードしている、請求項20に記載の方法

。

【請求項22】 該核酸が酵素をコードしている、請求項17に記載の方法

。

【請求項23】 、該核酸がルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、キナーゼ、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ、または -ガラクトシダーゼをコードしている、請求項17に記載の方法。

【請求項24】 該核酸が免疫グロブリンをコードしている、請求項17に記載の方法。

【請求項25】 該核酸が内因性遺伝子である、請求項16に記載の方法。

【請求項26】 該内因性遺伝子が -グロビン、 -グロビン、因子VIIII、因子IX、vWF、p53、ジストロフィン、CFTR、Rb、MSH1、MSH2、APC、Wt1、ヘキサミンダーゼA、ニューロフィブロミン1、またはニューロフィブロミン2である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 該内因性遺伝子が免疫グロブリンをコードしている、請求項25に記載の方法。

【請求項28】 該ポリペプチドがELISA、光放射、比色測定、酵素活性、薬物耐性、FACS、または放射能によって検出される、請求項16に記載の方法。

【請求項29】 該検定がマイクロタイター皿のウェルで行われる、請求項16に記載の方法。

【請求項30】 該マイクロタイター皿が96または384ウェルを有するものである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 ミクロタイタープレート形式で工程(i) - (iii)を並行して繰り返すことをさらに含み、ここでは少なくとも約100から少なくとも約6,000の範囲の種々の化合物が試験される、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 該検定が、自動ピペットステーション、ロボット電機子、およびロボットコントローラーを含む高処理量の統合系で行われる、請求項16に記載の方法。

【請求項33】 該細胞が固形支持層に接着されている、請求項16に記載の方法。

【請求項34】 該固形支持層がビーズ、膜、およびマイクロタイタープレートからなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 該細胞がヒト細胞またはマウス細胞である、請求項16に記載の方法。

【請求項36】 該細胞が該核酸で安定にトランスフェクトされている、請求項16に記載の方法。

【請求項37】 ポリペプチドをコードする核酸（ここにこのポリペプチドのコード配列は早期終止コドンを含む）；早期終止コドンでの翻訳終結およびナンセンス媒介性RNA崩壊を阻害する化合物のスクリーニング方法を実施するための指示書；およびナンセンス媒介性RNA崩壊を阻害するコントロール化合物を含む、翻訳終結およびナンセンス媒介性mRNA崩壊を調節する化合物のスクリーニング用キット。

【請求項38】 該コントロール化合物がG418または硫酸ゲンタマイシンである、請求項37に記載のキット。

【請求項39】 異種核酸に作動可能に連結されているプロモーターを該核酸が含む、請求項37に記載のキット。

【請求項40】 該ポリペプチドをコードする核酸がイントロンおよび、コード配列を含む少なくとも2つのエクソンを含む、請求項39に記載のキット。

【請求項41】 該早期終止コドンが最後のエクソン内に位置している、請求項40に記載のキット。

【請求項42】 該核酸がインビトロで転写されたRNAを含む、請求項37に記載のキット。

【請求項43】 該核酸がルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、キナーゼ、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ、または -ガラクトシダーゼをコードしている、請求項37に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

関連出願の相互参照

この出願は、1999年12月14日提出のUS 09/461,508 (これは引用によりその全内容が本明細書中に包含される)に対する優先権を主張する。

【0002】

米国政府が後援する調査および開発下でなされた発明に対する権利に関する宣言適用なし。

【0003】

発明の背景

鎖の終結変異は、塩基置換またはフレームシフト変異によってセンスコドンが3つの終止コドン(UAA、UAG、またはUGA)のうちの1つに変化する変異である。酵母、ヒト遺伝的障害、および免疫グロブリンファミリー遺伝子発現の研究により、そのような鎖終結変異を含むナンセンスRNA(nonsense RNAs)の翻訳を最小限に抑え、そのRNA安定性を調節するRNA監視機構が同定された。この監視機構は「ナンセンス媒介性mRNA崩壊(nonsense-mediated mRNA decay)」(「NMD」、例えば Hentze & Kulozik, Cell 96:307-310 (1999); Culbertson, Trends in Genetics 15:74-80 (1999); Li & Wilkinson, Immunity 8:135-141 (1998); および RuizEchevarria et al., TIBS 21:433-438 (1996))と称される。NMDは、正常細胞(すなわちBおよびT細胞)および遺伝的変異を伴う細胞(すなわち - グロブリン、CFTR、およびジストロフィン中に変異を伴う細胞)の両者において作動する転写後機構である。

【0004】

NMD機構は、正常および早期終止コドンを区別した後、早期終止コドンを伴う多数のRNAを分解に付する。早期終止コドンがORFの末端近くか、あるいは最後のエクソン内に位置する場合、RNAはNMDに付されず、その結果トランケートされたポリペプチドが生産されることがある。

【0005】

多くのヒト疾患は、ナンセンス変異によって引き起こされ、これには例えばp53に関連する癌、網膜芽細胞腫、デュシェンヌ筋ジストロフィー、嚢胞性線維症、フォンウィルブランド病、サラセミア、神経線維腫症、テイ・サックス病、および血友病がある。CFT R遺伝子内に早期終止コドンを有する培養細胞中、この細胞をアミノグリコシドで処理した場合に、完全長CFT Rの合成が観察された(例えば Bedwell et al., Nat. Med. 3:1280-1284 (1997); Howard et al., Nat. Med. 2:467-469 (1996))。さらに、デュシェンヌ筋ジストロフィーに関するマウスモデルでは、硫酸ゲンタマイシンが、ジストロフィン遺伝子内の早期終止コドンでの翻訳終結を抑制することがわかった。これらの抗生物質は早期終止コドンの部位でのミスリーディングおよび別のアミノ酸の挿入を媒介した(例えば Barton-Davis et al., J. Clin Invest. 104:375-381 (1999))。このように生じたジストロフィンは、mdxマウスにおいて収縮誘導性損傷に対する保護を提供した。

【0006】

早期翻訳終結を抑制する化合物は、ナンセンス変異によって生じる多数の疾患に対する有用な処置となろう。したがって、NMDおよび早期翻訳終結の阻害に関連する薬物の発見に関する高処理量の検定(アッセイ)が望まれる。本発明は、これらの検定、ならびに本明細書から明らかである他の特徴を提供する。

【0007】

発明の要旨

したがって本出願は、細胞内の早期翻訳終結(premature translation termination)およびナンセンス媒介性RNA崩壊を阻害する化合物に関する、高処理量の検定方法を提供する。

【0008】

一側面では、本発明は、早期翻訳終結およびナンセンス媒介性mRNA崩壊を調節する化合物のインビトロスクリーニング方法であって、(i)インビトロ翻訳細胞抽出物;ポリペプチドをコードする核酸(ここにこのポリペプチドのコード配列は早期終止コドンを含む);および調節化合物候補を含む翻訳検定物をインキュベートする工程;および(ii)この核酸から翻訳されたポリペプチドを

検出する工程を含む方法を提供する。

【0009】

一態様では、細胞抽出物は酵母、植物、哺乳類、また両生類由来である。別の態様では、細胞抽出物は真核生物の網状赤血球ライセート、例えばウサギ網状赤血球ライセートである。別の態様では、細胞抽出物は哺乳類の組織培養細胞抽出物、例えばHeLa細胞S100抽出物である。一態様では、この核酸はインビトロで転写されたRNAである。

【0010】

別の側面では、本発明は、早期翻訳終結およびナンセンス媒介性mRNA崩壊を調節する化合物のインビボスクリーニング方法であって、(i)細胞内でポリペプチドをコードする核酸を発現させる工程(ここにこのポリペプチドのコード配列は早期終止コドンを含む);(ii)この細胞を調節化合物候補と接触させる工程;および(iii)この核酸から翻訳されたポリペプチドまたはこの核酸から転写されたRNAを検出する工程を含む方法を提供する。

【0011】

一態様では、核酸は、ポリペプチドをコードする異種核酸と作動可能に連結されたプロモーターを含む。別の態様では、このポリペプチドをコードする異種核酸はイントロンおよび、コード配列を含む少なくとも2つのエクソンを含む。別の態様では、早期終止コドンは最後のエクソン内に位置する。別の態様では、異種核酸はキメラポリペプチドをコードする。別の態様では、この核酸は内因性遺伝子、例えば免疫グロブリン、 α -グロビン、 β -グロビン、因子VIIII、因子IX、vWF、p53、ジストロフィン、CFTR、Rb、MSH1、MSH2、APC、Wt1、ヘキサミンダーゼA、ニューロフィブロミン1、またはニューロフィブロミン2である。別の態様では、この細胞を固形支持層(支持体)、例えばビーズ、膜、およびマイクロタイタープレートに付着させる。別の態様では、細胞はヒト細胞またはマウス細胞である。別の態様では、この細胞はこの核酸で安定にトランスフェクトされたものである。

【0012】

一態様では、この核酸は酵素をコードする。別の態様では、この核酸は免疫グ

ロブリンをコードする。別の態様では、この核酸はルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、キナーゼ、クロラムフェニコール トランスフェラーゼ、または β -ガラクトシダーゼをコードする。別の態様では、このポリペプチドは、E L I S A、光放射、比色測定、酵素活性、または放射能によって検出される。

【0013】

一態様では、この検定は、マイクロタイター皿、例えば96ウェルまたは384ウェルを有するマイクロタイター皿のウェルで行う。別の態様では、マイクロタイタープレート形式中、この方法の工程を並行して繰り返し、ここでは少なくとも約100から少なくとも約6,000の範囲の種々の化合物が試験される。別の態様では、この検定は、自動ピペットステーション、ロボット電機子 (a robotic armature)、およびロボットコントローラーを含む高処理量の統合系で行われる。

【0014】

別の側面では、本発明は、翻訳終結およびナンセンス媒介性mRNA崩壊を調節する化合物のスクリーニング用キットであって、ポリペプチドをコードする核酸(ここにこのポリペプチドのコード配列は早期終止コドンを含む)；早期終止コドンでの翻訳終結およびナンセンス媒介性RNA崩壊を阻害する化合物のスクリーニング方法を実施するための指示書；およびナンセンス媒介性RNA崩壊を阻害するコントロール化合物を含むキットを提供する。

【0015】

一態様では、コントロール化合物はG418または硫酸ゲンタマイシンである。

【0016】

発明の詳しい説明

導入

本発明は、NMDおよびRNA内のナンセンス変異によって生じる早期翻訳終結を阻害する化合物をスクリーニングするための高処理量の検定方法を提供する。この検定は細胞翻訳抽出物または転写-翻訳抽出物の混合物および異種性また

は内因性レポーター核酸、DNAまたはRNAを用いてインビトロで行うことができる。この検定はまた、異種性（一時的または安定にトランスフェクトされているもの）または内因性レポーター核酸を有する細胞を用いてインビボで行うこともできる。阻害化合物は、この検定において完全長レポーターRNAまたは完全長レポータータンパク質が生じたか否かを測定することによって検出する。

【0017】

本発明の検定を用いて同定された阻害化合物を用いて、ナンセンス変異に関連する疾患を処置する。本発明の化合物は、ナンセンスコドンの読み飛ばし（read-through）を可能にし、完全長ポリペプチドを生じさせる。ナンセンス変異に関連する疾患には、例えば血液疾患、例えばサラセミア（ α -グロビンおよび β -グロビン遺伝子）、血友病AおよびB（因子VIIIおよび因子IX遺伝子）、およびフォンウィルブランド病（vWF遺伝子）；p53関連の癌、例えば肺癌、乳癌、大腸癌、膵癌、食道癌、非ホジキンリンパ腫、および卵巣癌（p53遺伝子）；結腸直腸癌（APC、MSH1およびMSH2遺伝子）；嚢胞性線維症（CFTR遺伝子）；デュシェンヌ筋ジストロフィー；（ジストロフィー遺伝子）テイ・サックス病（ヘキサミンダーゼA遺伝子）；ウィルムス腫（Wt1遺伝子）；網膜芽細胞腫（Rb遺伝子）、神経線維腫症（NF1およびNF2遺伝子）；腎石（kidney stones）、およびコラーゲン障害が含まれる。

