

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 208728

(P2001 - 208728A)

(43)公開日 平成13年8月3日(2001.8.3)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/62			G 0 1 N 27/62	V
C 1 2 N 15/09	ZNA		C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/68			G 0 1 N 33/483	Z
G 0 1 N 33/483			C 1 2 M 1/00	A
// C 1 2 M 1/00			C 1 2 N 9/10	

審査請求 有 請求項の数 26 O L ( 全 25数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 372877(P2000 - 372877)

(22)出願日 平成12年12月7日(2000.12.7)

(31)優先権主張番号 60/169552

(32)優先日 平成11年12月8日(1999.12.8)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/521106

(32)優先日 平成12年3月7日(2000.3.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 500412873

アゴーロン・ファーマシューティカルズ・  
インコーポレイテッド

アメリカ合衆国92037カリフォルニア州ラ・  
ホラ、ノース・トーレイ・パインズ・ロー  
ド10350番

(72)発明者 マイケル・ジェームズ・グレイグ

アメリカ合衆国92009カリフォルニア州カー  
ルスバッド、マーティンゲイル・コート15  
70番

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エレクトロスプレーイオン化質量分析法を用いる化合物の高処理量スクリーニング

(57)【要約】

【課題】 本発明は概して高処理量スクリーニングアッセイの精度および特異性を向上させるアッセイならびに関連の方法に関し、詳しくは生物学的標的が関与する方法に関する。

【解決手段】 1またはそれ以上の試験化合物と、平衡状態にある二本鎖ポリヌクレオチドとその関連の相補的一本鎖とを含む成分の基質混合物との間の結合を測定する方法であって、(a)少なくとも1種の試験化合物と1種の基質混合物を含む溶液を準備する工程、(b)該溶液をエレクトロスプレーイオン化によりイオンのガススプレーに変換する工程、(c)該スプレー内のイオンを質量分析計に移す工程、(d)基質混合物成分と該試験化合物の間で形成された非共有結合複合体をモニターする工程、および(e)工程(d)の結果を評価して、該基質混合物成分との特異的非共有結合的相互作用を有する試験化合物を同定する工程を含む方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 1またはそれ以上の試験化合物と、平衡状態にある二本鎖ポリヌクレオチドとその関連の相補的一本鎖とを含む成分の基質混合物との間の結合を測定する方法であって、(a)少なくとも1種の試験化合物と1種の基質混合物を含む溶液を準備する工程、(b)該溶液をエレクトロスプレーイオン化によりイオンのガスプレーに変換する工程、(c)該スプレー内のイオンを質量分析計に移す工程、(d)基質混合物成分と該試験化合物の間で形成された非共有結合複合体をモニター 10する工程、および(e)工程(d)の結果を評価して、該基質混合物成分との特異的非共有結合的相互作用を有する試験化合物を同定する工程を含む方法。

【請求項2】 試験化合物の一次スクリーンにおいて、工程(e)における評価を用いて真の陽性シグナルと偽陽性シグナルとを識別する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 工程(e)における評価を用いて推定発癌物質を同定する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 該一次スクリーンがポリヌクレオチドと会合する生物学的標的を含み、かつ、該試験化合物が該 20標的に対する生物学的活性に関してスクリーニングされる、請求項2に記載の方法。

【請求項5】 該生物学的活性が該標的と関連する生物学的プロセスの障害を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 該生物学的プロセスが触媒反応である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 該触媒反応が酵素反応である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 該酵素反応の酵素がキナーゼ、トランスフェラーゼ、ヘリカーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソ 30ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、ホスホターゼおよびポリメラーゼからなる群より選択される、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 該酵素がウイルス酵素である、請求項7に記載の方法。

【請求項10】 該酵素がウイルス酵素である、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 該ウイルス酵素がヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス、呼吸シンチアルウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウ 40イルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、带状疱疹ウイルス、ノーウォークウイルス、エボラウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ハンタウイルス、リノウイルスおよびインフルエンザウイルスからなる群より選択されるウイルスによって産生されるものである、請求項9に記載の方法。

【請求項12】 該ウイルス酵素が該酵素を産生するウイルスの生活環において重要なステップに関与している、請求項9に記載の方法。

【請求項13】 該ウイルス酵素が該酵素を産生するウ\* 50

\*イルスの生活環における重要なステップに関与している、請求項11に記載の方法。

【請求項14】 該重要ステップがウイルスDNA、RNAまたはウイルスゲノムの複製である、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 該重要ステップがウイルスゲノムの宿主ゲノムへの組み込みである、請求項13に記載の方法。

【請求項16】 該ウイルス酵素を産生するウイルスが宿主の病状の原因として関与している、請求項9に記載の方法。

【請求項17】 該病状が疾病に関与している、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 該宿主が動物である、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 該宿主がヒトである、請求項16に記載の方法。

【請求項20】 該ウイルス酵素がHCVヘリカーゼ、HCVポリメラーゼ、HIVインテグラーゼおよびHIVプロテアーゼからなる群より選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項21】 該質量分析計が四重極質量分析計、四重極イオントラップ、およびイオンサイクロトロン共鳴からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項22】 該ポリヌクレオチド基質が二本鎖および一本鎖DNAオリゴヌクレオチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項23】 該ポリヌクレオチド基質が二本鎖および一本鎖RNAオリゴヌクレオチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項24】 該発癌物質がポリヌクレオチド相互作用剤である、請求項3に記載の方法。

【請求項25】 該ポリヌクレオチド相互作用剤がDNAまたはRNA相互作用剤である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 該DNA相互作用剤が二重らせんDNAまたはRNAインターカレーターおよびグруппバイ 50ンダーからなる群より選択される、請求項26に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】本願は、1999年12月8日出願の同時係属米国仮出願出願番号第60/1169,552号の優先権を主張するものであり、その内容は出典明示により本明細書の一部とする。

## 【0002】

【発明の属する技術分野】本発明は概して高処理量スクリーニングアッセイの精度および特異性を向上させるアッセイならびに関連の方法に関し、詳しくは生物学的標的が関与する方法に関する。本アッセイはエレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)を使用して

小分子とポリヌクレオチドとの相互作用を調べ、小分子：ヌクレオチド複合体の形成をモニターすることを含む。該アッセイおよび方法は、推定発癌物質を同定したり、または試験化合物の製薬上の一次スクリーンにおいて真の陽性シグナル（有効な機構的インタカレーター）と偽陽性シグナルとを識別するのに使用され得る。

【0003】

【従来の技術】阻害試薬を形成する組み合わせを用いて広範な小有機分子が合成される結合化学技術を用い、科学者は薬剤様の特徴を有する、膨大な数の極めて複雑な化合物を作出できる。その上、ヒトゲノムプロジェクトおよび生物情報科学関連分野により多くの治療標的の発見が加速化され、迅速な遺伝子機能の同定が可能となった。製薬会社やバイオテクノロジー会社は、個々の基礎に基づきこれらの新たに発見された治療薬および治療標的を詳細に調べる手段を探す際に、一度に多数の化合物の生物学的活性をアッセイするショットガンのアプローチに取り組みはじめた。高処理量スクリーニング（HTS）では、数千の化合物を体系的かつ自動的に試験アッセイに対してスクリーニングすることが可能である。高処理量技術は、それぞれHCMVおよびHCVに対するものなどのウイルス阻害剤の同定に用いられてきた[Bedard, PJ et al., *Antiviral Res*, 41(1):35-43 (Feb, 1999); Martell, M et al., *J Clin Microbiol.*, 37(2):327-32 (Feb, 1999)]。さらに高処理量ハイブリダイゼーションはウイルス力価の測定にも使用されている[Atkinson, EM et al., *Nucleic Acids Res.*, 26(11):2821-3 (Jun 1, 1998)]。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】HTSの主たる目標は、「リード」化合物、すなわち所望の様式で特定の生物学的標的に特異的作用を及ぼす化合物を同定することである。生物学的に注目される分子についての大きな化合物ライブラリーをアッセイする典型的な高処理量一次スクリーンは数千の「ヒット」を確認するものである。これらのヒットは生物学的活性を示唆するような方式の試験アッセイと反応する化合物である。HTSは種々の物質を多数試験するという利点を与えるが、一方、真のヒット、すなわち、アッセイとの相互作用が構造特異的である有効な機構的作用阻害剤（または活性化剤）を偽陽性、すなわち、アッセイ成分または環境との非特異的相互作用を有する一次ヒットから識別することができないという問題がしばしばある。さらなる二次アッセイではしばしば、生物学的妥当性を欠くそれらの化合物を濾去し、一次ヒットをリード候補とする必要がある。例えば、科学者はあるウイルス酵素または触媒経路の阻害剤を同定するのにウイルススクリーンを用いる。これらウイルスアッセイでは、化合物の阻害力はしばしば反応槽における二本鎖DNAと一本鎖DNAの比率の変化によって測定される。試験化合物がDNAの巻戻しを妨げる

か、あるいは一次アッセイの成分および条件と相互作用するならば、人工産物が生じ得る。例えば、化合物が標的酵素の代わりにDNAを相互作用すれば、陽性シグナルが生じ得る。次ぎに引き続いてのスクリーンでは、真の作用機構を有する化合物を決定する必要がある。オリゴヌクレオチド小化合物との相互作用を調べるのに使用されている現行の方法としては、NMR、円偏光二色性、ゲルシフトアッセイ、表面プラズモン共鳴、ATPアーゼアッセイなどが挙げられる。質量分析法に基づいたアッセイに比べ、これらの方法はより多くのサンプルを要し、解析時間が長く、データの解釈が困難である。本明細書において「二次スクリーン」と呼ばれるこれらのアッセイはコストが高くつき時間もかかるだけでなく、正しい酵素阻害機構を考慮した明確な結果および詳細が得られないことがしばしばある。

【0005】一次および二次スクリーン双方に関する結果の特異性の欠如は、特にHTSの目標が迅速かつ能率的様式で、所望の生物学的活性を有する可能性ある薬剤分子を同定することにある。このように当技術分野では、薬剤開発のためのリード化合物を同定するために化合物ライブラリーを選別する、要求レベルの特異性と精度を有する迅速で信頼性のある分析技術の必要性が存在し続けている。さらに当技術分野では、「ヒット」のプールの特異な化合物が実際に「リード化合物」、すなわち標的に対して特異的な生物学的活性を有する物質であるということを確認する機構の必要性がある。

【0006】本明細書では、人工産物を形成するポリヌクレオチド結合試験化合物を同定する簡便かつ迅速な方法が記載されるが、この方法はインターカレーターおよびその他の発現物質の同定に特に有用である。かかる化合物は癌関連以外の疾患の有用な治療薬とはいえないので、元の化合物ライブラリーならびに以降のいずれのライブラリーからも除外してよい。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、試験化合物と基質混合物との間の結合を測定するアッセイまたは方法に関し、該混合成分は平衡状態にある二本鎖ポリヌクレオチドとその関連の相補的一本鎖とを含む。1つの一般的な実施態様では、本発明は（a）少なくとも1種の試験化合物と少なくとも1種の基質混合物を含む溶液を準備する工程、（b）該溶液をエレクトロスプレーイオン化によりイオンのガススプレーに変換する工程、（c）該スプレー内のイオンを質量分析計に移す工程、（d）基質混合物成分と該試験化合物の間で形成された非共有結合複合体をモニターする工程、および（e）工程（d）の結果を評価して、該基質混合物成分との特異的非共有結合的相互作用を有する試験化合物を同定する工程を含む。

【0008】1つの好ましい実施態様では、本発明は、一次高処理量スクリーニングから得られた最初のヒット

のプールをスクリーニングして偽陽性シグナルと真の機構的インターカレーターとを迅速に識別することを含む。本発明はエレクトロスプレーイオン化技術を用いて少なくとも1種の試験化合物（該試験化合物は可能性ある治療上の有用性を持つ最初の、または一次ヒットである）と、平衡状態で存在する二本鎖および一本鎖ポリヌクレオチド基質を含有する溶液を噴霧すること、ならびに質量分析法を用いて非共有結合性ポリヌクレオチド：試験化合物複合体の形成をモニターし、該物質が基質と相互作用かどうかを決定することを含む。この方法では、

【0009】もう1つの好ましい実施態様では、該高処理量スクリーニングはポリヌクレオチドと会合する生物学的標的を含む。試験化合物は標的に対するその生物学的活性、すなわち標的の阻害または活性化、およびそれに関連する生物学的プロセスに関してスクリーニングされる。この生物学的プロセスは好ましくは触媒反応、より好ましくは酵素反応である。その他の実施態様は、小分子と、メッセンジャーRNA鎖またはオペロン、プロモーターなどの二重らせんDNAの調節領域との会合の直接的観察を含む。

【0010】本発明のもう1つの目的は、分子ライブラリーまたはそのサブセットにおけるポリヌクレオチド相互作用化合物を発見するための初期段階毒性スクリーニングにある。発癌性を有するかかる相互作用化合物の会合という点で、それらは一般に可能性ある医薬リード化合物を含有する高処理量ライブラリーから除去されるべき反リード化合物であると考えられる。

【0011】本発明のもう1つの目的は、高処理量分子ライブラリーまたはそのサブセットにおけるインターカレーターおよびグループバインダーなどの可能性ある発癌物質および細胞傷害性物質の迅速な同定のためのアッセイおよび方法を提供することにある。好ましい実施態様では、そのサブセットは一次アッセイを用いてライブラリー内で同定された最初のヒットのプールを含む。エレクトロスプレーイオン化技術を用いて少なくとも1種の試験化合物と二本鎖および一本鎖ポリヌクレオチド基質とを含む溶液を噴霧し、質量分析法を用いて非共有結合性ポリヌクレオチド：試験化合物複合体の形成をモニターする。二本鎖または一本鎖ポリヌクレオチドと選択的かつ非共有結合的に複合化する化合物を「ポリヌクレオチド相互作用物質」と呼ぶ。以下に論じるが、かかる様式でヌクレオチドと相互作用する物質は強力な発癌性または細胞障害性を示す傾向にあることから、治療薬としての可能性が制限される。次に、同定されたポリヌクレオチド相互作用物質は最初のヒットプールから除外されてよいし、あるいは特定の高処理量ライブラリーから除外されてよい。さらに、癌以外の治療薬のスクリー