【0018】

上に記載されるように、一態様では、本検定はインビトロ検定である。このインビトロ検定は翻訳抽出物または転写-翻訳抽出物および、早期終止コドンを有する、レポーターポリペプチドをコードするレポーター核酸分子を用い、ナンセンス媒介性mRNA崩壊および早期翻訳終結の潜在的阻害物質である化合物を試験する。阻害化合物は、この核酸分子から翻訳された完全長ポリペプチドの生産を検出することによって同定される。

【0019】

レポーター核酸は、本明細書中に記載される任意の方法によってその完全長ポリペプチドがラベル可能であるか、あるいは検出可能である任意のポリペプチドをコードする。一態様では、このポリペプチドは、ルシフェラーゼ、ホスファタ

ーゼ、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、キナーゼ、クロラムフェニコール トランスフェラーゼ、または - ガラクトシダーゼのような酵素である。別の態様では、このポリペプチドは緑色蛍光タンパク質または赤色蛍光タンパク質である。別の態様では、このポリペプチドは、抗体、あるいは放射能ラベルなどによって検出可能である任意のポリペプチドである。終止コドンは、完全長ポリペプチドに関する正しい終止コドンに対してN末端側であるポリペプチドの任意の位置であり得る。

【0020】

このインビトロ反応は翻訳反応または転写 - 翻訳反応の組み合わせであり得る。翻訳および転写 - 翻訳に関する細胞抽出物は市販されているか、あるいは当業者に既知の標準的方法を用いて製造できる（例えば Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994); および Jackson & Hunt, *Methods in Enzymology* 96:50-75 (1983) を参照)。転写 - 翻訳反応の組み合わせに関して、核酸は、典型的にDNA分子であり、これはRNA分子に転写されてから翻訳される。翻訳反応では、この核酸は典型的にRNAであり、インビトロで転写されたRNAまたは内因性RNAである。例えば細菌RNAポリメラーゼ、例えばSP6およびT7を用いる、インビトロで転写されたRNAの作成方法は、当分野に周知である（例えば Contreras et al., *Nuc. Acids Res.* 10:6353 (1982) を参照)。翻訳または転写 - 翻訳反応に適切な細胞抽出物には、酵母、分裂酵母、植物、両生類（例えばアフリカツメガエル）、植物（例えばコムギ胚芽）および哺乳類由来のものが含まれる（例えば Krieg & Melton, *Nature* 308:203 (1984); Dignam et al., *Methods Enzymol.* 182:194-203 (1990) を参照)。一態様では、抽出物は網状赤血球ライセート（好ましくはウサギ由来）である。別の態様では、抽出物は培養細胞、好ましくはマウス、ラット、またはヒト細胞由来、例えばHeLa細胞由来のS100抽出物である（Dignam et al., *Nuc. Acid s Res.* 11:1475-1489 (1983)）。

【0021】

別の態様では、この検定はインビボの、細胞に基づく検定である。このインビボ検定は細胞、典型的には培養細胞、および、早期終止コドンを含む、レポーターポリペプチドをコードするレポーター核酸分子を用いて、ナンセンス媒介性mRNA崩壊および早期翻訳終結の潜在的阻害物質である化合物を試験する。阻害化合物は、この核酸分子由来の完全長レポーターポリペプチドの生産を検出することによってか、あるいはこのレポーター核酸から転写された完全長レポーターRNAを検出することによって同定される。

【0022】

このレポーター核酸は任意のポリペプチドをコードし、ここに完全長ポリペプチドは本明細書中に記載の任意の方法によってラベルし、あるいは検出することができる。レポーター核酸は、内因性遺伝子または、この細胞内で安定に、あるいは一時的に発現された異種遺伝子であり得る。さらに、異種性レポーター核酸は、キメラポリペプチド、例えば種々のポリペプチドおよび/または種々の種由来の種々のポリペプチドのキメラ、例えばヒト β -グロビン由来のエキソンおよびイントロンおよびハエルシフェラーゼをコードする配列を含むキメラをコードし得る。一態様では、レポーター核酸は、酵素、例えばルシフェラーゼ、ホスファターゼ、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、キナーゼ、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ、または β -ガラクトシダーゼをコードする異種核酸である。別の態様では、この異種核酸は緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、または免疫グロブリンまたはその断片をコードする。別の態様では、レポーター核酸は内因性遺伝子、例えば免疫グロブリン遺伝子、 β -グロビン、 α -グロビン、因子VIIII、因子IX、vWF、p53、ジストロフィン、CFTR、Rb、MSH1、MSH2、APC、Wt1、ヘキサミンニダーゼA、ニューロフィブロミン1、またはニューロフィブロミン2である。別の態様では、このポリペプチドは抗体または放射能ラベルなどによって検出可能な任意のポリペプチドである。

【0023】

早期終止コドンは、完全長ポリペプチドに関する正しい終止コドンに対してN末端側であるポリペプチド中の任意の位置であり得る。レポーターポリペプチド

はイントロンを含む可能性があり、いずれか1つのエクソン内に早期終止コドンが位置する。早期終止コドンは天然に存在するものであり得、あるいはインビトロ突然変異誘発技術、例えばPCR、リンカー挿入、オリゴヌクレオチド媒介性突然変異誘発、およびランダム化学突然変異誘発（インビボおよびインビトロの両方）によって生じさせ得る。

【0024】

本発明の方法において、任意の適当な真核生物培養細胞、例えば昆虫細胞、酵母細胞、および哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞を用いることができる。細胞は形質転換セルラインまたはプライマリー細胞であり得、接着（付着）性または懸濁物であり得る。一態様では、細胞はハイブリドーマまたはプレB細胞または癌細胞である。別の態様では、細胞は293細胞、HeLa細胞、HepG2細胞、K562細胞、または3T3細胞である。細胞は溶液状態であり得、あるいは固形支持層、例えばビーズまたはプレートにアンカーされた状態であり得る。

【0025】

好ましくは、インビトロまたはインビボ検定は、マイクロタイタープレートおよび液状ロボット手法、または蛍光抗体またはリガンドを用いる細胞分類（FACS）を用いる高処理量形式で行われる。インビトロおよびインビボ検定は試験化合物と任意の適切な時間長、すなわち、インビトロ反応に関して約15、30、または45分から1時間まで、1時間、1時間半、2時間、4時間、6時間、12時間またはそれ以上で1日またはそれ以上まで、ならびにインビボ反応に関して1時間、2時間、4時間、6時間、12時間またはそれ以上から1日、2日、3日またはそれ以上までインキュベートすることができる。試験化合物とレポーター反応物のインキュベーションの時間は、当業者が標準的方法論を用いて測定できる。

【0026】

定義

本明細書中で用いられる以下の用語は、特に記載しない限り、それらに相当する意味を有する。

【0027】

「核酸から翻訳されたポリペプチドまたは核酸から転写されたRNAを検出する」とは、早期終結および/またはNMDの間接的または直接的影響下であるパラメータ、例えば機能的、物理的および化学的作用を増大または減少させる化合物に関するアッセイを意味する。このような作用は、当業者に既知の任意の手段、例えば分光学的性質（例えば蛍光、吸光度、屈折率）、酵素活性、タンパク質発現、電位感受性色素、放射性同位体流出、誘導可能なマーカー、RNA発現のレベル、mRNAの適正なスプライシング、リガンド結合アッセイの変化、細胞内の第二メッセンジャー、例えばcAMP、cGMP、およびイノシトールトリホスフェート（IP3）の変化、細胞内カルシウムレベルの変化などによって測定できる。

【0028】

「阻害物質（inhibitors）」、「抑制因子（suppressors）」および「調節因子（modulators）」は交換可能に用いられ、インビトロおよびインビボアッセイを用いて同定された化合物を用いて早期翻訳終結およびNMDを阻害、抑制、または調節することを意味する。阻害物質は、例えば、早期翻訳終結およびNMDと結合し、これを部分的または全体的にブロックし、崩壊させ、阻害し、遅延させ、不活化し、脱感作するか、あるいは下方調節する化合物である。調節因子には、天然に存在する、および合成のリガンド、アンタゴニスト、アゴニスト、小化学分子などが含まれる。阻害物質に関するこのようなアッセイは、例えば、インビトロ検定または細胞内で試験核酸を発現させ、推定の調節化合物を適用し、次いで試験核酸のRNAまたはタンパク質レベルに対する機能的作用を測定することを含む。潜在的阻害物質または調節因子で処理されるサンプルまたは検定物は、阻害物質または調節因子を含まないコントロールサンプルと比較して、阻害の程度を試験される。（阻害物質で処理されない）コントロールサンプルは比活性値100%とされる。コントロールと比較した活性値が少なくとも110%、場合により150%、200%、500%、100%、200%、5000%、10,000%またはそれ以上である、すなわち、1と1/2倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍またはそれ以上活性が増加した場合に、早期翻訳終結およびNMDの阻害が達成される。阻害は完全長ポリペプチドまたは完全長RNAのい

ずれかを検出することによって測定できる。場合により、阻害コントロール反応には、既知の阻害物質、例えばアミノグリコシド抗生物質、例えばG 4 1 8を用いることが含まれる。

【0029】

「抗体」または「免疫グロブリン」は交換可能に用いられ、抗原を特異的に結合し、認識する免疫グロブリン遺伝子由来のフレームワーク領域またはその断片を含むポリペプチドを意味する。認識されている免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、およびミュー定常領域遺伝子ならびに種々の免疫グロブリン多様性/連結物/可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖はカッパまたはラムダとして分類される。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、ここにそれぞれ免疫グロブリンのクラス、I g G、I g M、I g A、I g DおよびI g Eが規定される。

【0030】

例示的な免疫グロブリン(抗体)構造単位はテトラマーから構成される。各テトラマーは、それぞれ1個の「軽」鎖(約25 kDa)および1個の「重」鎖(約50 - 70 kDa)を有する2個の同一ペアから構成される。各鎖のN末端は、主に抗原認識に関与する約100 - 110またはそれ以上のアミノ酸を規定する。用語「可変軽鎖(V_L)および可変重鎖(V_H)」はそれぞれ、これら軽鎖および重鎖を表す。

【0031】

抗体は、例えば、無傷の免疫グロブリンとしてか、あるいは、種々のペプチダーゼによる消化によって作成された多数のよく特徴付けされた断片として存在する。したがって、例えばペプシンは抗体をそのヒンジ領域のジスルフィド結合下で消化し、 $F(a b)'_2$ を生じる。これはそれぞれ軽鎖がジスルフィド結合によって $V_H - C_H 1$ と結合しているF a bの二量体である。 $F(a b)'_2$ は穏やかな条件下で還元され、そのヒンジ領域のジスルフィド結合を崩壊させることができ、これにより $F(a b)'_2$ 二量体はF a b'単量体に変換される。このF a b'単量体は本質的にそのヒンジ領域の部分を有するF a bである(Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993) 参照)。種々の抗体断片は、無傷の抗体の

消化に関して規定されるが、当業者であれば、このような断片は新たに化学的に合成するか、あるいは組換えDNA方法論を用いて合成することができることを理解するだろう。これゆえ、本明細書中で用いられる用語「抗体」はまた、完全抗体の修飾によって作成されたか、あるいは組換えDNA方法論を用いて新たに合成された（例えば単鎖Fv）か、あるいはファージディスプレイライブラリー（例えば McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990) を参照）を用いて同定された抗体断片を含む。

【0032】

モノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造に関して、当分野に既知の任意の技術を用いることができる（例えば Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (1985) を参照）。単鎖抗体を製造する技術（米国特許第4,946,778号）を本発明のポリペプチドに対する抗体の作成に適用できる。また、トランスジェニックマウス、または他の生物、例えば他の哺乳類を用いて、ヒト化抗体を発現させることができる。別法として、ファージディスプレイ技術を用いて、選択された抗原と特異的に結合する抗体およびヘテロマーFab断片を同定できる（例えば McCafferty et al., Nature 348:552-554(1990); Marks et al., Biotechnology 10: 779-783 (1992) を参照）。