ニングの際にその他の分子ライブラリーからこれらの物質を除外することが望まれる場合には、ESI-MSは薬剤開発プロセスにおける初期段階毒性試験として機能し得る。

【0012】本明細書で開示されるESI-MSに基づく方法を用い、偽陽性が容易に同定して最初のヒットのプールから除外することができ、それによりさらなる評価および試験を要する全体的なヒットの数を減らすことができる。このように、ESI-MSは生物学的にまた治療上有意な試験化合物に迅速に焦点を当てることを可能とし、後に有効性がない、非効果的である、または細胞傷害性があるとわかる化合物に対する研究の継続に伴う遅延や費用がなくなる。

【0013】

【発明の実施の形態】エレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)を用いるアッセイは小分子とポリヌクレオチド基質間の相互作用を決定するために開発されたものである。この溶液に基づくアッセイを用い、5分内の読出し時間で、個々または複数の化合物の存在下、二本鎖および二本鎖ポリヌクレオチドを同時にスクリーニングすることができる。

【0014】本明細書において「高処理量スクリーニング」すなわち「HTS」とは、自動化された様式で、既知のもの(すなわち標的)を未知のもの(すなわち試験化合物)の群(すなわちライブラリー)に曝すことを含むアッセイを指し、そこでは標的と関連した反応の進行をアッセイし、その結果を特定の試験化合物の生物学的活性のレベルと相関させる。この標的関連反応はしばしばリガンドと受容体、または抗体と抗原などの結合を含む。本発明に関しては、結合とは、複合体の形成(酵素：基質、酵素：阻害剤、または阻害剤：基質など)およびハイブリダイゼーション(2つの相補的ポリヌクレオチド鎖など)の双方を含む。生物学的活性は、(限定されるものではないが)切断および複製をはじめとするその他の反応により測定され得る。

【0015】好ましい一次HTSアッセイは、試験化合物の阻害%が二重らせんポリヌクレオチドの巻戻しの量に基づく、ウイルススクリーンである。相補的ヌクレオチド鎖のハイブリダイゼーションの程度は二本鎖ポリヌクレオチドと一本鎖ポリヌクレオチドの算出比として測定される。

【0016】「標的」は事実上、基質と反応して生成物を形成する、または観察可能な応答を生じるか、あるいは基質の生成物への変換を触媒するいずれも分子であってもよい。例えば、標的は酵素、タンパク質、ポリペプチドなどであってよい。酵素の例としては、(限定されるものではないが)キナーゼ、インテグラーゼ、トランスフェラーゼ、ヘリカーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、プロテアーゼ、ホスホターゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼが挙げられる。好ましい

実施態様では、生物学的プロセスとはウイルス関連のプロセスであり、より好ましくはウイルス酵素反応である。特に好ましい実施態様では、標的はウイルス酵素である。ウイルス酵素は、ウイルスDNA、RNAもしくはウイルスゲノムの複製、または宿主へのウイルスゲノムの組み込みといったウイルスの生活環に重要なステップと関連するものであることが好ましい。本発明によって意図されるウイルス酵素の例としては、(限定されるものではないが) HCVヘリカーゼ、HCVポリメラーゼ、HIVインテグラーゼ、HIVプロテアーゼなどが挙げられる。

【0017】ウイルス酵素を産生するウイルスは宿主内で病状または疾病の原因とならないものであるのが好ましい。特定のウイルスが重要であるのではなく、ヒト、植物または動物の病因に関連したいずれのものであってもよい。ウイルスはレトロウイルス、アデノウイルス、ロタウイルス、エンテロウイルスなどであってよい。本発明によって意図されるウイルスの例としては、(限定されるものではないが) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒトパピローマウイルス(HPV)、呼吸シんシチアルウイルス(RSV)、A型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、サイトメガロウイルス(CMV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、帯状疱疹ウイルス(HZV)、ノーウォークウイルス、エボラウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、リノウイルスなどが挙げられる。

【0018】本明細書において「試験」および「試験化合物」とは、生物学的活性が知られていない有機化合物を指す。試験化合物はオリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ポリヌクレオチド(例えば、RNA、二本鎖または一本鎖DNA)、小分子、またはそれらの混合物であってよい。試験化合物は天然のもので、合成のものであってもよい。試験化合物は有機組織(例えば、毛、皮膚、腎、肝組織、膵組織、胸腺組織、脳組織)または体液もしくは器官組織の分泌物(例えば、血液、尿、唾液、精液、汗または乳汁)などの天然生成物の成分であってよい。試験化合物はさらに、(限定されるものではないが)培地、細胞抽出液または培養上清をはじめとする細胞培養物(例えば、細菌、真菌、酵母)の成分であってよい。試験化合物は組み合わせ法によって作出された分子または分子の混合物であってよい。

【0019】試験化合物は生物学的標的と関連した生物学的プロセスの阻害または活性化に有用な、可能性ある治療薬であることが好ましい。1つの好ましい実施態様では、該プロセスは触媒反応であり、生物学的標的は酵素である。

【0020】本明細書において「ライブラリー」とは、いくつかの混合物に分けられた、または個々の単一成分

画分に分離された単一の混合物中にも組み入れられる種々の試験化合物群を指す。該ライブラリーは溶媒、バッファーもしくはその他の担体に溶解または懸濁させてもよいし、あるいはそのままの状態でも存在していてもよい。

【0021】「基質」とは、標的により認識される特定のポリヌクレオチド配列、すなわち、その標的分子と通常反応する、またはその標的分子によって触媒されるポリヌクレオチド配列を指す。該基質は、(限定されるものではないが)リボゾーム、センス、鋳型またはアンチセンスRNA、ゲノムまたはコピーDNAをはじめとする二本鎖または一本鎖ポリヌクレオチドを含み得る。好ましい実施態様では、基質は二本鎖または一本鎖DNAを含む。もう1つの実施態様では、基質はメッセンジャーRNAを含む。

【0022】「生物学的スクリーン」とは、生物学的プロセスの操作を含むアッセイを指す。好ましい実施態様では、生物学的スクリーンを用いて生物学的プロセスの候補阻害剤(または活性化剤)を同定するが、この阻害剤はその生物学的プロセスに関連した病状の予防または治療のための薬剤分子を発見するためのリード化合物として役に立つ。好ましい実施態様では、該プロセスは生物学的酵素に関連した触媒反応である。

【0023】「一次スクリーン」とは、標的化合物に関連した生物学的活性の予備アッセイを指す。好ましい実施態様では、該アッセイはあるアッセイ(本明細書では「一次アッセイ」と呼ぶ)における反応性に関して大きな試験化合物ライブラリーを迅速にスリーニングすることを含む。一次アッセイはライブラリーから、特異的な相互作用性および標的に対する作用を有する化合物を同定することを意味する。しかしながら、一次アッセイではしばしば多数の偽陽性シグナルが生じる。この偽陽性シグナルは標的との特異的相互作用ではなくアッセイとの非特異的相互作用から生じるものである。一次アッセイにおける陽性シグナル(真の陽性と偽陽性の双方)を生じる化合物のプールは、本明細書では「一次ヒット」と呼ぶ。

【0024】「二次スクリーン」とは、一次スクリーンにおける「ヒット」によって生じた陽性シグナルが本当に一次アッセイにおいて試験化合物と標的との特異的反応性に関連したものであるかどうかを確認するのに用いるアッセイを指す。二次スクリーンに用いるアッセイを本明細書で「二次アッセイ」または「確認アッセイ」と呼ぶ。二次アッセイの結果、一次ヒットは、本明細書で「偽陽性」と呼ばれる第1のプールと本明細書で「真の陽性」と呼ばれる第2のプールとの2群に分かれる。好ましい実施態様では、二次スクリーンでアッセイされる相互作用は試験化合物：二重らせんDNA(試験化合物：一本鎖DNAでない)の選択的複合体形成であり、同定される可能性ある発癌物質はインターカレーターである。

【0025】「ウイルススクリーン」とは、ウイルス関連プロセスの操作アッセイを指す。好ましい実施態様では、該ウイルススクリーンを用いてそのプロセスの候補阻害剤（または活性化剤）を同定する。なお、阻害剤はウイルスに関連した病状を予防または治療する薬剤分子の発見のためのリード化合物として機能する。より好ましい実施態様では、該プロセスはウイルス酵素に関連した触媒反応である。あるいは、ウイルススクリーンはウイルス力価の測定に用いられる高処理量ハイブリダイゼーションアッセイであってもよい。

【0026】「エレクトロスプレーイオン化質量分析法」および「ESI-MS」とは、溶液から直接多重荷電高分子イオンが形成される方法を指す[Greig et al., J. Am. Chem. Soc., 117: 10765 (1995); Loo, Bioconjugate Chem., 6:644-665 (1995)]。この技術は小分子：ポリヌクレオチド相互作用の分析のための迅速かつ直接的な方法を提供する。ESI-MSは溶液中で形成された小分子：ポリヌクレオチド複合体の直接観察ならびに相互作用の化学量論を考慮するものである。

【0027】タンパク質および核酸の気相イオンへの変換のためのエレクトロスプレーイオン化技術(ESI)の開発は生物学における質量分析法を活気づかせた。適切な条件下で、エレクトロスプレーイオン化を用いて発生させた気相イオンは、NMR分析法などの溶液技術による研究には大きすぎる分子の構造および特性を検出および同定することが可能となる脱溶媒和工程の間それらの溶液構造を保持することができる。エレクトロスプレー工程の穏やかな脱溶媒和条件は非共有結合複合体を保護するものである[Griffey et al., NATO ASI Ser, C 510:117-133 (1998)]。ESI-MSでは溶液の状態のスナップ写真が得られ、これが溶液状態を直接観察できない、酵素経路に沿った複数の中間体または複合体の形成のレベルの観察の助けとなる。遊離種および結合種のレベルはESI-MSイオン包絡線内におけるそれらの相対的存在量から直接定量できる。多重荷電イオンからの分子質量の正確な測定により、反応の化学量論および基質の特性に関する明確な情報が得られる。

【0028】「ポリヌクレオチド相互作用剤」とは、核酸と特異的に反応または結合するいずれの化合物をも指す。「ポリヌクレオチド」には、(限定されるものではないが)リボゾーム、センス、鋳型またはアンチセンスRNA、およびゲノムまたはコピーDNAをはじめとする種々の二本鎖または一本鎖核酸物質が含まれる。好ましくは、ポリヌクレオチドはデオキシリボ核酸である。インターカレーター、主要および副次的グループ結合リガンド、ならびにキレート化剤はポリヌクレオチド相互作用剤の例である。ポリヌクレオチド相互作用は発癌性と密接に関連している。それらの発癌能という点で、ポリヌクレオチドインターカレーターは癌以外の大部分の薬剤発見プロジェクトの反リード化合物であると

みなされる。

【0029】「インターカレーター」とは、電子供与体として働き、格子面の間に散在または分散した「外来の」電子受容原子を有する結晶格子を持つ化合物である。言い換えれば、インターカレーターとは、ポリヌクレオチドのスタックされた塩基対の間にそれ自体を挿入し得る小分子である。かかるインターカレーションの結果として突然変異誘発が起こり、その結果がしばしば腫瘍状態につながる下流エラー(転写、複製などにおける)となる。インターカレーターは著しい発癌物質であると考えられる。公知のインターカレーターの例としては、臭化エチジウム、プロフラビンおよびメチルグリーンが挙げられる(すべてSigma, St. Louis, MOから入手できる)。

【0030】「グループバインダー」とはポリヌクレオチドインターカレーターのサブセットである。グループバインダーは、二重らせんDNAなどの二本鎖核酸のヘリックスによって形成された溝に疎水結合し得る化学物質である[DNAインターカレーターおよびグループバインダーについての詳細な考察はGeorge et al., J of Biol. Chem, 267(15): 10683-10689 (May 25, 1992) for detailed discussion of DNA intercalators and groove bindersを参照]。公知のグループバインダーの例としては、ジスタマイシンおよびビス-ベンズアミド(H33258)(Sigma, St. Louis, MOから入手できる)が挙げられる。

【0031】高処理量スクリーン(HTS)は一般に、試験化合物(X)と標的(T)を含む。HTSは試験アッセイにおいて試験化合物のライブラリーをスクリーニングして、標的または標的反応と相互作用する化合物を同定することを含む。この試験アッセイは一般に、リガンドと受容体、または抗体と抗原といった直接的結合を含む。かかる結合は直接測定するのが困難であることが多い。これらの場合、結合の間接的指標として直接的な手段によって容易に測定されるマーカーまたはレポーター(M)が必要とされる。例えば、試験アッセイがELISAまたはRIAなどの免疫結合アッセイである場合、レポーターは試験化合物および標的の結合時に活性化される蛍光または放射性化合物であってもよいし、あるいは反応環境からの遊離の試験化合物または標的の消失であってもよい。

【0032】その他の場合には、試験アッセイは、基質に対して標的酵素が作用して対応する生成物を生じるような触媒反応を含んでもよい。試験化合物は反応進行を妨げるまたは阻害する能力に関してスクリーニングする。相互作用はまた結合を含んでもよいが、その結合は試験化合物と標的との直接的な結合でないことが多い。酵素反応はしばしば一連の中間体を含む。試験化合物は触媒経路に沿ったいずれの反応を阻害して特定の標的酵素の阻害剤として働くものであってもよい。単に標的と

基質、または試験化合物と標識の直接的結合を示すだけのレポーターまたはマーカーでは反応の進行または阻害の指標としては十分でない。従って、反応の進行は別の手段で測定しなければならない。ある場合には、生成物の形成（またはその欠如）を直接測定することができる。しかしながら、結合のような生成物の生成は直接測定することが困難な場合が多い。それゆえ科学者はしばしば反応槽内の二本鎖DNAと一本鎖DNAの比率の変化の関数として化合物の阻害能を測定する。生物学的またはウイルスアッセイは結合に基づくものでなく反応に

10 基づく高処理量スクリーニングの例である。  
【0033】結合に基づくスクリーニングおよび反応に基づくスクリーニングは両者では、陽性の結果の有効性を確認することが望ましい場合が多い。ヒットが本当に所望の反応の発生に関連したものであって、副次的または競合的反応によるものではないことを確認しなければならない。例えば、単に媒質中の遊離試験化合物Xが存在しないことにより測定される試験化合物の結合試験を行う場合では、その試験化合物が本当に標的と反応したものであるか確認することはできない。マーカー、レポ

20 ーター、基質またはその他の反応成分と反応する試験化合物も同様に陽性の結果をもたらし得る。このことはアッセイがウイルススクリーンである場合に特に問題となる。  
【0034】ウイルススクリーンの成分としては、標的(T)、試験化合物(X)、およびDNAまたはRNAポリヌクレオチドである1以上の基質(S)が含まれる。好ましい実施態様では、標的は酵素であり、試験化合物は酵素の可能性ある阻害剤または活性化剤である。本発明ウイルススクリーンにおける基質はポリヌクレオ

30 チド、より好ましくは小さいポリヌクレオチドである。好ましいウイルススクリーンでは、試験アッセイは酵素と特異的ポリヌクレオチド配列または構造との反応を含む。ポリヌクレオチドは二本鎖DNAであってよく、反応は切断、巻戻し、複製などである。かかる場合、標的酵素とポリヌクレオチド基質との反応性はしばしば反応槽の二本鎖DNAと一本鎖DNAの比率と関連している。まず、標的と基質だけを含む対照反応を行い、相対測定値の標準を設定する。次に、個々の反応槽に試験化合物を（または試験化合物のライブラリー）を導入し、

40 二本鎖(「ds」)DNAと一本鎖(「ss」)DNAの比率を測定する。次いでこの比率(ds:ss)の変化を試験化合物の生物学的活性、すなわち標的の阻害または活性化のいずれかと関連させる。しかしながら、この比率の変化は阻害以外の人為的なものによるものであってもよい。例えば、該試験化合物は基質に結合していてもよいし、あるいはヌクレオチド配列内にインターカレートされていてもよい。あるいは、試験化合物は標的と同じ活性を有していてもよい(例えば、自体dsDNAを切断してもよく、このことは標的酵素の活性化剤で

50

あると考えられる。)

【0035】生物学的スクリーンは一般に、標的の阻害（または活性化）に関して試験化合物核酸のプールを迅速に評価することを含む。好ましい実施態様では、標的はDNAの複製に關与する生物学的酵素である。この場合、反応槽には少なくとも1種の試験化合物、少なくとも1種の標的、および標的に対応する適当な基質（一般には二重らせんDNA）が含まれる。さらに、標的の活性が容易に測定できるように二重らせんDNAの対応する一本鎖が含まれ、活性はDNA二重らせんの巻戻しの程度に直接比例する。この巻戻しの測定値は反応時間の経過に伴う反応槽における二本鎖DNAと一本鎖DNAの比率の変化により算出される。標的が標的が正常に機能すれば、より多くのDNAが巻戻され、反応槽により多くの一本鎖が生じ、二本鎖に対する一本鎖DNAの比率が増加する。標的が正常に機能できなければ、二本鎖DNAは二重らせん型のままとなり、この比率は一定のままか、低下しさえする。これまでに論じられたように、実際に試験化合物二重らせんDNAと優先的に相互作用または結合する場合には、一定の比率が認められ、試験化合物が標的の生物学的活性を阻害しており、標的がその基質と触媒反応するのを妨げていると仮定される。

【0036】生物学的スクリーンの例はGeorge et al. [J. Biol. Chem., 267, 上記]により記載されている。これは大腸菌DNAヘリカーゼIIに關連した巻戻しおよびATPアーゼ活性における種々のDNA結合リガンドの作用を論じたものである。このヘリカーゼIIの巻戻しおよびDNA依存性のATPアーゼ活性は二本鎖および一本鎖DNA基質のスペクトルを用いて測定された。用いられる基質の例としては、一部が二重らせんDNAである71塩基対(bp)のM13mp7基質、245bpの平滑末端化された全て二重らせんの基質、および一本鎖ポリ(dT)が挙げられる。George et al.はミトキサントロンの二本鎖DNAへのインターカレーションが、ヘリカーゼIIを阻害する複合体を形成し、その結果、ATP加水分解と巻戻し活性の双方が阻害されることを見出した。George et al.のアッセイはDNAヘリカーゼを含んだが、基本的な実験方法およびアッセイのプロトコールは他の生物学的酵素に関するもの同じである。上記のように、George et al.により記載された生物学的スクリーンは真のヒットと偽陽性とを識別できない非特異的結果が得られる。

【0037】エレクトロスプレーイオン化は強い静電界で液体を噴霧することにより高い電荷を持つ液滴を作る。ESIは、空気補助式エレクトロスプレー、マイクロおよびナノスプレー、加熱キャピラリー熱源、およびガラスキャピラリーを含む種々のイオン供給源配置を用いて、バッファー溶液からイオンを形成する[Greig et al., J. Am. Chem. Soc., 117: 10765 (1995)]. ESI

は具体的には、適当な温度、圧力および容積流で施与された適当な噴霧ガス（窒素など）で溶液を霧状にすることを含む。ESIはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴（FT-ICR）、四重極イオントラップ、または従来の四重極質量分析計を用いてフェムトモル量の検出に有効な高い感度および伝導を与える。

【0038】用いられる質量分析計は本発明にとって重要ではない。好適な質量分析計の例としては、四重極質量分析計、四重極イオントラップ質量分析計、およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴（FI-ICR）質量分析計が挙げられる。本明細書における実施例では、フィニガンLCQデカイオントラップ質量分析計を用いた(ThermoQuest, San Jose, CA)。標準溶融シリカESIニードルを26ゲージステンレス鋼ニードルに換えた。さらに、比例ガス混合装置(Western Enterprises, Westlake, OH)を用いてN<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> 3:1混合物を鍍装ガスおよび補助ガスの双方として供給した。窒素ガスに酸素ガスを加えると、アースを行わずに負のモードでより高いESI電圧を使用することが可能となり、より安定なエレクトロスプレーおよびより効果的な小分子のイオン化が提供される。LCQデカのキャピラリー温度は実験にもよるが、160ないし250に調節した。ESI電圧は自動分析については3.5KVに設定し、キャピラリー電圧は15Vに設定し、チューブレンズオフセットは95Vに設定した。非共有結合複合体を完全な状態で維持するのに重要な2つのパラメーターであるこれらのレンズおよびエントランスレンズの設定はそれぞれ35および80Vに設定した。

【0039】イオントラップのQ値は、弱い非共有結合的相互作用の解離を防ぐためトラッピングは低エネルギー、かつイオンに対してより穏やかなものとなるように調節すべきである。図5はフィニガンLCQの内分構成要素の模式図を示す。これらの構成要素は以下の考察の要素番号と一致している。

【0040】本発明の態様は自動化することができる。例えば、液体ハンドラーをプログラムに組み込んで、96ウェルプレートなどのウェルからサンプルを自動採取することができる。かかるオートサンプラーにより全体の試験時間が著しく短縮でき、短時間内に多数の化合物をスクリーニングすることが可能となる。オートサンプラーはゆっくりとした、なめらかで、かつ、一定の流量（約200nl/分）でサンプルを直接注入できるべきである。サンプルは既存の流れに加える（例えば、希釈する）のではなく、単一のプラグまたはポーラスとすべきである。データ解析工程もまた自動化することができる。例えば、オンラインコンピューターを利用して質量分析計結果を調べ、所定のピークを探して、認められる種々の複合体の質量および割合を定量することができる。かかる装置は市販されており当技術分野では標準的なものである。本明細書で論じられる実施例では、自動

サンプル調整および解析に100μLシリンジを用いるLC/PALオートサンプラー（CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland製）を使用した。LC/PALから3μL/分の流量でサンプルを質量分析計に導入した。

【0041】一般に、サンプル溶液は少なくとも注目される標的（X）と相互作用することがわかっている特定のポリヌクレオチド基質（S）および好ましくは少なくとも1種の試験（T）化合物を含む。溶液はまた、適当なバッファーを含んでもよい。適当なバッファーとはイオン発生量を向上させ得るもので、イミダゾールなどである[Greig et al., Rapid Commun Mass Spectrom, 9:97-102 (1995)]。読み取り可能なシグナルを生じさせるに必要な最低濃度は装置ごとに異なってよい。最低値に対する変数の数を一定にするには、ESI-MS高処理量二次スクリーニングは一次スクリーニングにおいて利用したものと同一の基質および試験濃度範囲を利用することが好ましい。効率的な試料採取および質量分析計へのイオン輸送も望ましいので、下記のように液体試料採取を自動化することが好ましい。すべての液体連絡は水密性かつ気密性でなければならない。

【0042】図5に示される模式図によれば、サンプル溶液は分析物注入ポート（10）を介して装置に注入する。噴霧ガスは鍍装ガスポート（20）を介して注入する。「液体鍍装」、すなわちクロマトグラフィー/電気泳動の流出液と連絡する流動液の層を用いて独立したESI-MSの組み合わせの性能を高める場合もある。かかる液体鍍装溶液は鍍装液体ポート（21）を介して注入すればよい。さらなるガスは補助ガスポート（22）を介して注入し、噴霧された液滴を流線スプレーに集中させることができる。図5に示されるフィニガンLCQ装置では、スプレーは過熱された金属もしくはガラスキャピラリー（50）および/またはレンズハウジング（60）を通る間に乾燥される。乾燥温度は典型的には160ないし250の範囲である。他の装置で利用できる別のアプローチは噴霧ガスとともに乾燥ガス（一般にはN<sub>2</sub>）流を含む。荷電液滴は、軸に沿ったプレナムを通して試料採取装置（10）へ向かう乾燥ガス対流に逆らって移動する。一般に、キャピラリーチューブ（50）の周縁付近に配置される窒素のカーテンは乾燥剤として役立ち、大きな液滴および粒子を排除し、イオンを離散させる。乾燥ガス対流は必須のものではないが、2種の乾燥工程を組み合わせれば最良の結果を達成できる。乾燥されたイオンはオリフィス（ESIニードル集成装置30）を通して高真空領域へ向かうので、それらは衝突チャンパー（100、200）を通して加速され、ここでバックグラウンドガスと激し衝突することでさらに離散される。一般に、真空および加速は一連のポンプ（機械ポンプ40、ターボポンプ41）によって達成される。

【0043】スリット様スキマー（70）をイオン経路

に配置して検出器（電子倍增管96）に衝突するイオンの位置およびエネルギーを規定する。スキマーは主として圧力勾配として機能し、大気から真空への圧力の段階的減少を容易にする。さらなる静電レンズを用いてイオンビームの方向を定め、偏向させて、ピーク形を最適化し、かつ、供給源から検出器までのイオンビームの伝達を最大にすることが好ましい。フィニガンLCQでは、2種の八重極焦点レンズ（80）を用いてイオン光学設計を簡略化している。次いで、イオンビームを電極、好ましくはリング電極（90）に向けて加速させる。リング電極（90）はイオンの動きに対して垂直の力をかける電場を発生させ、それらの運動エネルギーに従ってイオンを偏向させる。次いで、励起したイオンを電極から放射し、変換ダイノード（95）および電子倍增管（96）によってそれぞれ変換、計測する。

【0044】サンプルのスペクトルは5  $\mu$ L / 分ないし200 nL / 分の範囲、より好ましくは約200 nL / 分の流れでアリコート溶液を注入して得られる。溶液は質量分析計のエレクトロスプレーまたはマイクロスプレー源インターフェース（30）を通過して流れる。溶液は水 - IPA、水 - メタノールまたは水 - アセトリトリル混合物であってよく、溶液を緩衝するために酢酸アンモニウム、酢酸または蟻酸などのその他の添加物を含んでもよい。溶液はシリンジポンプを介してシリンジからまたは液体クロマトグラフィーポンプを介して液体クロマトグラフィーカラムから供給源に注入してもよい。ポンプにより液体の制御された流れが送達される。

【0045】一般に、ESI質量スペクトルは電荷状態のベル型分布を含み、そこでは隣接するピークは1電荷異なっている。ほとんどの高分子に対するESI-MSの特徴は平均電荷状態が分子量とともにほぼ直線的に増加するということである。サンプルはイオンの包絡線を発生させ、それはサンプルの成分を独特に同定し、それに対して他のサンプルおよび対照を比較することができるそのサンプルのフィンガープリントとして機能する。一般に、スペクトルは32秒/スキャンのスキャン速度にてm/z 1000ないし3000から15個のスキャンの平均合計として得られる。通常、生データは表示する前に0.5 Daガウスフィルターで処理される。マイクロスプレーニードルの大きさおよび材料はそのサンプルによって異なるとよい。