【0033】

「キメラ抗体」または「キメラ免疫グロブリン」は、(a) 定常領域またはその部分が変化し、置換され、あるいは交換され、その抗原結合部位（可変領域）が、異なったクラスまたは変化したクラスの定常領域、エフェクター機能および/または種、または、このキメラ抗体に新規性質を付与する完全に異なる分子、例えば酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物などと連結されているか；あるいは(b) 異なる抗原特異性または変化した抗原特異性を有する可変領域を用いて、その可変領域またはその部分が変化し、置換され、あるいは交換されている抗体分子である。

【0034】

「核酸」とは、一本鎖または二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそのポリマーを表す。この用語は、基準となる核酸と同様の結合性質を有し、ならびに基準となるヌクレオチドと同様に代謝される、合成の、天然に存在する、ならびに非天然に存在する既知のヌクレオチドアナログまたは修飾されたバックボーン残基または結合を有する核酸を包含する。このようなアナログの例には、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホナート、キラルメチルホスホナート、2-O-メチル リボヌクレオチド、ペプチド-核酸 (PNAs) が含まれるがこれらに限定されない。

【0035】

特に記載しない限り、特定の核酸配列はその保存的修飾変異体（例えば縮重コドンの置換）および相補的配列、ならびに明示された配列を内包する。具体的には、縮重コドンの置換は、1またはそれ以上の選択された（か、あるいはすべての）コドンの三番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を作成することによって達成することができる (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。用語「核酸」は「遺伝子」、「cDNA」、「mRNA」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」と交換可能に用いられる。

【0036】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は本明細書中で交換可能に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを表す。この用語は、1またはそれ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学的模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび非天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用する。

【0037】

用語「アミノ酸」とは、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに、その天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣物を表す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝的コードによってコードされるものであり、ならびに後に修飾されたそのようなアミノ酸、例えばヒドロキ

シプロリン、 α -カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸アナログとは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基と結合した炭素を有する化合物、例えばホモセリン、ノルロイシン(norleucine)、メチオニン スルホキシド、メチオニン メチル スルホニウムを表す。このようなアナログは修飾されたR基(例えばノルロイシン)または修飾されたペプチドバックボーンを有するが、天然に存在するアミノ酸と同一の基本的化学構造を維持している。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化学化合物を表す。

【0038】

本明細書中、アミノ酸は、IUPAC - IUB Biochemical Nomenclature Commission によって推奨される、その一般に既知の三文字記号または1文字記号によって記載することができる。同様にヌクレオチドはその一般に許容される一文字コードによって記載することができる。

【0039】

「保存的修飾変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用される。具体的核酸配列に関して、「保存的修飾変異体」とは、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸であるか、あるいはこの核酸がアミノ酸配列をコードしない場合は、本質的に同一の配列を表す。遺伝コードの縮重のせいで、多数の機能的に同一な核酸が任意の規定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUはすべてアミノ酸アラニンをコードする。したがって、コドンによってアラニンを特定するすべての部分で、そのコドンは、コード化ポリペプチドの変化を伴わずに任意の対応するコドンに変化させることができる。このような核酸変異体は「サイレント変異体」であり、これは保存的修飾変異体の一種である。また、ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列は、その核酸のすべての可能なサイレント変異体を記載している。当業者であれば、核酸中の各コドン(AUG(通常、メチオニンに関する唯一のコドン)およびTGG(通常、トリプトファンに関する唯一のコドン)を除く)を修飾して機能的に同一の分子を生じさせることができることを認識するだろう

。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異体は、記載される各配列中に暗示されている。

【0040】

アミノ酸配列に関して、当業者であれば、コード化配列中の単一のアミノ酸または少ないパーセンテージのアミノ酸が変化、付加または欠失されている、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加であって、その変化が、アミノ酸の化学的に同様のアミノ酸による置換を生じさせるものが「保存的修飾変異体」であることを認識するだろう。機能的に同様のアミノ酸を提供する保存的置換テーブルは当分野で周知である。このような保存的に修飾された変異体は加えて、多形性変異体、種間相同体、および本発明の対立遺伝子を排除しない。

【0041】

以下の8群はそれぞれ、相互に保存的置換であるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、スレオニン (T)；および
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)

(例えば Creighton, Proteins (1984) を参照)。

【0042】

「ラベル」または「検出可能部分」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段によって検出可能な組成物である。例えば有用なラベルには、³²P、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素(例えばELISAにおいて一般に用いられるもの)、ビオチン、ジゴキシゲニン、またはハプテン、および例えばペプチド内に放射ラベルを包含させることによって検出可能にされ得るタンパク質、あるいはこのペプチドと特異的に反応性である抗体の検出に用いられ

得るタンパク質が含まれる。

【0043】

用語「組換え」とは、例えば細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに対して用いられる場合、その細胞、核酸、タンパク質またはベクターが異種核酸またはタンパク質の導入、または天然核酸またはタンパク質の変化によって修飾されたものであるか、あるいはその細胞がそのように修飾された細胞由来であることを示す。したがって、例えば、組換え細胞は、天然（非組換え）形態の細胞内には見られない遺伝子を発現するか、あるいは、別の条件では、異常発現、少量発現されるか、あるいは全く発現されない天然の遺伝子を発現する。

【0044】

用語「異種（性）（heterologous）」は、核酸の部分に関して用いられる場合、この核酸が、性質上、互いに同じ関係には見出せない2個またはそれ以上の連続物を含むことを示す。例えば、この核酸は典型的には、組換え的に作成され、新規な機能性核酸を作成するように配置された、関連しない遺伝子由来の2個またはそれ以上の配列、例えばあるソース由来のプロモーターおよび別のソース由来のコード化領域を有する。同様に、異種タンパク質とは、性質上、互いに同じ関係には見出せない2個またはそれ以上の連続物を含むタンパク質を表す。

【0045】

「プロモーター」とは、核酸の転写に係る核酸制御配列のアレイとして定義される。本明細書中で用いられるプロモーターには、転写開始部位の近くの必要な核酸配列、例えばポリメラーゼII型プロモーターの場合、TATA因子または開始因子が含まれる。プロモーターはまた、場合により、その近くに、アクチベーターまたはリプレッサー結合部位（群）（例えばSP1またはNFカッパB部位）、または遠位のエンハンサーまたはリプレッサー因子（これらは転写開始部位から数千塩基対ほどの位置にあり得る）を含む。「構成性」プロモーターは、ほとんどの環境および発生上の条件下で活性なプロモーターである。「誘導性」プロモーターまたは「組織特異的」プロモーターは非構成性プロモーターであり、これは例えば環境的、時間的、組織特異的、または発生上の調節下で活性である。用語「作動可能に連結された」とは、核酸発現制御配列（例えばプロ

モーター、または転写因子結合部位のアレイ)と第二の核酸配列間の機能性連結を表し、ここに発現制御配列は、第二の配列に対応する核酸の転写に関連する。

【0046】

「発現ベクター」は、組換え的または合成的に作成された、宿主細胞内で特定の核酸の転写を可能にする一連の特定された核酸因子を有する核酸構築物である。発現ベクターはプラスミド、ウイルス、または核酸断片の部分であり得る。典型的に、発現ベクターは、プロモーターに作動可能に連結された、転写される核酸を含む。

【0047】

レポーター遺伝子のクローニングおよび発現

A. 一般的組換えDNA法

本発明は組換え遺伝学の分野の通常技術に依存するものである。本発明において使用する一般的方法を開示している基本的テキストには、Sambrook et al., . Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); and Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994) が含まれる。標準的突然変異誘発法を用いて、選択されたレポーター遺伝子または内因性遺伝子内にナンセンス変異を導入することができる。

【0048】

核酸に関して、サイズはキロベース(kb)または塩基対(bp)で与えられる。これらはアガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動、配列決定された核酸、または公開されているDNA配列から見積もられたものである。タンパク質に関して、サイズはキロダルトン(kDa)またはアミノ酸残基数で与えられる。タンパク質のサイズは、ゲル電気泳動、配列決定されたタンパク質、導かれたアミノ酸配列、または公開されているタンパク質配列から見積もられる。

【0049】

市販されていないオリゴヌクレオチドは、Beaucage & Caruthers, Tetrahedron Letts. 22:1859-1862 (1981) によって最初に記載された固相ホスホルアミダイトリエステル法にしたがい、Van Devanter et al., Nucleic Acids Res. 12

:6159-6168 (1984) に記載のように自動合成装置を用いて化学的に合成できる。オリゴヌクレオチドの精製は、天然アクリルアミドゲル電気泳動またはアニオン交換HPLCにより、Pearson & Reanier, J. Chrom. 255:137-149 (1983) に記載のように行う。

【0050】

クローン化遺伝子および合成オリゴヌクレオチドの配列は、例えば二本鎖鋳型を配列決定するための鎖終結法 (Wallace et al., Gene 16:21-26 (1981)) を用いてクローニングした後に確認できる。

【0051】

B. ヌクレオチド配列の単離のためのクローニング法

一般に、本発明の異種性レポーター遺伝子をコードする核酸配列はcDNAおよびゲノムDNAライブラリーからプローブを用いるハイブリダイゼーションによって単離されるか、あるいはオリゴヌクレオチドプライマーを用いる増幅技術を用いて単離される。例えば、レポーター配列は典型的に哺乳類核酸(ゲノムまたはcDNA)ライブラリーから、核酸プローブ(この配列はGenebankまたは他のデータベースまたは公開から得られたものである)を用いるハイブリダイゼーションによってか、あるいはクローン化された相同分子種を用いることによって単離される。RNAおよびcDNAを単離するための適当な組織は当業者によって決定される。ゲノムおよびcDNAライブラリーの作成方法は周知である(例えばGubler & Hoffman, Gene 25:263-269 (1983); Sambrook et al., 上記; Ausubel et al., 上記を参照)。組換えファージは、Benton & Davis, Science 196:180-182 (1977) に記載のプラークハイブリダイゼーションによって分析される。コロニーハイブリダイゼーションは、Grunstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72:3961-3965 (1975) に全般に記載されるように行う。

【0052】

また、プライマーを用いるPCRおよびLCRのような増幅技術を用いて、DNAまたはRNA由来のレポーター配列を増幅および単離することができる(例えばDieffenbach & Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual (1995); 米国特許第4,683,195号および第4,683,202号; PCR Protocols:

A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990) を参照)。これらのプライマーを用いて、例えば完全長配列を増幅するか、あるいは1から数百ヌクレオチドのプローブを増幅し、次いでこれを用いて哺乳類ライブラリーを完全長クローンに関してスクリーニングすることができる。さらに、以下のアミノ酸配列をコードする分解性プライマーを用いて、特定のレポーター遺伝子の配列を増幅することができる。上記のように、このようなプライマーを用いて、完全長配列を単離するか、あるいは例えばライブラリー由来の単離される完全長配列に対して使用できるプローブを単離することができる。また、レポーター遺伝子をコードする核酸は、抗体をプローブとして用いて発現ライブラリーから単離できる。

【0053】

合成オリゴヌクレオチドを用いて組換えレポーター遺伝子を構築することができる。この方法は、遺伝子のセンスおよびナンセンス両鎖を表す、通常40 - 120bp長の一連のオーバーラップするオリゴヌクレオチドを用いて行う。次いでこれらのDNA断片はアニーリングされ、連結され、クローニングされる。

【0054】

場合により、レポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼおよび β -グロビンの組み合わせを含む、キメラタンパク質をコードする核酸を標準的手法にしたがって作成することができる。また、このキメラ遺伝子は異なる種、例えば細菌（例えば大腸菌）、酵母、無脊椎動物、例えばハエおよび線虫、および哺乳類遺伝子（例えばラット、マウス、またはヒト遺伝子）由来の遺伝子またはエキソンの組み合わせであり得る。キメラ遺伝子はある遺伝子由来のエキソンおよびイントロン、および別の遺伝子由来の第二のエキソンを有することがよくある。キメラ遺伝子の作成に関して選択される他の異種タンパク質には、例えば赤色または緑色蛍光タンパク質、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、キナーゼ、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルタメート受容体およびロドプシンプレシーケンス (presequence) が含まれる。