【0046】分析計は負または正のいずれのイオン化モードにセットしてもよい。質量分析計の極性を正から負に変化させて同定に関する同一のある所望の成分を比べることができる。ポリヌクレオチドは全体として正味を負の電荷を有しているため、それとの相互作用は負のモードの分析計で測定する。同様に、ほとんどのタンパク質はかなり容易に陽子を加えるため、それらは一般には正のモードの分析計で測定する。陽イオンESIに関しては、典型的には約4 ~ 6 kVの電圧が適用される。陰

イオンモードでは、酸素または六フッ化イオウまたは大気などの電子掃去剤を用いてキャピラリーチップでのコロナ放電を阻害する。本明細書に記載の実施例は負のモードの分析計で始めた。しかしながら、負のモードでは結合型リガンドのシグナルが検出されない場合には、機械を正のモードに切り替えて非結合型リガンドの存在をアッセイすることができる。

【0047】複合体の最適な観察には噴霧器位置、ガス対流、キャピラリー温度およびスキマーおよびレンズ能をはじめとする機器パラメーターの最適化が必要である。また、高分子およびリガンド濃度、バッファーの種類および濃度、ならびにエレクトロスプレーを安定化するために用いられる有機溶媒含量の最適化も必要である。用いられるガス、流量、電圧、温度、較正基準などのパラメーターは機器ごとに異なるとよい。最適化プロセスは十分に当業者の範囲内にある。キャピラリー温度および有機溶媒などの、あるパラメーターを最適化するための実験プロトコールは下記の実施例の節に記載されている。

【0048】結合の強度は相互作用の程度と相関するということが重要である。ポリヌクレオチド基質との結合が弱いということは、試験化合物が実際には標的に結合しているということを示しており、従って偽陽性またはポリヌクレオチドインターカラーターとしてヒットのプールから除外することができる。ヒットの特性決定の精度を確実なものにするためには、強い非共有結合の存在を探すべきである。単に静電相互作用もしくは電荷差によって起こる他の非特異的反応により結合しているもの、またはその相互作用が特異な構造によって指示されるもののようなものを区別しなければならない。二重らせんピークと結合（試験：基質）ピークを比較することによって弱い結合と強い結合とを区別することができる。強い結合は結合型ピーク面積が二重らせんピーク面積の少なくとも15 ~ 20%であることを特徴とする。弱い結合は結合型ピーク面積が二重らせんピーク面積の10%未満であることを特徴とする。

【0049】衝突誘導性解離（「CID」）を用いて特定の相互作用の特異性および強度を測定してもよい。衝突チャンパーは、通常イオン源（30）の直後に位置する第1の非電場領域（100）、および通常八重極の直後であってリング電極（90）の直前に位置する第2の非電場領域（200）に置くことができる。CID実験では、これらのチャンパーを用いてイオンフラグメントを誘導する。

【0050】CIDは一本鎖DNAが断片化され、他方、二重らせん：小分子複合体は乱されないままとなるようなレベルに高めればよい。また、試験溶液中の塩濃度を高めることによって、静電結合に影響を及ぼし、疎水性構造または積み重なる相互作用によるそれらの結合のみを形成することができる。結合型対非結合型複合

体量に対する塩の作用をモニターすることによって、非特異的静電相互作用と構造特異的非共有結合相互作用とを区別することができる。一般に、溶液への塩添加時の結合の著しい変化は静電相互作用の存在と相関する。従って、溶液条件の最適化の一部として、バッファー強度を調整して非特異的相互作用を排除しようとする事ができる。例えば、下記の実施例では、酢酸アンモニウムバッファーの濃度を調整した。10  $\mu$ Mから50 mMに塩濃度を高めたが、臭化エチジウム、すなわち公知のインターカレーターとの結合親和性は変化しなかった。しかしながら、増加したイオン部位の競合により正電荷分子の結合は減少した。なお、CID源は上記のように手動で操作した。

【0051】以下の実施例は例示の目的で提供される。

【0052】

【実施例】実験パラメーターの最適化：上記のように、複合体の最適な観察には機器パラメーターおよび実験条件の最適化が必要である。機器のキャピラリー温度に関しては、実験を行ってサンプルの最も効率的な輸送とイオントラップへの完全な二重らせんの維持のための最適温度を決定した。下記の6：7二重らせんを用いて、キャピラリー温度を150ないし250に調整した。次いで、一本鎖DNAと二本鎖DNAの過剰存在量および比率をモニターした。本明細書における実験条件{例えば、2：1水：IPA中に10  $\mu$ M二重らせんを含む1～3  $\mu$ L/分の流量、50 mM酢酸アンモニウム}下では、感度および二重らせんの安定性の双方において185の温度が最適であると分かった。より低い温度は過剰のアンモニア付加物をもたらし、一方より高い温度は二重らせんの解離が増加する結果となった。

【0053】エレクトロスプレーを安定化するために用いる有機溶媒に関しては、メタノール(MeOH)およびイソプロピルアルコール(IPA)が本明細書のアクセシビリティのために選択された有機付加物である。しかしながら、DMSOは組み合わせ化学において多数の化合物に対してバルク溶媒として広く用いられており、分析に受容される濃縮サンプルのほとんどがDMSO溶液中にあったので、アクセシビリティに許容されるDMSO濃度の限界を試験する必要があった。試験溶液は実施例の節において以下に記載のように調製した[例えば、10  $\mu$ M二重らせん；0.5 v/v増分において0.5ないし10.0% DMSOを添加した10 mM酢酸アンモニウム]。1%程度のわずかなDMSOが二重らせんの50%を超える分解を引き起こすことが分かった。この分解は臭化エチジウムまたはプロフラビンのいずれかの不在下でも同様に起こった。10% DMSOでは、二重らせんは100%解離してそれぞれ的一本鎖となった。本明細書におけるアクセシビリティは高処理量用のものであるため、DMSO含量は1%程度の高さでとすることが可能であり、また、結合を決定するのに十分なシグナルが得られ

る限りはいくらかの二重らせんの解離は許容された。MeOHおよびIPAを用い、酢酸アンモニウム濃度を終始10 mMに維持しながら上記の実験を反復したところ、二重らせんは水中でこれらの有機改変剤のいずれかが50%までであると安定であることが分かった。

【0054】バッファー濃度に関しては、酢酸アンモニウムの濃度を変更してリガンド結合に対するイオン強度の作用を決定した。10 mMないし250 mMの間で変動する酢酸アンモニウム濃度で10  $\mu$ M 6：7二重らせんと10  $\mu$ Mサンプルの混合物を観察した。インターカレーターの中では、プロフラビンが100 mMを超える酢酸アンモニウムを許容し、結合のシフトが最小であった。しかしながら、臭化エチジウムおよびメチルグリーンはわずか33 mM酢酸アンモニウムでDNAへの結合がおよそ70%減少した。高塩濃度で臭化エチジウムおよびメチルグリーンの結合が減少することは、これらの化合物のインターカレーションにおける結合の第1の工程の静電性の証拠である。プロフラビンは試験pHでは中性であるが、競合する対イオンの増加からほとんど影響を受けないはずである。副次的なグループバインダーの中では、ジスタマイシンA：DNA複合体が100 mM酢酸アンモニウムまで安定であり、溶液中に500 mM酢酸アンモニウムを含んでも(かなり減少したレベルではあるものの)なお観察された。他方、H33258結合は33 mM酢酸アンモニウム中の結合において相当な減少を示し、実際、33 mM酢酸アンモニウムで2：1 H33258：DNA複合体と比べた1：1 H33258：DNA複合体の相対量がシフトした。このことはH33258の二本鎖DNAへの結合がジスタマイシンAの結合の共同的性質とは異なることを示唆するものである。

【0055】サンプル調製および分析：本発明において利用されるサンプルを調製するための一般的なプロトコールは以下のとおりである。相補的一本鎖オリゴヌクレオチドを好ましくは酢酸アンモニウム沈殿により脱塩する。このDNA脱塩手順には以下の工程が含まれる。まず、オリゴヌクレオチドを約100  $\mu$ Lの水に溶解する。次いで、約500  $\mu$ Lの10  $\mu$ M酢酸アンモニウムを加える。この溶液を混合して約5分間放置する。約600ないし約100  $\mu$ Lの冷エタノール(EtOH)を加えて溶液をドライアイス中に約25分間置く。次いで、この溶液を約20分間遠心分離する。上清を除去して上記の工程を1度繰り返す。次いで、1 mLのEtOHと水の90：10溶液を加えて溶液を5分間遠心分離する。さらに、この工程を2回繰り返す。次いで、この溶液を乾燥させて再水和する。最後に、260ナノメートルでのOD値を読み取り確実に1：500希釈とする。

【0056】相補的オリゴヌクレオチド鎖および対応するオリゴヌクレオチド二重らせんは本発明にとって決定

的なものではない。二重らせんはDNA : DNA二重らせん、RNA : RNA二重らせんまたはDNA : RNA二重らせんを含み得る。本明細書で利用されるDNA鎖は以下に詳細に記載されている。脱塩したところで、相補的オリゴヌクレオチド鎖を等モル混合物で50 mM酢酸アンモニウム中に加えて50  $\mu$ M二重らせん保存液を作製する。二重らせん保存液を60 の水浴に10分間入れ、次いで室温までゆっくりと冷却する。試験溶液は試験化合物(メタノール(MeOH)に溶解)を2 : 1

水 : イソプロピルアルコール中の保存液に添加することにより作製する。試験化合物および二重らせんの最終濃度は各々10  $\mu$ Mであることが好ましい。例えば、20  $\mu$ Lの二重らせん保存液を80  $\mu$ Lの水とIPAの2 : 1溶液に加えて、100  $\mu$ Lの最終容量および10  $\mu$ Mの二重らせん最終濃度とする。次いで、試験化合物を溶液に加えて同様に10  $\mu$ Mの最終濃度とする。さらに、試験溶液を希釈して0.3  $\mu$ M程度の低さから10  $\mu$ Mまでの試験化合物濃度範囲を試験してもよい。

【0057】 適当なサンプルおよび溶液を調製したところで、ESI-MS手順を進めればよい。手動分析の一般的なプロトコールは以下の通りである。まず、試験溶液から50  $\mu$ Lサンプル(約30ピコモルの試験化合物を含む)を100  $\mu$ Lシリンジにとり、ESI-MS源を用いるLC/Qデカイオントラップ質量分析計に注入する。サンプルは約2分間にわたって約1.5  $\mu$ L/分の速度で直接注入する。次いで、スペクトルを結合型試験リガンドの存在に関して解析する。試験リガンドが結合しない場合には、サンプルを低濃度、約0.3  $\mu$ Mないし1.0  $\mu$ Mまで再び実施する。統計上の精度を確実にするには、データを合計して保存し、多数のスキャン、好ましくは30ないし50スキャン、より好ましくは40スキャンにわたって解析することが好ましい。

【0058】 上記のように、LC/PALシステムなどのオートサンプラーを用いてサンプル調製および解析を自動化することが可能である。ある実験に特異的なパラメーターコマンドをまずLC/PALシステムに入力する。その後の混合および溶液輸送はすべて、使用者の介入なくLC/PALによって実施され得る。サンプル調製のためのサイクル時間は約2.5分/サンプルである。この時間のほとんどはサンプル持ち越しを防ぐためにシリンジを洗浄することに費やされた。250 mMのリガンドサンプルを96ウェルプレートまたは標準のHPLCバイアルのいずれかに入れる。150  $\mu$ L制限容量インサートを有するプラスチックHPLCバイアル中で10  $\mu$ Lの50  $\mu$ M二重らせん保存液、15  $\mu$ Lのイソプロパノールおよび25  $\mu$ Lの水を混合する。次いで、2  $\mu$ Lのリガンド溶液を加えて混合する。アッセイされるリガンドのほとんどは60秒以内に平衡となるが、溶液は解析に先立って30~90分間室温のままとし溶液成分が平衡に達するのを確実にする。これに関し

ては、平衡とは結合型と非結合型イオンの比率に経時変化がないことと定義される。

【0059】 自動解析の一般的なプロトコールは以下の通りである。まず、31  $\mu$ Lの試験溶液サンプルをLC/PALの100  $\mu$ Lシリンジに吸い取る。次いで、20  $\mu$ L(システムのデッドボリューム)を20  $\mu$ L/分でESI-MS源へのチューブに注入する。次いで、MS解析のために流量を3  $\mu$ L/分に下げる。最初の1分間、80~800 m/z(すべての試験リガンドを包含する質量範囲)から正および負のモードを交互に合計し、次いで、さらなる1.5分間は1200~2000 m/zに変更する。延長洗浄を含む総サイクル時間は約6.5分/サンプルである。試験化合物の質量および純度が既知のサンプルに関しては、データ解析を自動化した。その他の試験化合物に関しては、データ解析を手動で終了完了した。ブランクおよび2  $\mu$ Lの添加溶媒を含む注目される二重らせんを各測定セットに含めた。本明細書に示される条件下で、2 : 1 水中の10 mM酢酸アンモニウム : IPA中の10  $\mu$ M DNA二重らせん混合物は95%を越える二重らせん状のDNAを有するスペクトルをもたらす。

【0060】 オリゴヌクレオチドおよび試験サンプル : 本明細書において実施例で利用されるオリゴヌクレオチドは注目される特定の標的と相互作用することが知られていた。それらはTriLink(La Jolla, Ca)から本発明者らの明細書に従って提供されたものである。下記の実験では、以下の配列を有する21量体オリゴヌクレオチド鎖を使用した :

300-6 : GTA TGA CGC TAG TGT  
ATG ACC (分子量 = 6,462.00)

次いで、300-6に相補的なオリゴヌクレオチド鎖を合成した。配列を以下に示す :

300-7 : GGT CAT ACA CTA GCG  
TCA TAC (分子量 = 6391.00)