【0055】

C. 原核生物および真核生物における発現

クローン化遺伝子または核酸を発現させるため、典型的にはこの配列を、転写を指揮するプロモーター、場合により転写または翻訳ターミネーター、および場合によりタンパク質をコードする核酸、翻訳開始に関するリボソーム結合部位に関するものを含む発現ベクター内へサブクローニングする。適当な細菌プロモーターは当分野に周知であり、例えば Sambrook et al. および Ausubel et al. に記載されている。細菌発現系は例えば大腸菌、バシラス種およびサルモネラにおいて利用可能である (Palva et al., Gene 22:229-235 (1983); Mosbach et al., Nature 302:543-545 (1983))。このような発現系用のキットは市販されている。哺乳類細胞、酵母、および昆虫細胞に関する真核生物発現系は当分野に周知であり、また市販されている。RNA発現系、例えばSP6、T3またはT7 RNAポリメラーゼを用いる系もまた当業者に周知であり、市販されている。

【0056】

異種核酸の発現を指揮するのに用いられるプロモーターは、その具体的な適用に依存する。このプロモーターは場合により、異種性転写開始部位から、その天然設定における転写開始部位からとほぼ同じ距離に位置する。しかし、当分野に知られているように、プロモーター機能を喪失することなく、この距離においてはいくつかのバリエーションを適応させることができる。

【0057】

プロモーターに加えて、発現ベクターは典型的に、宿主細胞内での核酸の発現に関して必要とされるすべてのさらなる因子を含む転写単位または発現カセットを含む。したがって、典型的な発現カセットは、核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターおよび転写物の効率的なポリアダニル化に必要とされるシグナル、リボソーム結合部位、および翻訳終結を含む。カセットのさらなる因子には、エンハンサーおよび、構造遺伝子としてゲノムDNAを用いる場合には、機能的スプライドナーおよびアクセプター部位を有するイントロンを含む。

【0058】

プロモーター配列に加えて、発現カセットは、構造遺伝子の下流に、効率的な終結を提供する転写終結領域を含むべきである。この終結領域はプロモーター配列と同一の遺伝子から得てもよく、あるいは別の遺伝子から得てもよい。

【0059】

遺伝情報の細胞内への輸送に用いられる具体的な発現ベクターは、特に重要ではない。真核および原核生物細胞における発現に関して用いられる任意の慣用的ベクターを用いることができる。標準的細菌発現ベクターには、プラスミド、例えばpBR322に基づくプラスミド、pSKF、pET23D、および融合発現系、例えばGSTおよびLacZが含まれる。またエピトープタグを組換えタンパク質に加え、便利な単離方法を提供できる（例えばc-myc）。

【0060】

真核生物ウイルス由来の調節因子を含む発現ベクターは、典型的に、真核生物発現ベクター、例えばSV40ベクター、パピローマウイルスベクター、および Epstein-Barr ウイルス由来のベクター中で用いられる。他の例示的真核生物ベクターには、pMSG、pAV009/A⁺、pMTO10/A⁺、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVE、および、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腫瘍ウイルスプロモーター、Rous肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核生物細胞内での発現に有効であることが示される他のプロモーターの指揮下に、タンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターが含まれる。

【0061】

また、発現ベクター内に典型的に含まれる因子には、大腸菌において機能するレプリコン、組換えプラスミドを有する細菌の選択を可能にする抗生物質耐性をコードする遺伝子、および、真核生物配列の挿入を可能にするプラスミドの必須でない領域における唯一の制限部位が含まれる。選択される具体的な抗生物質耐性は重要ではなく、当分野に既知の多数の任意の耐性遺伝子が適当である。原核生物配列はまた、場合により、必要であれば、真核生物細胞内でのこのDNAの複製を妨害しないように選択される。

【0062】

標準的トランスフェクション方法を用いて、この核酸を発現する、細菌、哺乳類、酵母または昆虫セルラインを作成する。真核生物および原核生物細胞の形質

転換は、標準的技術にしたがって行う（例えば Morrison, J. Bact. 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362 (Wu et al., eds, 1983)）。

【0063】

外来のヌクレオチド配列を宿主細胞内へ導入する周知の手法のいずれかを用いることができる。これらには、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム、マイクロインジェクション、プラズマベクター、ウイルスベクターの使用および任意の他の周知の、クローン化ゲノムDNA、cDNA、合成DNAまたは他の外来遺伝物質の宿主細胞内への導入方法が含まれる（例えば Sambrook et al., 上記を参照）。唯一必要なことは、用いられる具体的な遺伝子工学手法が、少なくとも1つの遺伝子を宿主細胞内へ首尾良く導入可能なものであることである。

【0064】

発現ベクターを細胞内へ導入した後、トランスフェクトされた細胞を、以下に同定される標準的技術を用いてレポーター遺伝子の発現に好ましい条件下で培養する。

【0065】

異種性レポーター遺伝子に加えて、また、内因性遺伝子をレポーターとして用いることができる。適当な内因性遺伝子、例えばCFTR、ジストロフィン、免疫グロブリン、 α -グロビン、p53、網膜芽細胞腫、ニューロフィブロミン（neurofibromin）などを含む細胞を、以下に記載の標準的技術を用いてこの内因性レポーター遺伝子の発現に好ましい条件下で培養する。

【0066】

細胞培養および選択

組織または血液サンプル由来のセルラインおよび培養細胞を含む、本発明の検定において用いられる細胞の培養は当分野に周知である。Freshney (Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)) およびその引用文献は細胞の培養に関する一般的な指針を提供する。細胞培養に関するさらなる情報は Ausubel および Sambrook 上記に見出せる。細胞培養培地は The Hand

book of Microbiological Media (Atlas & Parks, eds., 1993) に記載されている。さらなる情報は商用文献、例えば the Life Science Research Cell Culture Catalogue (1998) (Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, MO)) および例えば the Plant Culture Catalogue and Supplement (1997) (Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, MO)) に見出せる。細胞は、意図される適用および利用可能な装置に応じて、バルクフラスコ中で培養して、これを支持層（例えばマイクロタイタープレート）に加えることができ、あるいは支持層（例えばマイクロタイタープレートのウェル中）で直接培養することができる。

【0067】

細胞の選択は意図される適用に基づく。特定細胞における遺伝子の早期翻訳終結の阻害が検定の標的である場合、この特定細胞またはこの細胞の関連する細胞培養形態は典型的に標的である。いくつかの態様では、培養時に、この細胞が入っている容器の支持層に接着する接着細胞が好ましい。接着細胞タイプの多くの例は既知であり、これには上皮細胞および内皮細胞タイプが含まれる。性質上接着性ではない細胞は、支持層を化学的に修飾する（例えば支持層をシランで処理してOH基を提供するか、あるいはアミン試薬で処理してアミン基を提供する）ことによってか、あるいはこの細胞上に細胞表面レセプター分子を発現させ（例えば組換え的に）、支持層に固定された適当なリガンドを提供することによって接着性にするすることができることがよくある。一態様では、この細胞は、ハイブリドーマまたはプレB細胞である。別の態様では、この細胞は哺乳類またはマウス細胞、例えば293細胞、HeLa細胞、HepG2細胞、K562細胞、または3T3細胞である。

【0068】

阻害物質およびハイスループット（高処理量）法

A. 阻害物質

早期翻訳終結およびNMDの阻害物質および調節因子として試験する化合物は、いずれかの小さな化学的化合物または生物学的実体（例えば、タンパク質、糖、核酸または脂質）であり得る。典型的に、試験化合物は小化学分子およびペプチドであろう。本質的にいずれかの化合物を、本発明の検定において潜在的な調

節因子として使用することができる。該化合物は、水溶液または有機溶液（例えば、メタノール、DMSOまたは有機溶媒の混合物）に溶解することができる。該アッセイ（検定）は、該アッセイ工程を自動化し、そしていずれかの便利な供給源からアッセイに化合物を供給することによって（これらは、例えば、ロボットアッセイにおけるマイクロタイタープレートのマイクロタイターフォーマット中で典型的に平行して行なう）、大きいケミカルライブラリーをスクリーニングするように設計する。。化学的化合物の多数の供給主（例えば、シグマ（St. Louis, MO）、アルドリッチ（St. Louis, MO）、シグマ - アルドリッチ（St. Louis, MO）、フルカ・ケミカバイオケミカアナリティカ（Buchs, スイス）などを含む）が存在することが知られる。

【0069】

ある実施態様において、ハイスループットスクリーニング法は、多数の潜在的な治療化合物（潜在的な調節因子またはリガンド化合物）を含有するコンビナトリアルケミカルライブラリーまたはコンビナトリアルペプチドライブラリーを含む。次いで、それら「コンビナトリアルケミカルライブラリー」または「リガンドライブラリー」を、本明細書に記載の通り、1つ以上のアッセイにおいてスクリーニングして、望む固有の活性を示すそれらライブラリー要素（ある化学種またはサブクラス）を同定する。そのようにして同定した該化合物は、通常の「リード化合物」として機能したり、またはそれ自身潜在的なもしくは実際の治療として使用することができる。

【0070】

コンビナトリアルケミカルライブラリーは、化学的な合成もしくは生物学的な合成のいずれかによって、または多数の化学的な「ビルディングブロック」（例えば、試薬）を組み合わせることによって得られる、種々の化学的化合物の集合である。例えば、リニア（linear）コンビナトリアルケミカルライブラリー（例えば、ポリペプチドライブラリー）は、一定の化合物の長さ（すなわち、ポリペプチド化合物におけるアミノ酸数）についてのあらゆる可能な方法で、化学的なビルディングブロック（例えば、アミノ酸）の一群を組み合わせることによって得られる。何百万の化学的な化合物を、それら化学的なビルディングブロックを

コンビナトリアルに組み合わせることによって製造することができる。

【0071】

コンビナトリアルケミカルライブラリーの製造およびスクリーニングについては、当該分野の当業者にとってよく知られている。該コンビナトリアルケミカルライブラリーとしては、例えばペプチドライブラリー（例えば、米国特許第5,010,175号、FurkaによるInt. J. Pept. Prot. Res. 37: 487-493 (1991) およびHoughtonらによるNature, 354: 84-88 (1991)を参照）を含むが、これに限定しない。化学的に多様なライブラリーを得るために他の化学をも使用することができる。該化学としては、例えばペプチド（例えば、PCT公開番号WO91/19735）、コード化されたペプチド（例えば、PCT公開番号WO93/20242）、ランダムなバイオオリゴマー（例えば、PCT公開番号WO92/00091）、ベンゾジアゼピン（例えば、米国特許第5,288,514号）、ダイバーソマー（diversomer）（例えば、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチド（HobbsらによるProc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913 (1993)）、ビニル性（vinylogous）ポリペプチド（HagiharaらによるJ. Amer. Chem. Soc., 114: 6568 (1992)）、グルコースのスカーホールドを有する非ペプチド性ペプチド擬態（Hirshmannらによる, J. Amer. Chem. Soc, 114: 9217-9218 (1992)）、小化合物ライブラリーの類似的な有機合成（ChenらによるJ. Amer. Chem. Soc, 116: 2661 (1994)）、オリゴカルバメート（ChoらによるScience 261; 1303 (1993)）、および/またはペプチジルホスホネート（CampbellらによるJ. Org. Chem. 59; 658 (1994)）、核酸ライブラリー（例えば、Ausubel, BergerおよびSambrookによる、上記の全て）、ペプチド核酸ライブラリー（例えば、米国特許第5,539,083号を参照）、抗体ライブラリー（例えば、VaughnらによるNature Biotechnology, 14 (3): 309-314 (1996)およびPCT/US96/10287）、炭水化物ライブラリー（例えば、Liangらによる、Science, 274, 1520-1522 (1996)および米国特許第5,593,853号を参照）、小有機分子ライブラリー（例えば、ベンゾジアゼピンについては、Baum C & EN, 1月18日, 33頁 (1993)；イソプレノイドについては、米国特許第5,569,588号）；チアゾリジノンおよびメタチアゾロンについては、米国特許5,549,974号；ピロリジンについては、米国特許第5,525,735号および5,519,134号；モルホリノ化合