これら2つのオリゴは二重らせん(分子量 = 12,853.00)を形成し、それは突出する一本鎖セグメントを全く持たない。二重らせん溶液をESI-MSによって解析した場合には、二重らせんの少なくとも3つの電荷段階ならびに2つの一本鎖のいくらかの電荷段階を認めることができた。かかるオリゴヌクレオチドの混合物により、同一の実験において二重らせんおよび一本鎖への結合に関して試験することが可能となる。6 : 7二重らせん保存液は50  $\mu$ Mの一本鎖300-6、50  $\mu$ Mの一本鎖300-7および50 mM酢酸アンモニウム溶液(水中のNH<sub>4</sub>Ac)を用いて作製した。この溶液を10  $\mu$ M二重らせんおよび10 mM NH<sub>4</sub>Acの最終濃度に希釈した。酢酸アンモニウムを加えて二重らせん形成を促進し、また確実なものにした。混合物を60で約10分間加熱し、次いで、25 (または室温)まで約30分間にわたってゆっくりと冷却した。上記のよ

うに、この時間により溶液成分が平衡に達したことが確実となる。分析計への挿入のために、2 : 1 保存液 : IPA (60  $\mu$ l の保存液、30  $\mu$ l の IPA) からなる混合物を用いて二重らせんスプレー溶液を作製した。

【0061】すべての試験化合物：基質調製物は2 : 1 H<sub>2</sub>O : IPA の溶液で希釈した。アッセイには、10  $\mu$ l の100  $\mu$ M 試験化合物、20  $\mu$ l の50  $\mu$ M 二重らせん保存液 (10  $\mu$ M 二重らせん、10mM NH<sub>4</sub>Ac)、46  $\mu$ l の蒸留水および24  $\mu$ l のIPAを含む100  $\mu$ l サンプル溶液を利用した。この最初の溶液組成は好ましい実施態様である。特に断りのない限り、実験の節に示されるデータはかかる溶液組成を利用してあり、それにおいては試験化合物濃度は10  $\mu$ Mであり、オリゴヌクレオチド濃度は10  $\mu$ Mであり、またオリゴヌクレオチドは6 : 7 二重らせんである。

【0062】次いで、種々の希釈液および新規の溶液を調製して試験化合物濃度における変化 (0.1  $\mu$ M 程度の低濃度から100  $\mu$ M 程度の高濃度まで) の作用を調べた。二重らせんの濃度は10  $\mu$ M で一定とした。

【0063】以下の実施例では、数種の公知のインターカレーター (プロフラビン、臭化エチジウム、メチルグリーン) ならびに主要でないおよび主要なグループバインダー (ジスタマイシンA、H33258) を試験した。本発明の方法を使用して種々の化合物ライブラリーから単離された一連の最初のヒットをスクリーニングして偽陽性を同定することもできる。偽陽性とは標的ではなく基質と相互作用するものであり、一般にはポリヌクレオチドインターカレーターとして同定される。

【0064】特定のリガンド濃度で、小分子：オリゴヌクレオチド複合体の形成をイエス/ノー形式でモニターした。いくつかの相互作用の特性も調べた。バッファーのイオン強度の変更によって、非特異的静電相互作用とより特異的な相互作用を区別することが可能であった。リガンドを滴定し、また結合型および非結合型二重らせんの相対ピーク強度を測定することによって種々の複合体の解離定数を算出した。供給源CIDおよびイオントラップにおける衝突を用いて、さらにこれらの相互作用を特性決定した。臭化エチジウムを伴うか伴わない二重らせんの断片パターンにおける差異が検討されている。

【0065】パートA - インターカレーターおよびグループバインダー

#### 実施例1A ジスタマイシンA

ジスタマイシンAはSigmaから入手した。本発明者らの質量分析研究では2 : 1 DstA : DNA 複合体の形成が確認されているが、結合種の比率は使用されるオリゴヌクレオチドによるものと考えられる。ジスタマイシンのグループ結合活性は図4、グラフ4Aに示されている。10  $\mu$ M 対照二重らせん (6 : 7) と0.1ないし10  $\mu$ M のジスタマイシンAを混合して、反応スキームに対するジスタマイシンAの作用を調べた。図1、グラ

フ1D (10  $\mu$ M のジスタマイシンA) に示されるアッセイの結果が以下の表1に示されている。二重らせん6 : 7を伴うジスタマイシンAの濃度 (0.3、1.0、3.3および10  $\mu$ M) に対するESIマスペクトルが図1、グラフ1A ~ 1Dにそれぞれ示されている。

【0066】実施例2A - H33258  
H33258 (ピス - ベンズアミド) はSigmaから入手した。10  $\mu$ M 対照二重らせん (6 : 7) と0.1ないし10  $\mu$ M のH33258を混合して、H33258のグループ結合活性を調べた。高濃度 (> 3.3  $\mu$ M) で2 : 1 H33258 : 二重らせん比が存在し、低濃度では1 : 1混合物が認められるに過ぎなかった。さらに、リガンドの濃度が高まるにつれて、一本鎖DNAに結合したリガンドの量の増加が認められた。

【0067】実施例3A - 臭化エチジウム  
臭化エチジウムのインターカレート活性は図4、グラフ4Bに示されている。臭化エチジウムはSigmaから入手した。本明細書における実施例では、10mM 酢酸アンモニウム中で混合して対照二重らせん (6 : 7) を10  $\mu$ M の最終濃度のEtBrを含む10  $\mu$ M の最終濃度とし、ESI-MSによって解析した。次いで、種々の濃度のEtBr (0.1、0.3、1、3.3、10および33  $\mu$ M) および酢酸アンモニウム (10、50  $\mu$ M) を用いて種々の成分濃度を含む溶液を解析した。二重らせん濃度は10  $\mu$ M で一定とした。最初の結合は3  $\mu$ M EtBrで認められた。インターカレーターの濃度が高まるにつれて、二重らせん上の複数の部位で結合するということが分かった。一本鎖への結合は認められなかった。二重らせん : 臭化エチジウム複合体が解離する場合には、断片は個々の一本鎖およびEtBr付加物を伴う一本鎖を含んでいた。臭化エチジウム試験の詳細に関しては下記の表1を参照。二重らせん6 : 7を伴うEtBr濃度 (0.10、0.33、1.0、3.3、10.0  $\mu$ M) のESIマスペクトルは図2、グラフ2A ~ 2Eにそれぞれ示されている。

【0068】実施例4A - プロフラビン  
本明細書のシステムにおいて、もう1つの公知のインターカレーターを試験した。プロフラビンはSigmaから入手した。10  $\mu$ l のプロフラビン (1ないし10  $\mu$ M の範囲にわたる最終濃度)、60  $\mu$ M の二重らせん保存液 (1  $\mu$ M ないし10  $\mu$ M の範囲にわたる最終濃度) および30  $\mu$ l のIPAを含む100  $\mu$ l 総容量のスプレー溶液を調整した。研究はFT-ICR質量分析計にて行った。10  $\mu$ M 二重らせんおよび10  $\mu$ M プロフラビンを使用する場合には、インターカレーターと二重らせん間の結合が認められた。6 : 7 DNA 二重らせんを伴うプロフラビンのデータは下記の表1および図3、グラフ3Bに示されている。DNA 二重らせん単独のデータは図3、グラフ3Aに示されている。

【表1】

		24					
インター カレター	分子量	300-6(-5)	300-7(-5)	6:7(-9)	6:7(-8)	6:7(-7)	6:7(-6)
なし	0	1291.40	1277.20	1427.11	1605.63	1835.14	2141.17
ジスタマ イシン	481.00	1387.60	1373.40	1480.56	1665.75	1903.86	2221.33
臭化エチ ジウム	315.00	1354.40	1340.20	1462.11	1645.00	1880.14	2193.67
プロフラ ピン	209.00	133.20	1319.00	1450.33	1631.75	1865.00	2176.00

## 【0069】実施例5A - メチルグリーン

本明細書のシステムにおいて、インターカレター、メチルグリーン (Sigmaから入手) を試験した。メチルグリーンは他のインターカレターと同様の結合特性を示すと認められた。得られた結果は、10 mM酢酸アンモニウム中での6:7二重らせんに対するこれらのインターカレターの相対的結合親和性はメチルグリーン > 臭化エチジウム > プロフラビンであることを示すものである。

## 【0070】パートB - 生物学的スクリーニング:

## 実施例1B - HIVインテグラーゼ

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) インテグラーゼ (Int) タンパク質はレトロウイルスの生活環における必須のステップ、ウイルスDNAのヒトDNAへの組み込みを媒介する [Lutzke et al., *Nucleic Acids Res.* 22(2):4125-31 (10/11/1994)]。HIVインテグラーゼは3つのドメインからなり、X線結晶学またはNMR分光学によりその構造は個々に決定されている。残基50~212にわたるコアドメインは酵素の触媒活性にあずかっている。小さいN末端ドメインは二量体のヘリックス-ターン-ヘリックス構造に折りたたまれており、これは保存されているHisとCys残基での亜鉛の配位によって安定化されている。このドメインの機能はわかっていないが、組み込み活性に必要であり、全長インテグラーゼに関して四量化を促進する。C末端ドメインは、これはSH3様の折りたたみを有しているが、DNA結合に参与している [Esposito et al., *Adv Virus Res.*, 52:319-33 (1999)]。

【0071】HIVインテグラーゼは二重らせんDNAを解かないのでHIV感染を永續させる。従って、HIVインテグラーゼの活性を阻害する化合物はウイルスの複製および伝染を妨げる。その酵素の阻害剤を同定するために用いる標準の導入アッセイにおいては、HIVインテグラーゼの二本鎖DNAに関する認識および相互作用が重要である [Hazuda D.J. et al., *Nucl. Acids. R* 50

es., 22:1121-1122(1994)]。

【0072】化合物の最初のライブラリーから可能性あるヒットを同定する。次いで、これらのヒットをスクリーニングしてその酵素の真の機構的阻害剤であるかどうか決定する。試験化合物は上記のように、10 μM二重らせんとともに10 μM試験化合物を含む2:1 H<sub>2</sub>O:IPA溶液に調製する。試験化合物は種々の濃度で、好ましくは約0.10ないし10 μMまでの範囲にわたってスクリーニングすることができる。種々のサンプルをフィニガンLCQイオントラップ質量分析計またはブルカーフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FT-ICR) 質量分析計のいずれかで実施することができる。後者がより感度が高い。

【0073】特定の電荷状態で観察される分子量ピークにおける変化を比較することにより、試験化合物が基質、二本鎖または一本鎖のいずれかに結合しているかどうかを同定することができる。具体的には、対照ピークと比較して分子量の特異的な増加、電荷によって除した未知のものの質量 (m/z) に相当する増加を探しながら試験化合物ピークをアッセイする。低い電荷状態では、分子量の増加は大きく、ピークのシフトはより実質的なものとなる。例えば、311.40の分子量を有する化合物を試験している場合には、-9での負のモードにおいて311.40/9すなわち34.6の質量増加が予測される。

## 【0074】実施例2B - HCVヘリカーゼ

ヘリカーゼはゲノム複製の際に二重らせんDNAおよびRNAの巻戻しにあずかるヌクレオチド三リン酸塩 (NTP) 依存性酵素である。[Yao N et al., *Nat Struct Biol.* 4(6):463-7(1997)]。C型肝炎ウイルスのRNAヘリカーゼ (HCVヘリカーゼ) は抗ウイルス治療にとって魅力的な標的である [Di Bisceglie AM, *Am J MED.* 107(6B):45S-48S (Dec. 27, 1999)]。高処理量技術を用いることで、科学者らはHCVヘリカーゼの新規のアntagオニストおよびアゴニスト、阻害剤および活性化剤を迅

速に探することができる。いくつかのHCVヘリカーゼアッセイではレポーターとして一本鎖DNAと二本鎖DNAとの比率を使用する。一般に、試験ウェルに一方のオリゴヌクレオチド鎖を共有結合させ、他方を蛍光または放射性標識する。HCVヘリカーゼ酵素、二重らせんDNAおよび試験リガンドとともに10ないし20分間インキュベーションした後、ウェルを洗浄し蛍光または放射能を測定する[Earnshaw D.L. et al., *Jrnl. of Biomol. Screening*, 4:239-248 (1999)]。

【0075】上記の最初のアッセイは可能性ある発癌物質およびインターカレート化合物などの「負」のリード化合物を排除できない場合がある。本明細書に記載のESI-MS技術を用いることで、HCVヘリカーゼに基づく一次アッセイからの一次ヒットを、化合物、特に二重らせんポリヌクレオチドに結合する化合物と相互作用するポリヌクレオチドの存在に関して調べることができる。

【0076】実施例3B-RNアーゼH  
リボヌクレアーゼハイブリッド(RNアーゼH)はDNA転写プロセスに関与する内生酵素である、RNアーゼHはRNA:DNAハイブリッドのRNA鎖を特異的に分解する[Miller H. I. et al., *Proc Soc Exp Biol Med*, 148(1):151-6 (1975); Horiuchi T, Tanpakushitsu Kakusan Koso, 31(2):132-43 (1986); Garces J. et al., *Proc R Soc Land B Biol Sci*, 243(1308):235-9 (1991)]。高処理量技術を用いることで、科学者らはRNアーゼHの新規のアンタゴニストおよびアゴニスト、阻害剤および活性化剤を迅速に探することができる。RNアーゼHの阻害剤を見出すためのあるアッセイには、アッセイにおける基質として非放射性標識したDNA:RNAヘテロ二重らせんを用いる[Rychetsky P. et al., *Analytical Biochemistry*, 239:113-115 (1994)]。DNA:RNAハイブリッドは溶液中でA型ヘリックスである。数種のインターカレート性リガンドはB型のDNAにしか結合しないが、いくつかのものはこれらのヘテロ二重らせんと会合することが知られている。この会合はA型からB型への型変換を誘導し得る。これまで実施例においてと同様に、試験リガンドによるオリゴヌクレオチド複合体との相互作用から偽陽性の結果が生じる場合がある。

【0077】上記の一次アッセイは可能性ある発癌物質およびインターカレート性化合物などの「負」のリード化合物を排除できない場合がある。本明細書に記載のESI-MS技術を用いることで、RNアーゼHに基づく一次アッセイからの一次ヒットを化合物、特に二重らせんポリヌクレオチドと結合する化合物と相互作用するポリヌクレオチドの存在に関して調べることができる。

【0078】実施例4B-CRF  
コルチコトロピン放出因子(CRF)は記憶および学習から分娩の開始に関するストレスに対する身体の全般的

な応答の調整(胎盤時計として知られている)にわたる広範な一連のシステムに関する内生の41アミノ酸からなる神経内分泌ペプチドである[Wang, HL, *Eur J Neurosci.*, 10(11):3428-37 (Nov, 1998); Keller et al., *J Med Chem*, 42(13):2351-7 (Jul 1, 1999)]。さらに、CRFは実質的な抗腫瘍作用に関して報告されており、増殖を阻害し、分化を誘導し、および腫瘍細胞において血管透水性を減少させることの双方をなし得る。CRFは窒素酸化物シンターゼ(NOS)およびL-アルギニン-NO経路の活性化を含む機構によって機能するといわれている[Tjuvajev, *In Vivo* 12(1): 1-10 (Feb, 1998)]。

【0079】高処理量技術を用いることで、科学者らはCRFの新規のアンタゴニストおよびアゴニスト、阻害剤および活性化剤を迅速に探することができる。しかしながら、最初のアッセイでは可能性ある発癌物質およびインターカレート性化合物などの「負」のリード化合物を排除できない。本明細書に記載のESI-MS技術を用いることで、CRFに基づく一次アッセイからの一次ヒットを化合物、特に二重らせんポリヌクレオチドと結合する化合物と相互作用するポリヌクレオチドの存在に関して調べることができる。

【0080】実施例5B-GnRH  
ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)は、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)としても知られているが、生殖および性の発達の生物学において中心的な役割を果たしている。アンタゴニストおよびアゴニストには下垂体性腺軸の変調によって媒介される疾病または病状のための医薬としての有用性がある。例えば、GnRHアゴニストはテストステロン産生を減少させるために使用されており、それにより良性の前立腺過形成(BPH)において前立腺体積を減少させ、また前立腺癌において腫瘍の増殖を遅らせる[Lovas et al., *J Pept Res* 52(5): 384-9 (Nov, 1998)]。また、これらの化合物は乳癌および卵巣癌を治療するためにも使用されている。GnRHアンタゴニストは、例えば子宮内膜症、子宮筋腫、卵巣および乳房嚢胞疾病および無月経の治療において記載されている。

【0081】高処理量技術を用いることで、科学者らはGnRHの新規のアンタゴニストおよびアゴニスト、阻害剤および活性化剤を迅速に探することができる。しかしながら、一次アッセイでは可能性ある発癌物質およびインターカレート性化合物などの「負」のリード化合物を排除できない。本明細書に記載のESI-MS技術を用いることで、GnRHに基づく一次アッセイからの一次ヒットを化合物、特に二重らせんポリヌクレオチドに結合する化合物と相互作用するポリヌクレオチドの存在に関して調べることができる。

【0082】実施例6B-GLP  
GLP-1(グルカゴン様ペプチド-1)は消化管ホル

モンであり、これは摂食後に血流中に放出される。その主要な作用はブドウ糖のインシュリン分泌作用を高めることを通してインシュリン分泌を刺激することである。このペプチドはグルカゴン遺伝子中にコードされており、主に消化管のL細胞において発現される。それは463個のアミノ酸を有する7膜貫通ドメインGタンパク質結合種の特定の受容体を活性化することを通して作用を及ぼす。その主要なシグナル伝達機構はアデニル化シクラーゼの活性化および環状AMPの形成である。このペプチドはまた、Ca<sup>2+</sup>の細胞質濃度を高めるが、これはNa<sup>+</sup>依存性の細胞外Ca<sup>2+</sup>の取り込みを通して、および細胞内Ca<sup>2+</sup>蓄積物からのCa<sup>2+</sup>の放出の双方を通して達成されると考えられている。また、GLP-1はグルカゴン分泌を阻害し、かつ、胃排出および胃酸ならびに膵臓の外分泌線分泌を阻害する。炭水化物代謝に関するその統合された作用は循環ブドウ糖の減少をもたらす。従って、GLP-1は糖尿病の治療上の選択肢として提案されている。最後に、GLP-1はまた、視床下部中のニューロンにおいて発現されるが、それは食物摂取を阻害するので、摂食行動の調節に関与している可能性がある[Ahren, B., *Bioassays*, 20(8): 642-51 (8/1998)]。

【0083】高処理量技術を用いることで、科学者らは新規のGLPのアнтаゴニストおよびアゴニスト、阻害剤および活性化剤を迅速に探することができる。しかしながら、一次アッセイでは可能性ある発癌物質およびインターカレート性化合物などの「負」のリード化合物を排除できない。本明細書に記載のESI-MS技術を用いることで、GLPに基づく一次アッセイからの一次ヒットのプールを化合物、特に二重らせんポリヌクレオチドと結合する化合物と相互作用するポリヌクレオチドの存在に関して調べることができる。

【0084】詳細に上記された本発明に関するその他の態様、利点および変更は、当業者ならば容易に分かるであろう。例えば、限定されるものではないが、CID、イオントラップ、IR-MRDおよび競合的結合をはじめとする多種の解離技術を用いることによって、ポリヌクレオチドとの相互作用の存在のみならず相互作用の種類、グループバインダーの中から顕著なインターカレーター、微量のグループバインダーの中から主要なものを同定することができる。これらの代替技術により構造マッピングおよび詳細に関するさらなる情報が得られる。

【0085】単一分子：ポリヌクレオチド（二本または一本鎖）相互作用を同定するためのESI-MSの使用は上記の厳密な条件およびパラメーターに制限されるも

のではない。実際、ESI-FI-ICR-MSを用いて、単一のサンプル中で、多数のDNAおよびRNA標的の存在下、数百の小分子をスクリーニングすることができる。高分離能のFT-ICR-MSは小分子および標的の質量同定を考慮に入れるものである。また、マルチプレートオートサンプラーの組み込みにより、1日に何千もの化合物の無人解析を考慮することができる。

【0086】本発明はその詳細な記載とともに記載されているが、上記の記載は本質的に例示および説明のためのものであって、本発明およびその好ましい実施態様を例示することを意図するものであるということが理解されよう。慣例の実験をとおして、当業者ならば本発明の精神から離れることなくなされ得る明らかな改変および変法を認めるであろう。従って、本発明は上記によってではなく以下の請求の範囲およびそれと同等なものにより規定されるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 10 μMのDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、ジスタマイシンA(DstA)のESI質量スペクトルを示す。グラフ1Aは0.3 μM DstAのスペクトルを示す。グラフ1Bは1.0 μM DstAのスペクトルを示す。グラフ1Cは3.3 μM DstAのスペクトルを示す。グラフ1Dは10.0 μM DstAのスペクトルを示す。

【図2】 10 μMのDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、臭化エチジウム(EtBr)のESI質量スペクトルを示す。グラフ2Aは0.1 μM EtBrのスペクトルを示す。グラフ2Bは0.33 μM EtBrのスペクトルを示す。グラフ2Cは1.0 μM EtBrのスペクトルを示す。グラフ2Dは3.3 μM EtBrのスペクトルを示す。グラフ2Eは10.0 μM EtBrのスペクトルを示す。

【図3】 DNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、プロフラビンのESI質量スペクトルを示す。グラフ3Aは対照スペクトル(10 M DNA二重らせん)を示す。グラフ3Bは試験スペクトル(10 μM プロフラビンおよび10 μM DNA二重らせん)を示す。