物については、米国特許第5,506,337号；ベンゾジアゼピンについては、米国特許第5,228,514号など）を含むが、これらに限定されない。

【0072】

コンビナトリアルライブラリーの製造装置は、商業的に入手することができる（例えば、357MPS、390MPS、Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MAを参照）。加えて、多数のコンビナトリアルライブラリーそのものを商業的に入手することができる（例えば、ComGenex, Princeton, N. J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MDなどを参照）。

【0073】

B. 固体状態および溶解性のハイスループットアッセイ

ある実施態様において、本発明はハイスループットフォーマットにおけるインビトロ溶解性アッセイを提供する。別の実施態様において、本発明はハイスループットフォーマットにおける溶解性または固相ベースのインビボアッセイを提供する。ここで、細胞または組織を固相基質と結合させる。場合により、インビトロアッセイは固相アッセイである。

【0074】

本発明のハイスループットアッセイにおいて、1日で数千の異なる調節因子またはリガンドをスクリーニングすることができる。特に、マイクロタイタープレートの各ウェルを用いて、選んだ潜在的な調節因子に対する別個のアッセイを行なうことができたり、または濃縮時間もしくはインキュベーション時間の効果を観察する場合には、毎5～10ウェルについて1つの調節因子を試験することができる。従って、1つの標準的なマイクロタイタープレートは約100（例えば、96）の調節因子をアッセイすることができる。1536ウェルプレートを使用する場合には、1つのプレートは約100～約1500の異なる化合物を容易にアッセイすることができる。1日でいくつかの異なるプレートをアッセイすることが可能であり；約6,000～20,000の異なる化合物についてのアッセイスクリーニングは、本発明の集積システムを用いて可能である。より最近では、試薬

操作のためのマイクロ流体法 (microfluidic approaches) が開発されている。

【0075】

目的の分子または細胞を、タグまたはタグバインダーの共有結合または非共有結合で固体状態の成分に直接的にまたは間接的に結合させることができる。多数のタグおよびタグバインダーを、文献中によく記載されている公知の分子相互作用に基づいて使用することができる。例えば、タグが天然のバインダー (例えば、ビオチン、プロテインAまたはプロテインG) を有する場合には、適当なタグバインダー (例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ネウトラビジン (neutra vidin)、免疫グロブリンのFc領域など) と組み合わせて使用することができる。天然の結合基を有する分子 (例えば、ビオチン) に対する抗体をも広く利用することができる。適当なタグバインダーについては、例えばSIGMA Immunochemicals 1998 SIGMAカタログ, St. Louis, MOを参照。

【0076】

同様に、いずれかのハプテン化合物または抗原化合物を適当な抗体と組み合わせて用いて、タグ/タグバインダーの対を得ることができる。何千もの特異的な抗体を商業的に入手することができ、多数の異なる抗体が文献に記載されている。例えば、ある一般的な配置の場合には、タグは1次抗体であり、タグバインダーは1次抗体を認識する2次抗体である。抗体-抗原の相互作用に加えて、受容体-リガンドの相互作用もまた、タグとタグバインダーの対として適当である。例えば、細胞膜受容体の作動薬および拮抗薬 (例えば、細胞受容体-リガンドの相互作用 (例えば、トランスフェリン、c-キット、ウイルス受容リガンド、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、インターロイキン受容体、免疫グロブリン受容体および抗体)、カドヘリン (cadherein) ファミリー、インテグリンファミリーおよびセレクチンファミリーなど) が挙げられる (例えば、PigottおよびPowerによるThe Adhesion Molecule Facts Book I (1993)を参照)。同様に、毒および毒液、ウイルスエピトープ、ホルモン (例えば、オピエート、ステロイドなど)、細胞内受容体 (これは、様々な小リガンド (例えば、ステロイド、甲状腺ホルモン、レチノイドおよびビタミン) およびペプチドの効果を媒介する)、薬物、レシチン、糖、核酸 (これは、直鎖または環状のポリマー配置である)

、多糖類、プロテイン、リン脂質および抗体は全て、様々な細胞受容体と相互作用することができる。

【0077】

合成ポリマー（例えば、ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリウレア、ポリアミド、ポリエチレンイミン、ポリアリレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミドおよびポリアセテート）はまた適当なタグまたはタグバインダーを形成することができる。多数のタグ/タグバインダーの対もまた、本明細書に開示する総説から当該分野の当業者にとって明らかな通り、本明細書に記載のアッセイシステムにおいても有用である。

【0078】

通常のリンカー（例えば、ペプチド、ポリエーテルなど）もまたタグとして機能することができ、このものはポリペプチド配列（例えば、約5～200アミノ酸の間のpoly配列）を含む。それらフレキシブルなリンカーは、当該分野の当業者にとって知られている。例えば、ポリ（エチレングリコール）リンカーは、Sheawater Polymers, Inc. Huntsville, Alabamaから入手することができる。これらのリンカーは、場合によりアミド結合基、スルフヒドリル結合基またはヘテロ官能結合基を有する。

【0079】

タグバインダーは、現在利用可能ないずれかの様々な方法を用いて固体の基質に固定する。固体の基質は通常、全てまたは一部の基質を表面に化学基を固定させた化学的試薬（このものは、一部のタグバインダーと反応活性である）に曝露させることによって、誘導化されたりまたは官能化される。例えば、長鎖部分との結合に適当な基としては、アミン、ヒドロキシル、チオールおよびカルボキシル基を含む。アミノアルキルシランおよびヒドロキシアルキルシランは、様々な基質（例えば、ガラス表面）を官能化するのに使用することができる。それら固相バイオポリマーアレイの構築は、文献に十分に記載されている。例えば、MerrifieldによるJ. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2254 (1963)（これは、例えばペプチドの固相合成について記載する）；GeysenらによるJ. Immun. Meth. 102: 259-274 (1987)（これは、ピン上での固相成分の製造について記載する）；Frankお

およびDoringによる、Tetrahedron 44; 6031-6040 (1988) (これは、セルロースディスク上での様々なペプチド配列の製造について記載する) ; FodorらによるScience, 251; 767-777 (1991); SheldonらによるClinical Chemistry, 39 (4): 718-719 (1993); およびKozalらによるNature Medicine 2 (7): 753-759 (1996) (これらは全て、固相基質に固定化させたバイオポリマーのアレイについて記載する) を参照。タグバインダーを固定化する非化学的な方法としては、例えば他の通常の方法 (例えば、加熱、UV放射による橋かけ (cross-linking) など) を含む。

【0080】

ラベルおよび検出法

検出可能なラベルおよび部分は、1次ラベル (該ラベルは、直接的に検出される要素、または直接的に検出し得る要素を与える要素を含む)、または2次ラベル (ここで、例えば免疫学的なラベル化において一般的である通り、該検出ラベルは、該1次ラベルと結合する) であり得る。ラベルへの導入方法、ラベル化法およびラベルの検出方法については、PolakおよびVan NoordenによるIntroduction to Immunocytochemistry (2版、1977) およびHandbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, a combined handbook and catalogue Published by Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. で知られる。1次および2次のラベルとしては、例えば未検出の要素および検出される要素を含むことができる。

【0081】

該アッセイにおいて使用される抗体に特有の結合を有意に妨害しない限り、該アッセイで使用されるあるラベルまたは検出基は、本発明の態様にとって重要ではない。該検出基は、検出可能な物理学的性質または化学的性質を有するいずれかの物質であり得る。それら検出可能なラベルについてはイムノアッセイの分野でよく開発されており、通常、それらの方法に有用なほとんどいずれかのラベルを本発明に適用することができる。従って、ラベルは分光分析、光化学、生化学、免疫化学、電気科学、光学もしくは化学の手法によって検出可能ないずれかの組成物である。

【0082】

本発明において有用な1次ラベルおよび2次ラベルとしては、例えば蛍光色素（例えば、フルオレセインおよびその誘導体（例えば、フルオロセインイソチオシアネート（FITC）およびOregon Green（登録商標）、ローダミンおよびその誘導体（例えば、テキサスレッド、テトラロージミンイソチオシアネート（TRITC）など）、ジゴキシゲニン(digoxigenin)、ビオチン、フィコエリトリン(phycoerythrin)、AMCA, CyDyes（登録商標）など）および放射標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P など）、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）、分光学的な比色ラベル（例えば、金コロイド、または色ガラスもしくは色プラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）のベッド）を含むことができる。

【0083】

該ラベルは、当該分野でよく知られている方法に従って、検出アッセイの成分に直接的にまたは間接的に結合することができる。非放射性ラベルは、間接的な方法によって結合されることが多い。通常、リガンド分子（例えば、ビオチン）は分子に共有結合させる。次いで、該リガンドを別の分子（例えば、ストレプトアビジン）に結合させる。このものは間接的に検出可能であったり、またはシグナルシステム（例えば、検出可能な酵素、蛍光化合物または化学発光化合物）に共有的に結合させる。上記の通り、広範囲のラベルを使用することができ、ラベルの選択は要求される感度、化合物との結合の容易さ、安定性の要求、利用可能な装置、および処分の準備に依存する。

【0084】

通常、あるプローブまたはプローブの組み合わせを追跡する検出器は、認識用の試薬ラベルを検出するのに使用する。典型的な検出器としては、例えば分光光度計、光電管およびフォトダイオード、顕微鏡、シンチレーションカウンター、カムコーダー、フィルムなど、並びにそれらの組み合わせを含む。適当な検出器は、例えば当該分野の当業者にとって知られる様々な商業的供給源から広く入手可能である。通常、結合したラベル化した核酸を含む基質の光学的な画像を、続くコンピューター分析でデジタル化する。

【0085】

好ましいラベルとしては、例えば酵素（例えば、ヒドロラーゼ、特にホスファターゼ、キナーゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼ）、オキシダーゼ（oxidotases）（特に、ペルオキシダーゼ）；化学発光（例えば、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）と、分解物として光量子を与える基質）；入手可能なキット（例えば、Molecular Probes, Amersham, Boehringer-Mannheim, and Life Technologies/ Gibco BRL）；着色物（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアルカリホスファターゼと、着色した沈降物を与える基質）；キット（Life Technologies/ Gibco BRLおよびBoehringer-Mannheim製）；ヘミ蛍光分析（例えば、アルカリホスファターゼと、AttoPhos基質（Amersham）または蛍光基質を与える他の基質）；蛍光（例えば、Cy-5（Amersham）、フルオレセイン、他の蛍光タグおよび蛍光タンパク質（例えば、緑色および赤色の蛍光タンパク質）；検出可能な部分と結合した抗体；および放射能を利用したラベルを含む。ラベル化および検出に関する他の方法は、当該分野の当業者にとって容易に明らかであろう。例えば、表現型の変化（例えば、薬物耐性）を本発明における「ラベル」として使用することができる。

【0086】

検出可能な2次ラベル化法の好ましい例は、細胞表面分子（例えば、免疫グロブリン）またはチャンネル分子（例えば、CFTR）を認識するラベル抗体を使用する。該抗体は、FACSを用いて検出する。別の実施態様において、抗体についてELISAアッセイを用いて、本発明のレポーター分子を検出する。

【0087】

レポーター部分または検出分子として使用することができる好ましい酵素としては、例えば β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色および赤色の蛍光タンパク質、キナーゼ、ペルオキシダーゼ（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ホスファターゼ（例えば、アルカリホスファターゼ）、およびクロラムフェニコールトランスフェラーゼを含む。ルシフェラーゼについての化学発光基質はルシフェリンである。 β -ガラクトシダーゼについての化学発光基質のあ