【図4】 DNA相互作用の模式的に示す。図4Aは主要なグループバインダーであるジスタマイシンAを示す。図4Bはインターカレーターである臭化エチジウムを示す。

【図5】 フィニガンLC/Qイオントラップ質量分析計の内部構成要素の模式図。

【図1A】

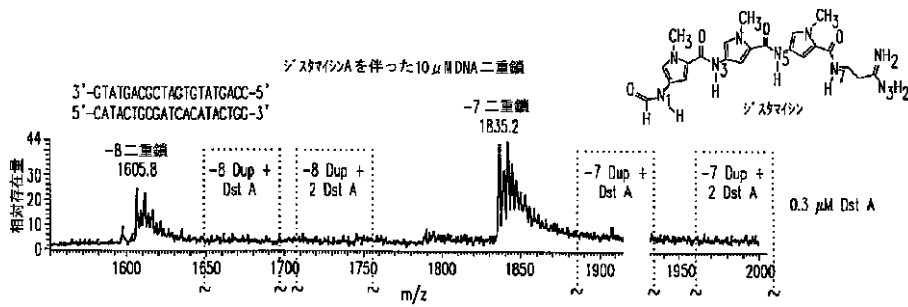


FIG.1A

【図1B】

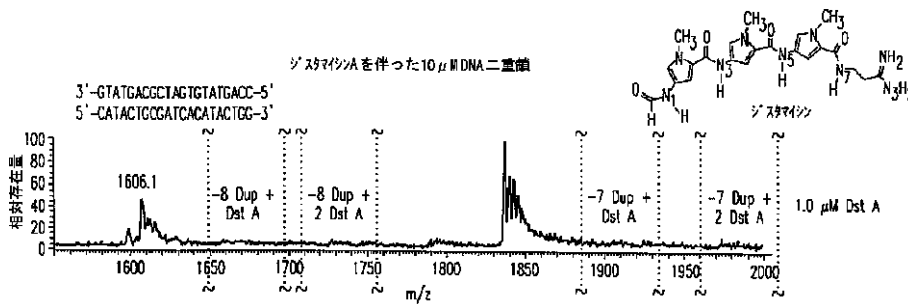


FIG.1B

【図1C】

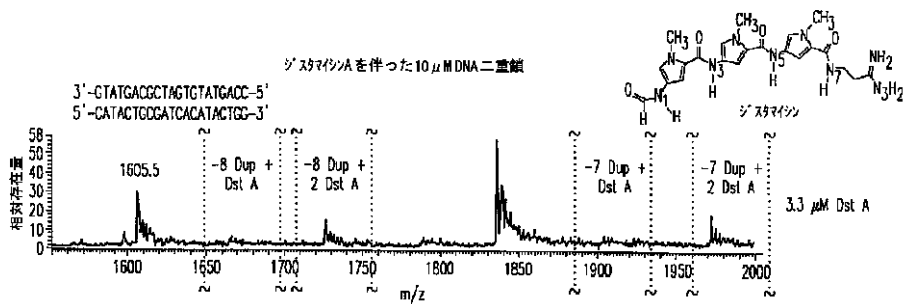


FIG.1C

【図1D】

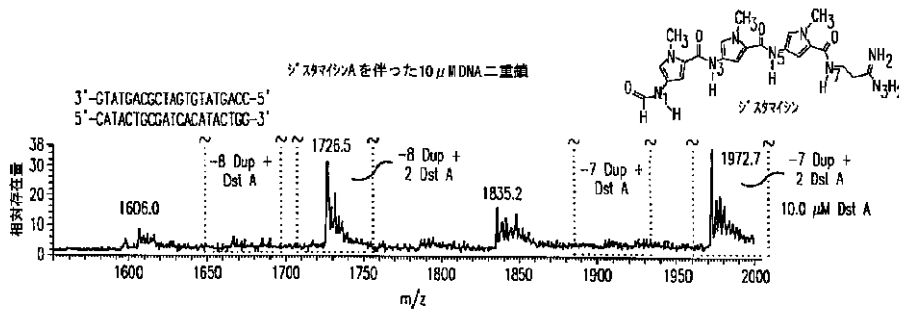


FIG.1D

【図2Aおよび図2B】

B

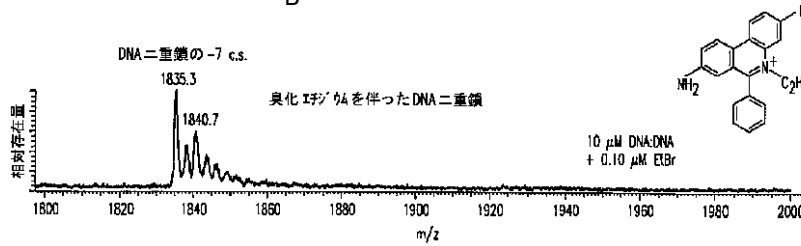


FIG.2A

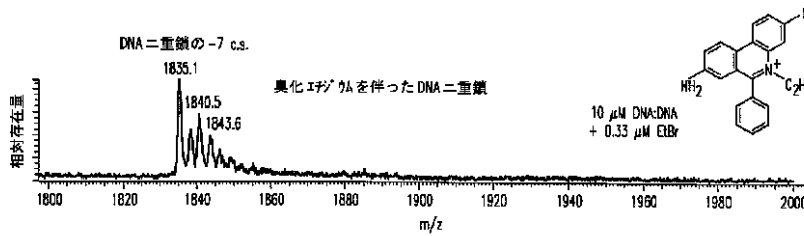


FIG.2B

【図2E】

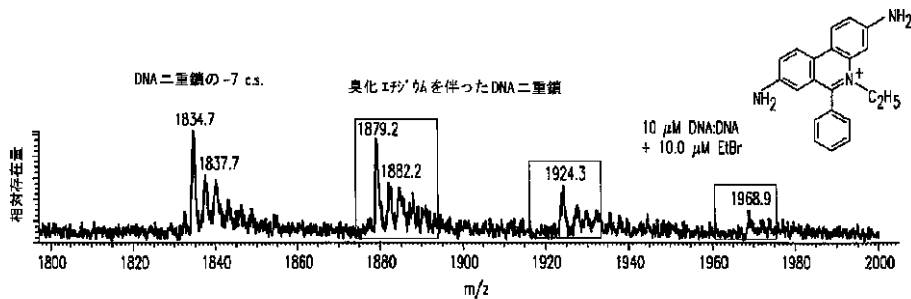
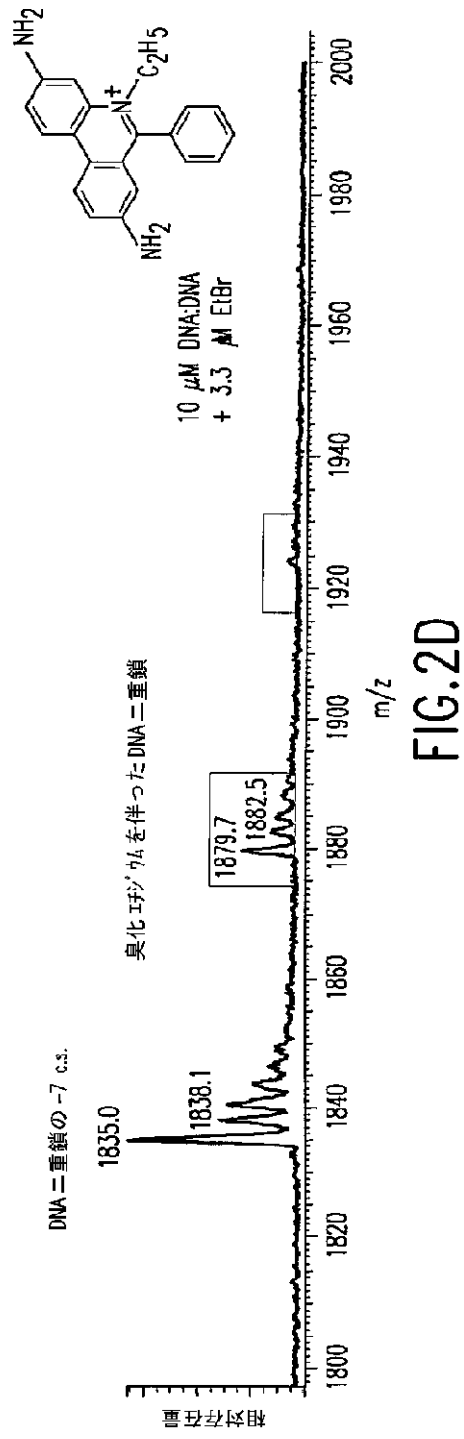
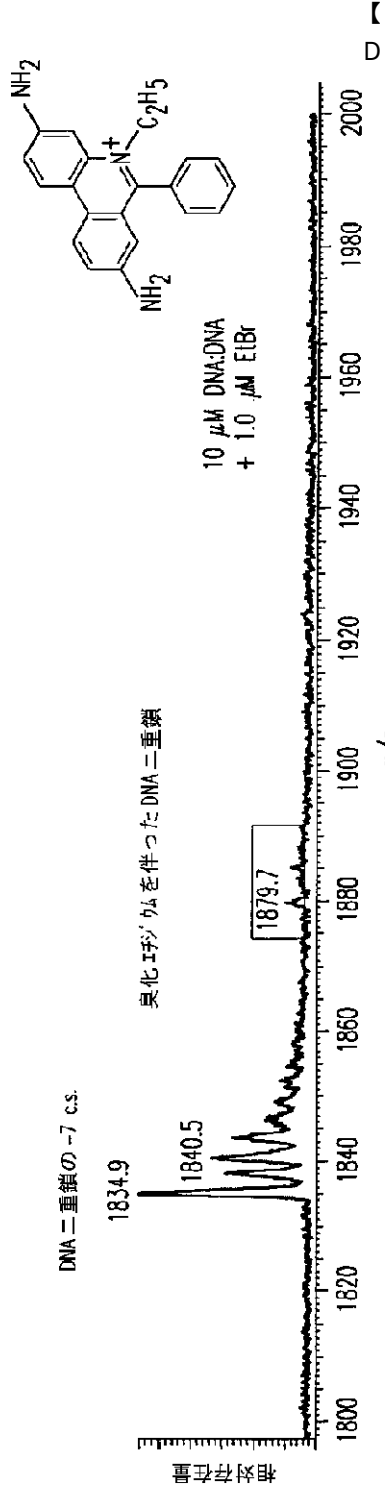


FIG.2E



【図2Cおよび図2D

【図3A】

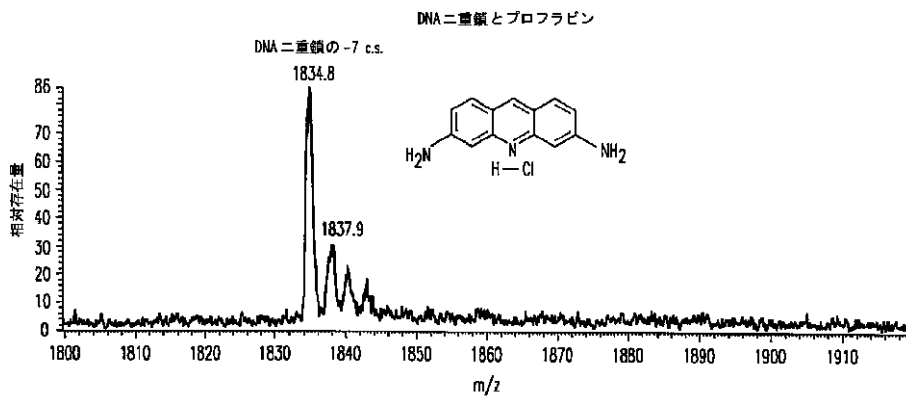


FIG.3A

【図3B】

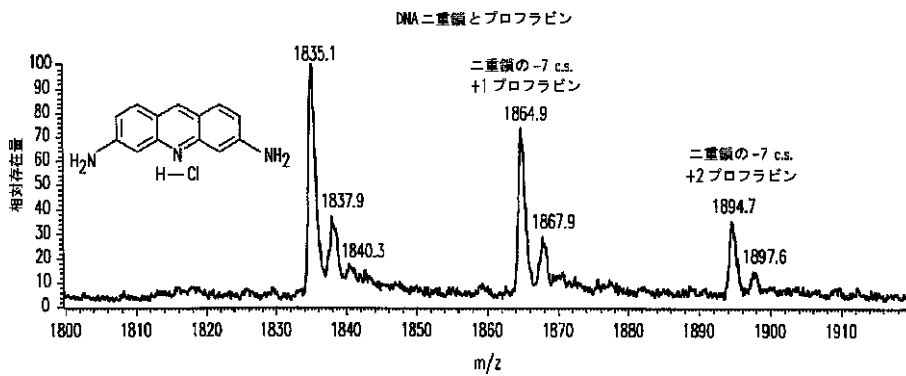
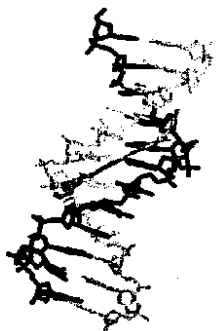


FIG.3B

【図4Aおよび図4B】

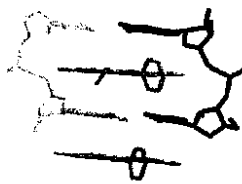
DNA 相互作用



マイナーグループバインダー  
(ジスタマイシンA)

FIG.4A

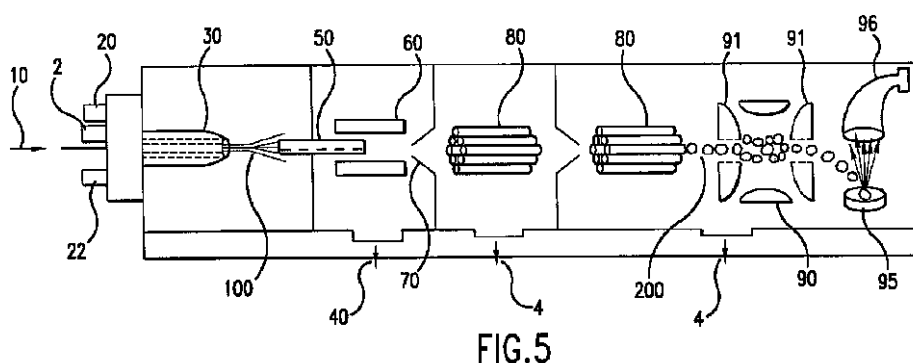
DNA 相互作用



イオン-カルシウム  
(エチジウム)

FIG.4B

【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成13年2月9日(2001.2.9)

\*【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【手続補正1】

【補正内容】

【補正対象書類名】図面

【図1A】

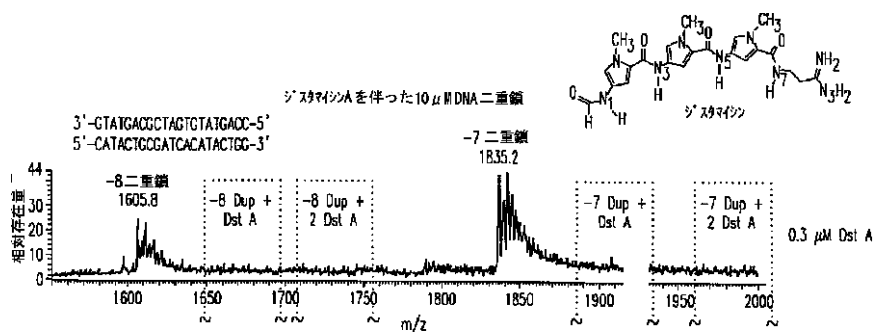


FIG.1A

【図1B】

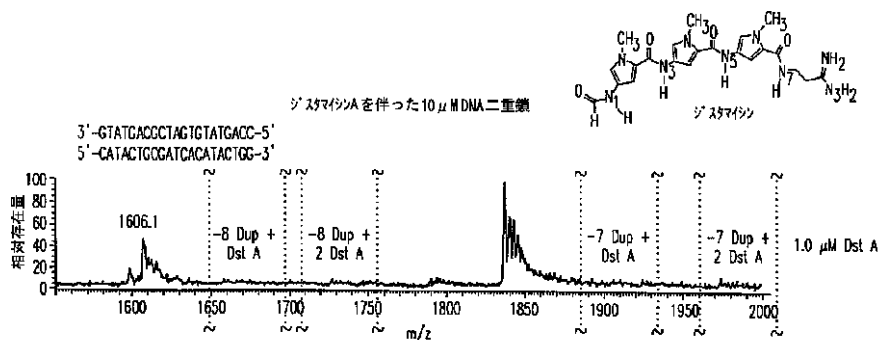


FIG.1B

【図4A】

DNA 相互作用

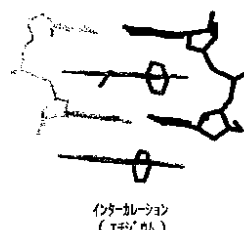


マイナグループバインダー  
(ジスタミンA)

FIG.4A

【図4B】

DNA 相互作用



インターカレーション  
(エチン'AM)