る実施態様は、4 - メチルウンベリフェリル (methylumbelliferyl) - D - ガラクトシドである。アルカリホスファターゼ基質の実施態様としては、例えば p - ニトロフェニルホスフェート (pNPP) (これは、分光光度計を用いて検出する) ; 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート / ニトロブルーテトラゾリウム (BCIP / NBT) および速い赤色 / ナフトール AS - TR ホスフェート (これは、視覚的に検出する) ; および 4 - メトキシ - 4 - (3 - ホスホノフェニル) スピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2' - アダマンタン] (これは、照度計を用いて検出する) を含む。ホースラディッシュペルオキシダーゼ基質の実施態様としては、2 , 2' - アジノビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸) (ABTS)、5 - アミノサリチル酸 (5AS)、o - ジアニシジンおよび o - フェニレンジアミン (OPD) (これらは、分光光度計を用いて検出する) ; および 3 , 3 , 5 , 5' - テトラメチルベンジジン (TMB)、3 , 3' - ジアミノベンジジン (DAB)、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール (AEC) および 4 - クロロ - 1 - ナフトール (4C1N) (これらは、視覚的に検出する) を含む。他の適当な基質は、当該分野の当業者にとって知られる。酵素 - 基質反応および生成物の検出は、当該分野の当業者にとって知られる標準的な方法に従って実施され、該酵素イムノアッセイを実施するためのキットを上記の通り入手することができる。

【0088】

ある実施態様において、早期翻訳終結または NMD の阻害を、固体支持層に固定化した細胞中のラベルの量を定量することによって測定される。典型的に、細胞のインキュベートの間に試験化合物が存在することにより、試験化合物を含まないコントロールのインキュベーションの場合に対するか、または細胞の種類および培地条件 (例えば、レポーター分子の使用) について確立したベースラインと比較して、ラベルの量は増減するであろう。ラベルの検出方法および定量方法は、当該分野の当業者にとってよく知られている。従って、例えばラベルが放射性ラベルである場合には、検出法はシンチレーションカウンターまたは写真フィルム (例えば、オートラジオグラフィ) を含む。ラベルが光学的に検出可能である場合には、典型的な検出器は顕微鏡、カメラ、光電管およびフォトダイオー

ド、並びに広く利用され得る多数の他の検出システムを含む。

【0089】

RNA発現をも、当該分野で知られる技術によって分析することができ、例えば逆転写およびmRNAの増幅（例えば、RTQ-PCR）、全RNAまたはポリA⁺RNAの単離、ノーザンブロット、ドット(dot)ブロット、インシチュア-ハイブリダイゼーション、RNAアーゼの保護、DNAマイクロチップアレイの探索(probing)などを挙げられる。ある実施態様において、高密度オリゴヌクレオチド分析法（例えば、GeneChip（登録商標））を本発明のRNAレポーター分子を同定するのに使用する。例えば、GunthandらによるAIDS Res. Hum. Retroviruses 14; 869-876 (1998); KozalらによるNat. Med.2; 753-759 (1996); MatsonらによるAnal. Biochem. 224: 110-106 (1995); LockhartらによるNat. Biotechnol. 14; 1675-1680 (1996); GingerasらによるGenome Res. 8: 435-448 (1998); HaciaらによるNucleic Acids Res. 26: 3865-3866 (1998)を参照。

【0090】

キット

本発明はまた、早期翻訳終結およびNMDの阻害物質をスクリーニングするキットを提供する。それらのキットは、容易に入手可能な物質および試薬から製造することができる。例えば、それらのキットは、インビトロでの翻訳細胞抽出物、ポリペプチドをコード化した核酸（ここで、該ポリペプチドのコード配列は、早期終止コドンを含む）、反応チューブおよび阻害活性を試験するための指示書を含む物質のうちのいずれか1つ以上を含むことができる。広範囲にわたるキットおよび成分を、該キットの予定するユーザーおよび該ユーザーのある要求に応じて、本発明に従って製造することができる。

【0091】

それら各個別の文献または特許出願が具体的におよび個別に本明細書の一部を構成すると示す通り、本明細書で引用する全ての文献および特許出願は本明細書の一部を構成する。

【0092】

理解を容易にする目的で、上記の発明を例示および実施例という形でいくらか

詳細に記載するが、本発明の精神および本特許請求の範囲を逸脱することなく、ある変化および改変を行なうことができることを、当該分野の当業者は本発明の教示に照らして容易に明らかであろう。

【0093】

実施例

以下の実施例は、単に例示の目的で示すものであって、限定の目的で示すものではない。当業者は、本質的に同様な結果を得るために、変えたりまたは改変したりすることができる様々なあまり重要でないパラメーターを容易に認識するであろう。

【0094】

実施例 I：細胞をベースとするアッセイ

1日目午前中に、クローン55-31、pMLT55を用いて安定にトランスフェクトした293セルライン(図1を参照)を、10%胎児ウシ血清を有するDMEM培地中の96ウェルプレートに置いた。各ウェル当たり100 μ L中に40,000細胞で、約80プレートを培養した。該細胞を37 $^{\circ}$ Cで終夜インキュベートした。

【0095】

2日目に、試験化合物(DMSO(100 μ L)の1mMストック溶液の1 μ L; 10 μ Mの最終濃度)を加えた。コントロールとして、各プレートのコラム12にG418(1mg/mL)を加えた。該プレートを、37 $^{\circ}$ Cで12~16時間インキュベートした。

【0096】

3日目に、該細胞にルシフェラーゼ基質を加え、該プレートをTorcon自動化ルシフェラーゼアッセイ読み取り機を用いて96ウェルプレートについて読み取った(例えば、図3~4を参照)。ルシフェラーゼ基質は、商業的に入手可能(例えば、Promega)である。

【0097】

場合により、ある日の早くにプレートし、その日の遅くに化合物を加え、終夜インキュベートし、次いで翌日にルシフェラーゼ活性をアッセイすることによ

て、1日目および2日目を一緒にすることができる。

【0098】

実施例II . バイオケミカルアッセイ

インビトロで製造したレポーターRNA (図5の構築物を参照)を、標準的な方法に記載の完全補足したウサギの網状赤血球ライゼート (15 μ L) (すなわち、JacksonおよびHuntによる、Methods in Enzymology, 96: 50-75 (1983)に記載の方法によって製造)に加えた。インビトロで転写したRNA (0.5 ~ 1 μ g)を、反応毎に使用した。該反応液を2%のDMSO溶液 (これは、20 μ Mの試験化合物を含有する) (15 μ L)と混合した。該反応液を加温したインキュベーター中、30 で90分間インキュベートした。ルシフェラーゼ基質を加え、ルシフェラーゼ活性をTorcon自動化読み取り機を用いて読み取った (図6 ~ 7を参照)。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、一時的または安定な一時的感染細胞を用いるアッセイに関する構築物の全体図を示す。終止コドン、遺伝子、およびプロモーターの位置が示されている。

【図2】 図2A - Cは、G418媒介性抑制がセルライン特異的ではないことを示す。示されたプラスミドで24時間、一時的に感染させた細胞を、示された濃度のG418 (パネルA、pMLT49; パネルB、pMLT54; パネルC、pMLT55)に暴露した。ルシフェラーゼ活性は、12時間暴露後に測定した。

【図3】 図3A - Bは、プラスミドpMLT55を用いて安定にトランスフェクトされた293細胞の種々のクローンにおけるG418媒介性抑制を示す (パネルA、相対ルシフェラーゼ活性; パネルB、倍活性化 (fold activation))。記載の独立したクローンを記載の濃度のG418に暴露した。ルシフェラーゼ活性は12時間暴露後に測定した。

【図4】 図4は、高処理量形式 (96ウェルプレート)における、安定にトランスフェクトされた293セルライン (クローン #31)でのG418媒介性抑制を示す。96ウェルプレートのウェル当たり、示された細胞数を培養し

た。細胞は示された濃度のG418に暴露した。ルシフェラーゼ活性は、12時間暴露後に、ロボット96ウェルプレートリーダーで測定した。また、ゲンタマイシンを用いて、NMDおよび早期翻訳終結を阻害することができた。

【図5】 図5は、RR L（ウサギ網状赤血球ライセート）を用いる生化学的抑制アッセイにおいて使用するための構築物の全体図を示す。終止コドン、遺伝子、IRES配列、およびプロモーター領域の位置が記載されている。

【図6】 図6A-DはRR Lを用いる生化学的抑制アッセイの性質を示す。示された量のRR LおよびルシフェラーゼRNA（パネルAおよびB、野生型；パネルCおよびD、終止コドン）の存在下、インビトロ翻訳反応を行った。低レベルのルシフェラーゼ活性はRNA（パネルAおよびC）およびRR L（パネルBおよびD）依存性であった。WTおよび終止コドン含有ルシフェラーゼRNAの概略図を示す。ルシフェラーゼ活性は90分のインキュベーション後に測定した。反応は96ウェル形式で行った。

【図7】 図7A-Bはゲンタマイシンによる抑制が時間依存性であることを示す。インビトロ翻訳アッセイは、RR L、ルシフェラーゼRNA（パネルA、WT；パネルB、終止コドン）および示された濃度のゲンタマイシンの存在下で行った。反応物を45または90分インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。WTおよび終止コドンを含むRNAの概略図を示す。この反応は96または384ウェル形式で行った。

【図1】

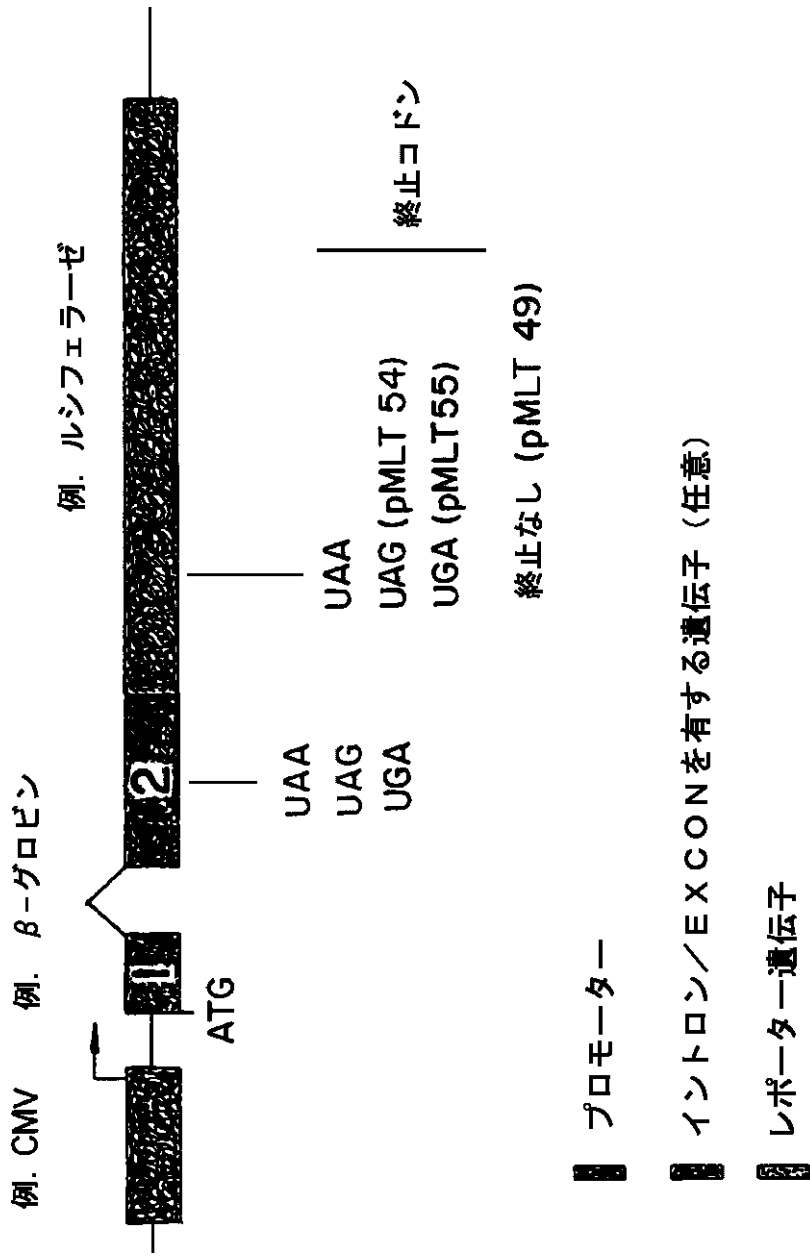


FIG. 1.

【图2】

FIG. 2A.

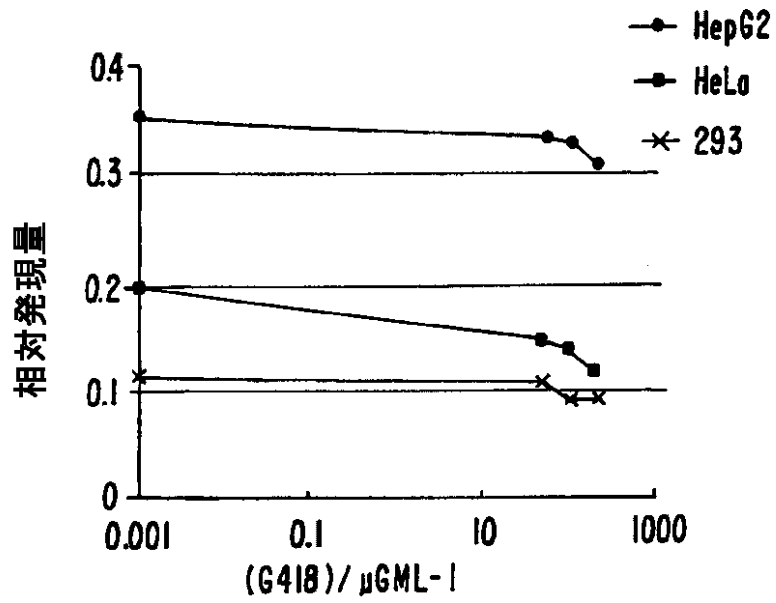


FIG. 2B.

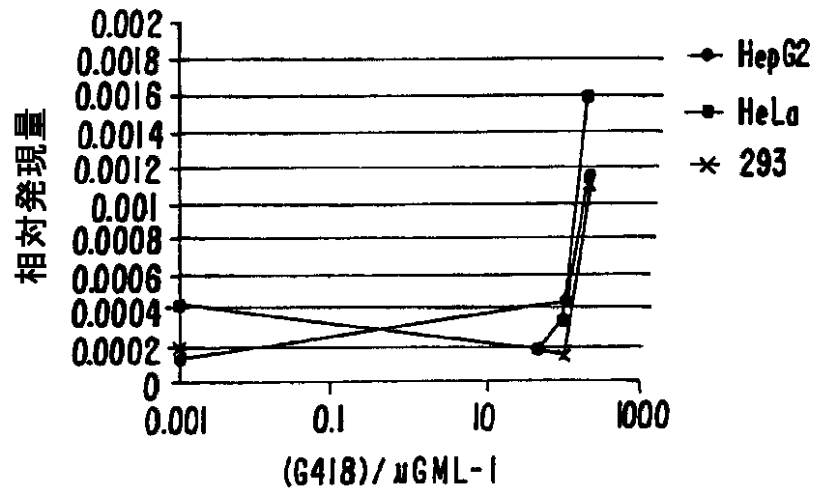
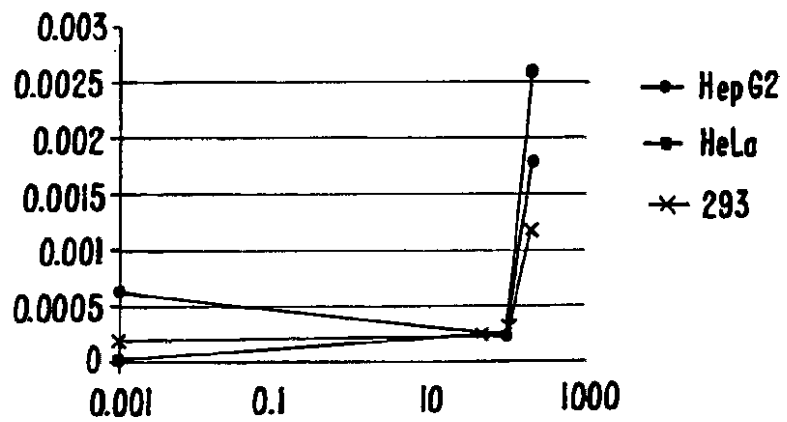


FIG. 2C.



【図3】

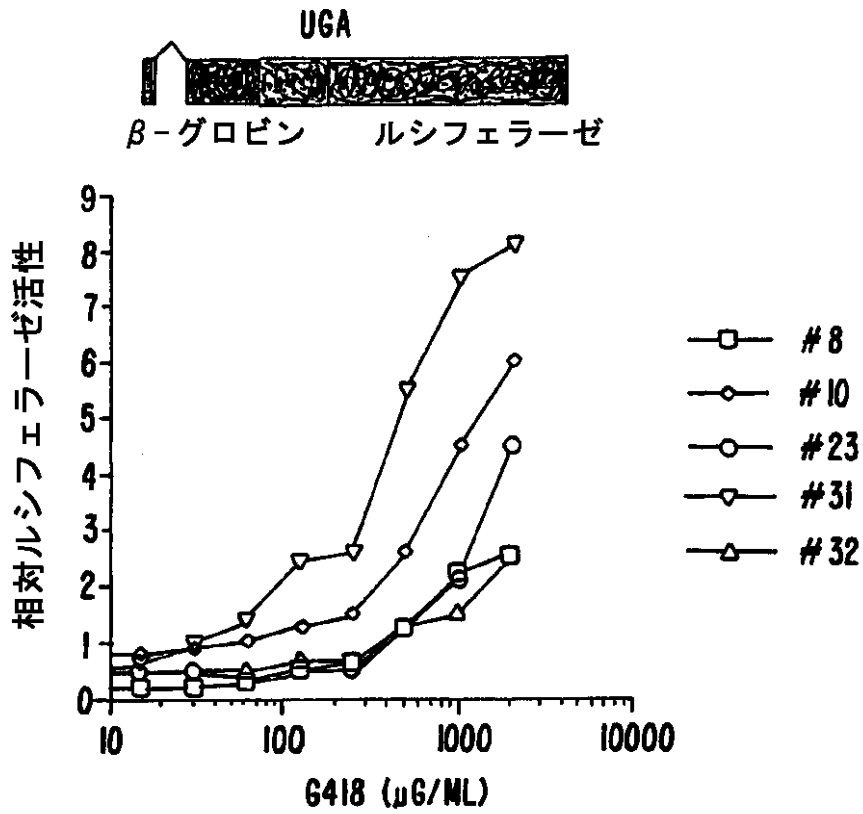


FIG. 3A.

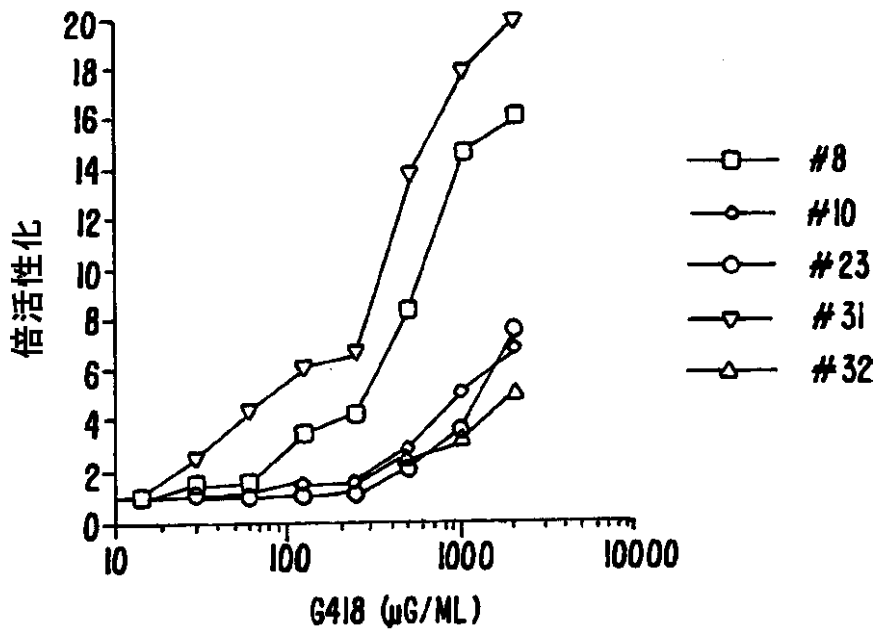


FIG. 3B.

【図4】

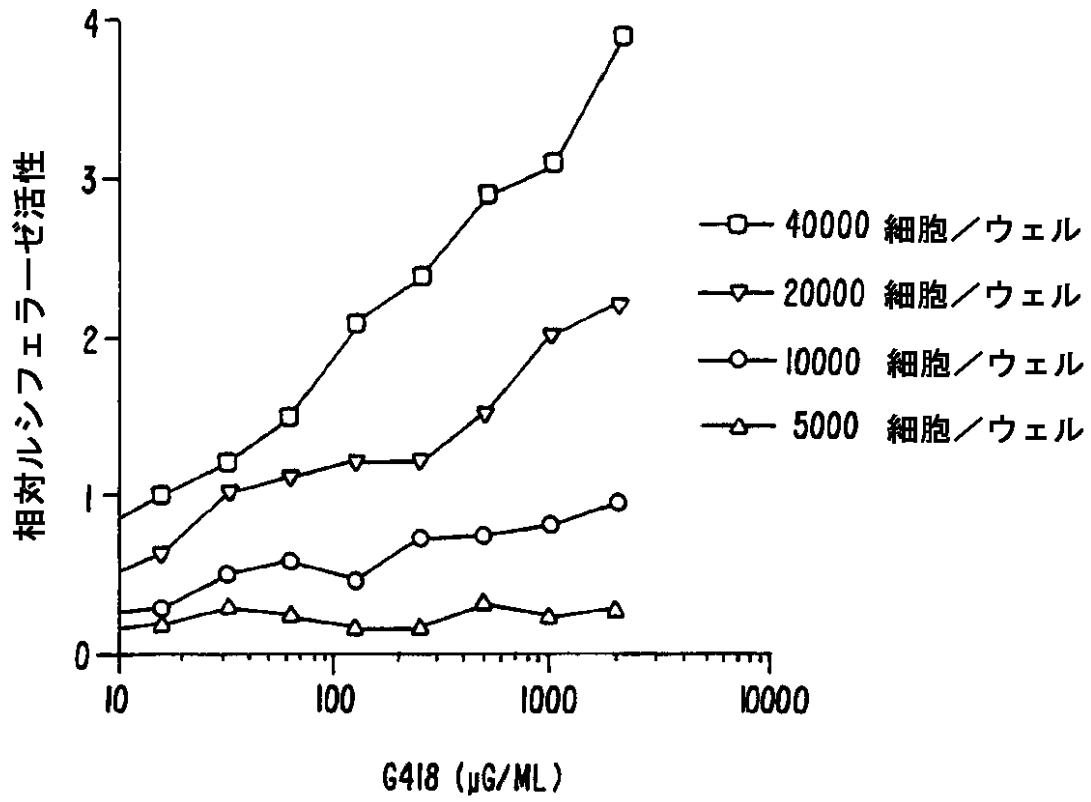


FIG. 4.

【図5】

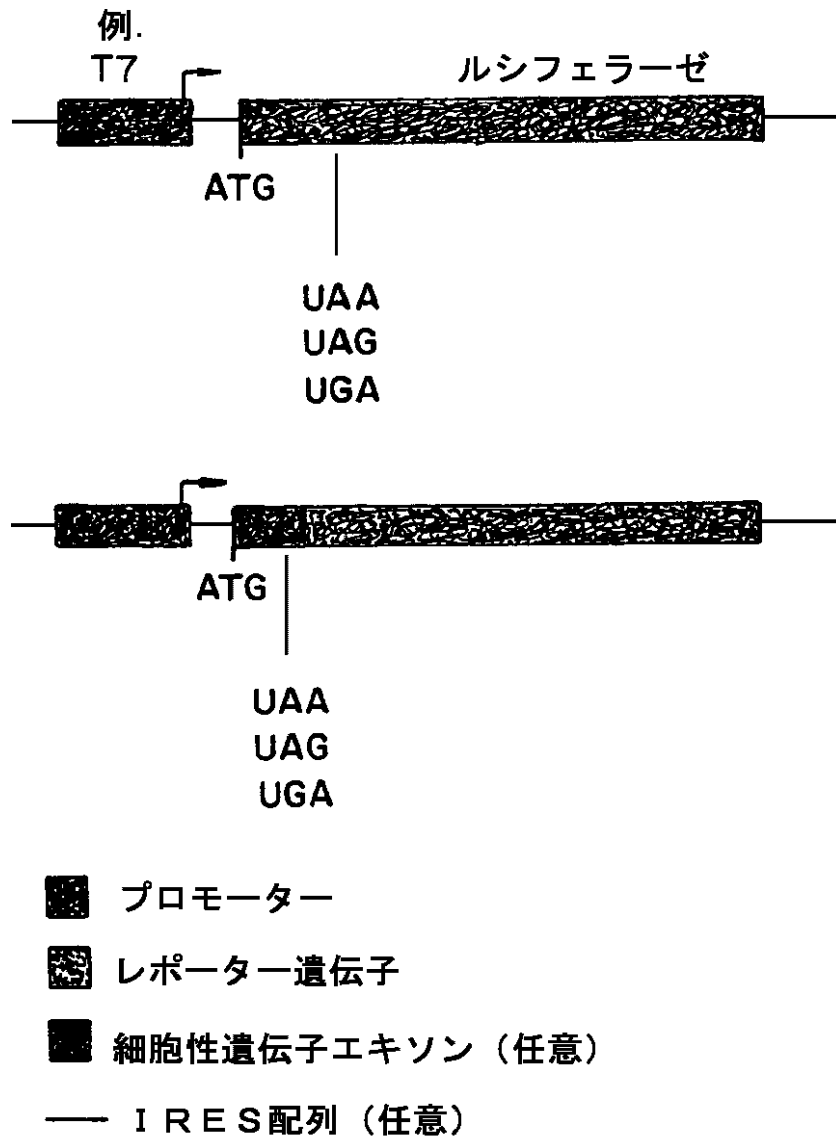


FIG. 5.

【図6】

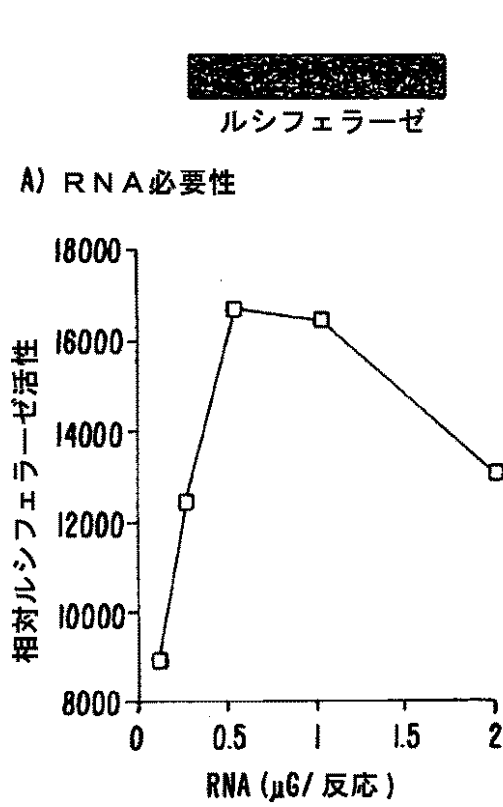


FIG. 6A.

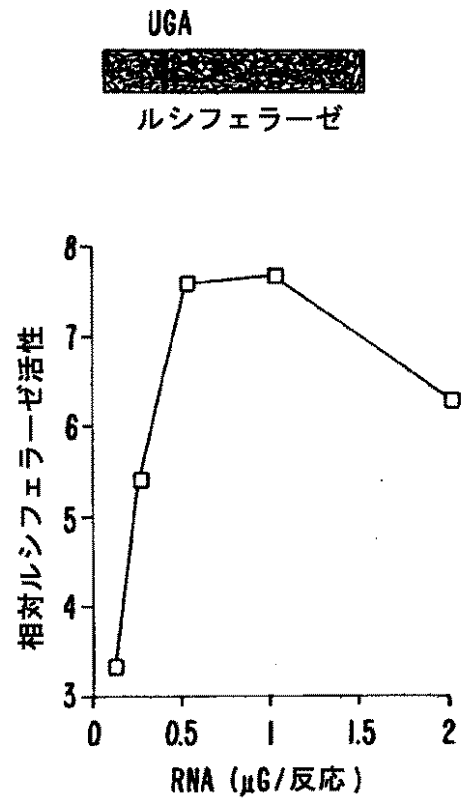


FIG. 6C.

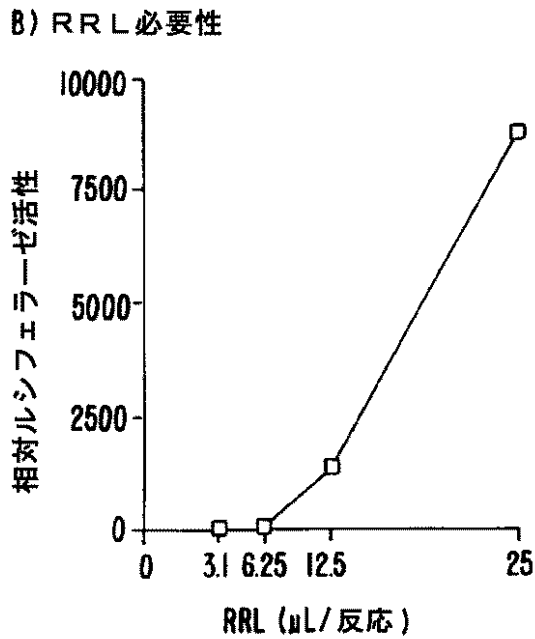


FIG. 6B.

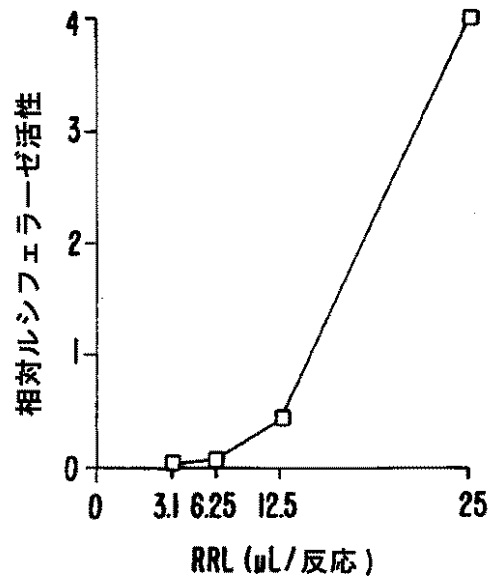


FIG. 6D.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/34232
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and (PC)		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 20797 A (UNIV MASSACHUSETTS) 29 April 1999 (1999-04-29) page 13, line 10-33 page 71, line 19 -page 73, line 30 example 14 claims 1,2,9 -/-	1-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '&' document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 15 March 2002		Date of mailing of the international search report 28/03/2002
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. S1 651 epo.nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bort, S

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/34232
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ANDREUTTI-ZAUGG CORINNE ET AL: "Inhibition of nonsense-mediated messenger RNA decay in clinical samples facilitates detection of human MSH2 mutations with an in vivo fusion protein assay and conventional techniques." CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 15, 1997, pages 3288-3293, XPO02192536 ISSN: 0008-5472 abstract Materials and Methods figures 1-3</p>	1-15
Y	<p>BATEMAN JOHN F ET AL: "Reliable and sensitive detection of premature termination mutations using a protein truncation test designed to overcome problems of nonsense-mediated mRNA instability." HUMAN MUTATION, vol. 13, no. 4, 1999, pages 311-317, XPO08001210 ISSN: 1059-7794 Materials and Methods abstract</p>	1-15
Y	<p>GARVIN ALEX M: "A complete protein truncation test for BRCA1 and BRCA2." EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 6, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 226-234, XPO08001207 ISSN: 1018-4813 Materials and Methods abstract</p>	1-15
Y	<p>DARLING THOMAS N ET AL: "Cycloheximide facilitates the identification of aberrant transcripts resulting from a novel splice-site mutation in COL17A1 in a patient with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 110, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 165-169, XPO08001208 ISSN: 0022-202X Materials and Methods abstract</p>	1-15

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/34232

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9920797 A	29-04-1999	AU 1114099 A	10-05-1999
		WO 9920797 A1	29-04-1999
		US 6071700 A	06-06-2000

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)	
G 0 1 N	33/50	G 0 1 N	33/53	D
	33/53		33/58	Z
	33/58	C 1 2 N	15/00	A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(71)出願人	ピーティシー・セラピューティックス・インコーポレイテッド PTC THERAPEUTICS, INC. アメリカ合衆国08855ニュージャージー州 ピスカタウェイ、ルーム713、リサーチ・ タワー、ホーズ・レイン675番、ロバート・ ウッド・ジョンソン・メディカル・スクール			
(72)発明者	ホルガー・ベックマン アメリカ合衆国94530カリフォルニア州エル・ セルト、ワイルドウッド42番			
(72)発明者	マーク・ラウンド アメリカ合衆国94018カリフォルニア州エル・ グラナダ、エル・グラナダ・ブルバード246番			
(72)発明者	スチュアート・ベルツ アメリカ合衆国08854ニュージャージー州 ピスカタウェイ、キャッスル・ポイント・ ブルバード67番			
(72)発明者	ケビン・チャプリンスキー アメリカ合衆国08873ニュージャージー州 サマーセット、ハリウッド・アベニュー 115番			

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB20 BB39 CA02
CB01 CB17 DA12 DA13 DA14
DA20 DA36 DA37 FB01 FB03
FB07 FB12 FB13 HA16 JA01
JA07
4B024 AA11 BA08 CA04 CA07 CA12
DA02 EA04 GA11 GA18 HA01
HA12 HA15
4B063 QA18 QQ08 QQ13 QQ22 QQ53
QR55 QR57 QR60 QR77 QR80
QR82 QS05 QS24 QS28 QS34

专利名称(译)	用于测定抑制早期翻译终止和无义介导的RNA衰变的化合物的方法		
公开(公告)号	JP2003516767A	公开(公告)日	2003-05-20
申请号	JP2001545593	申请日	2000-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	图拉列克股份有限公司 PTC医疗公司		
申请(专利权)人(译)	Teyurariku公司		
[标]发明人	ホルガー・ベックマン マーク・ラード スチュアート・ベルツ ケビン・チャプリンスキー		
发明人	ホルガー・ベックマン マーク・ラード スチュアート・ベルツ ケビン・チャプリンスキー		
IPC分类号	G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/66 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/5008 C12Q1/6897 G01N2333/70503 G01N2333/90 G01N2500/00		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/02 C12Q1/66 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/58.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB39 2G045/CA02 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/HA16 2G045/JA01 2G045/JA07 4B024/AA11 4B024/BA08 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ22 4B063/QQ53 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR60 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS34		
优先权	09/461508 1999-12-14 US		
其他公开文献	JP4683808B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本申请提供了用于分析抑制细胞中的早期翻译终止和无义介导的RNA衰变的化合物的方法。