FIG.4B

【図1C】

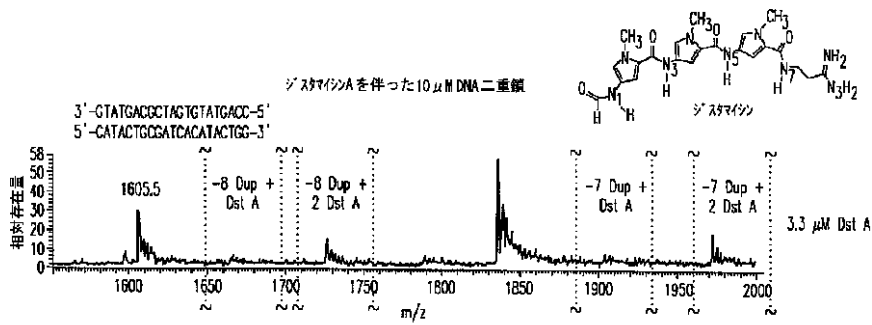


FIG.1C

【図1D】

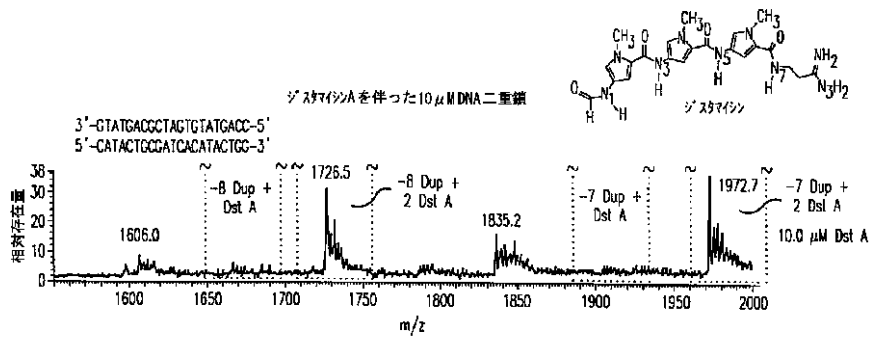


FIG.1D

【図2A】

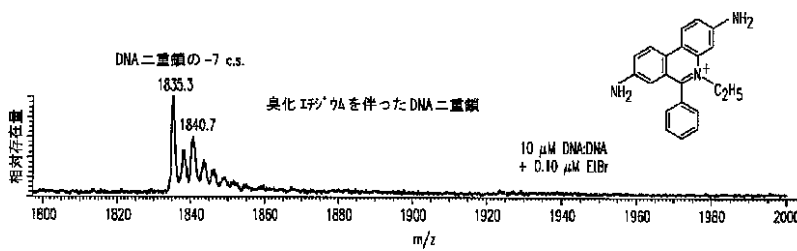


FIG.2A

【図2B】

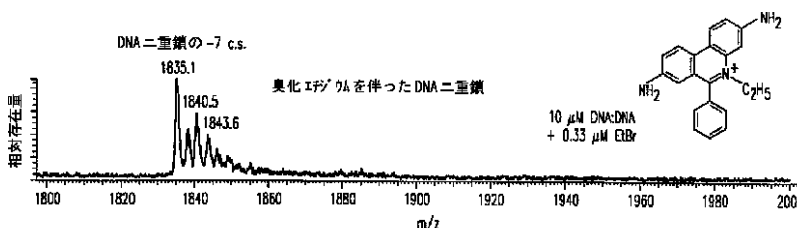


FIG.2B

【図2C】

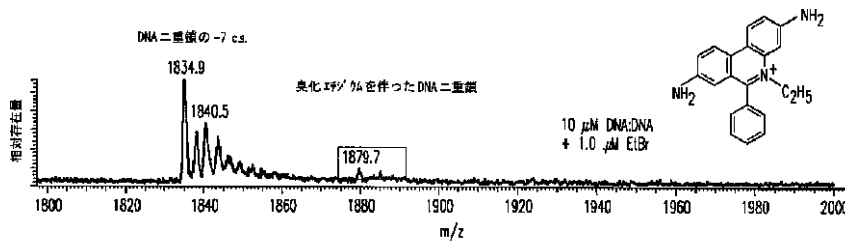


FIG.2C

【図2D】

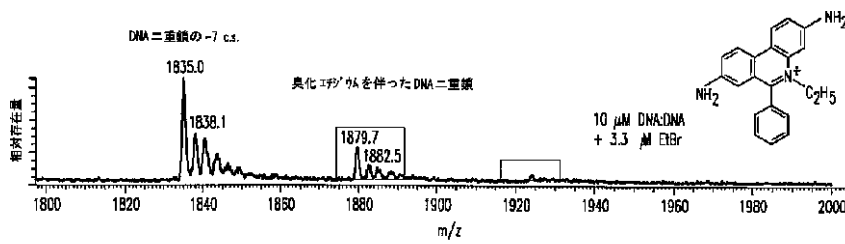


FIG.2D

【図2E】

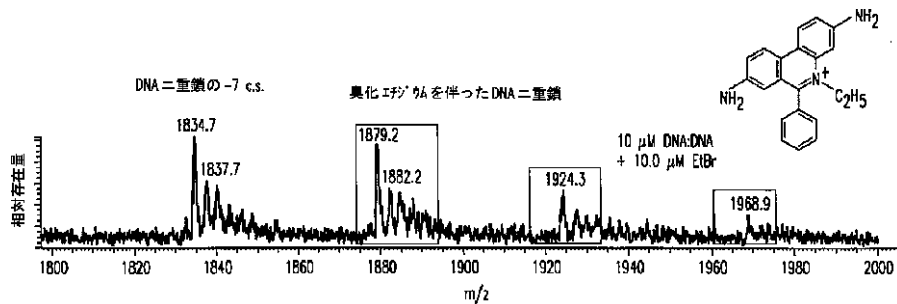


FIG.2E

【図3A】

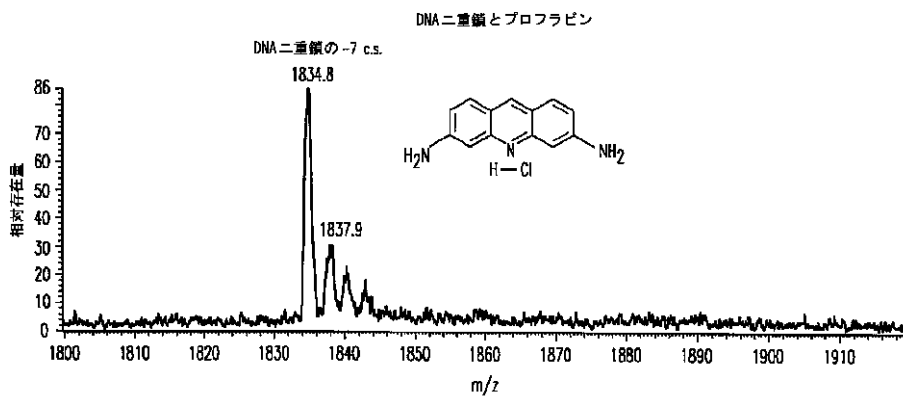


FIG.3A

【図3B】

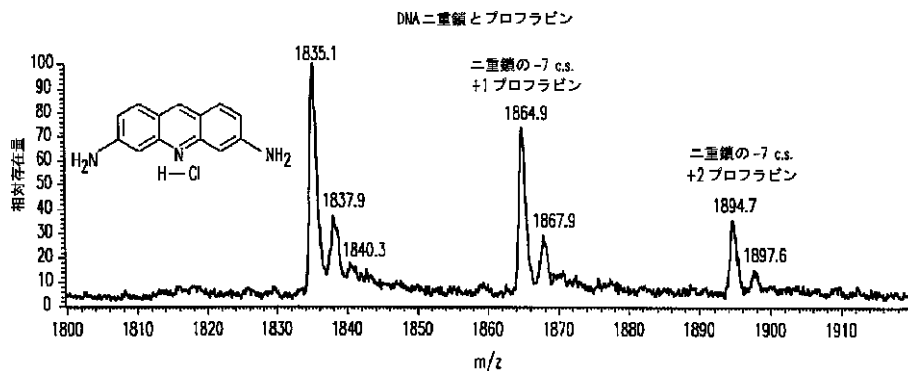


FIG.3B

【図5】

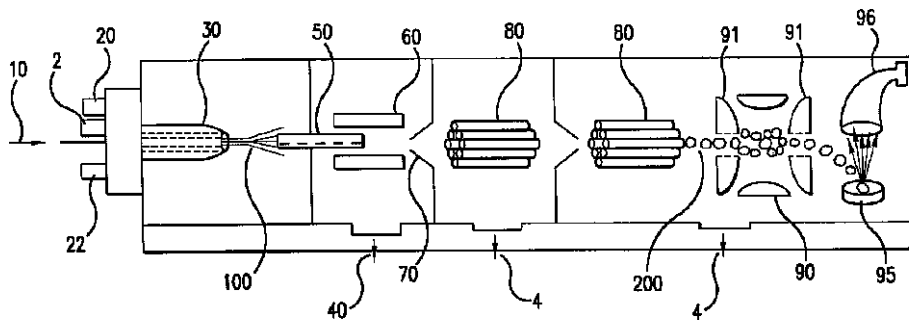


FIG.5

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正内容】

【0065】パートA - インターカレーターおよびグループバインダー

実施例1A ジスタマイシンA

ジスタマイシンAはSigmaから入手した。本発明者らの質量分析研究では2:1 DstA:DNA複合体の形成が確認されているが、結合種の比率は使用されるオリゴヌクレオチドによるものと考えられる。ジスタマイシンのグループ結合活性は図4Aに示されている。10 μM 対照二重らせん(6:7)と0.1ないし10 μMのジスタマイシンAを混合して、反応スキームに対するジスタマイシンAの作用を調べた。図1D(10 μMのジスタマイシンA)に示されるアッセイの結果が以下の表1に示されている。二重らせん6:7を伴うジスタマイシンAの濃度(0.3、1.0、3.3および10 μM)に対するESIマススペクトルが図1A~図1Dにそれぞれ示されている。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0067

【補正方法】変更

【補正内容】

【0067】実施例3A - 臭化エチジウム

臭化エチジウムのインターカレート活性は図4Bに示されている。臭化エチジウムはSigmaから入手した。本明細書における実施例では、10 mM酢酸アンモニウム中で混合して対照二重らせん(6:7)を10 μMの最終濃度のEtBrを含む10 μMの最終濃度とし、ESI-MSによって解析した。次いで、種々の濃度のEtBr(0.1、0.3、1、3.3、10および33 μM)および酢酸アンモニウム(10、50 μM)を用いて種々の成分濃度を含む溶液を解析した。二重らせん濃度は10 μMで一定とした。最初の結合は3 μM EtBrで認められた。インターカレーターの濃度が高まるにつれて、二重らせん上の複数の部位で結合することが分かった。一本鎖への結合は認められなかった。二重らせん:臭化エチジウム複合体が解離する場合には、断片は個々の一本鎖およびEtBr付加物を伴う一本鎖を含んでいた。臭化エチジウム試験の詳細に関しては下記の表1を参照。二重らせん6:7を伴うEtBr

濃度(0.10、0.33、1.0、3.3、10.0  $\mu\text{M}$ )のESIマススペクトルは図2A~図2Eにそれぞれ示されている。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正内容】

【0068】実施例4A - プロフラビン

本明細書のシステムにおいて、もう1つの公知のインターカレーターを試験した。プロフラビンはSigmaから入手した。10  $\mu\text{L}$ のプロフラビン(1ないし10  $\mu\text{M}$ の範囲にわたる最終濃度)、60  $\mu\text{M}$ の二重らせん保存液(1  $\mu\text{M}$ ないし10  $\mu\text{M}$ の範囲にわたる最終濃度)および30  $\mu\text{L}$ のIPAを含む100  $\mu\text{L}$ 総容量のスプレー溶液を調整した。研究はFT-ICR質量分析計にて行った。10  $\mu\text{M}$ 二重らせんおよび10  $\mu\text{M}$ プロフラビンを使用する場合には、インターカレーターと二重らせん間の結合が認められた。6:7 DNA二重らせんを伴うプロフラビンのデータは下記の表1および図3Bに示されている。DNA二重らせん単独のデータは図3Aに示されている。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1A】 10  $\mu\text{M}$ のDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、ジスタマイシンA(Ds t A) 0.3  $\mu\text{M}$ の場合のESI質量スペクトルのグラフである。

【図1B】 10  $\mu\text{M}$ のDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、ジスタマイシンA(Ds t A) 1.0  $\mu\text{M}$ の場合のESI質量スペクトルのグラフである。

【図1C】 10  $\mu\text{M}$ のDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、ジスタマイシンA(Ds t A) 3.3  $\mu\text{M}$ の場合のESI質量スペクトルのグラフである。

【図1D】 10  $\mu\text{M}$ のDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、ジスタマイシンA(Ds t A) 10.0  $\mu\text{M}$ の場合のESI質量スペクトルのグラフである。

【図2A】 10  $\mu\text{M}$ のDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、臭化エチジウム(E t B r) 0.1  $\mu\text{M}$ の場合のESI質量スペクトルのグラフである。

【図2B】 10  $\mu\text{M}$ のDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、臭化エチジウム(E t B r) 0.33  $\mu\text{M}$ の場合のESI質量スペクトルのグラフである。

【図2C】 10  $\mu\text{M}$ のDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、臭化エチジウム(E t B r) 1.0  $\mu\text{M}$ の場合のESI質量スペクトルのグラフである。

【図2D】 10  $\mu\text{M}$ のDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、臭化エチジウム(E t B r) 3.3  $\mu\text{M}$ の場合のESI質量スペクトルのグラフである。

【図2E】 10  $\mu\text{M}$ のDNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、臭化エチジウム(E t B r) 10.0  $\mu\text{M}$ の場合のESI質量スペクトルのグラフである。

【図3A】 DNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、プロフラビンのESI質量スペクトルの、対照スペクトル(10  $\mu\text{M}$  DNA二重らせん)のグラフである。

【図3B】 DNA二重らせんを伴った既知のインターカレーター、プロフラビンのESI質量スペクトルの、試験スペクトル(10  $\mu\text{M}$  プロフラビンおよび10  $\mu\text{M}$  DNA二重らせん)のグラフである。

【図4A】 主要なグループバインダーであるジスタマイシンAとのDNA相互作用の模式図である。

【図4B】 インターカレーターである臭化エチジウムとのDNA相互作用の模式図である。

【図5】 フィニガンLCQイオントラップ質量分析計の内部構成要素の模式図である。

【符号の説明】

2... 鎧装液体ポート

4... ターボポンプ

10... 分析物注入ポート、試料採取装置

20... 鎧装ガスポート

22... 補助ガスポート

30... オリフィス(ESIニードル集成装置)

40... 機械ポンプ

50 点ガラスキャピラリーキャピラリーチューブ

60... レンズハウジング

70... スリット様スキマー

80... 八重極焦点レンズ

90... リング電極

91... エンドキャップ

95... 変換ダイノード

96... 電子倍增管

100、200... 衝突チャンバー

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	テ-マコード(参考)
C 1 2 N	9/10	C 1 2 N	
	9/12		B
	9/16		
	9/48		
	9/50		
		15/00	Z N A A

(72)発明者 ジェシカ・マリー・ロビンソン  
 アメリカ合衆国92009カリフォルニア州カ  
 ールスパッド、カミノ・デ・アミーゴス  
 6809番

专利名称(译)	使用电喷雾电离质谱法对化合物进行高通量筛选		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001208728A</a>	公开(公告)日	2001-08-03
申请号	JP2000372877	申请日	2000-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	前罗恩制药公司		
申请(专利权)人(译)	Agoron制药公司		
[标]发明人	マイケルジェイムズグレイグ ジェシカマリーロビンソン		
发明人	マイケル・ジェイムズ・グレイグ ジェシカ・マリー・ロビンソン		
IPC分类号	G01N27/62 C12M1/00 C12N9/10 C12N9/12 C12N9/16 C12N9/48 C12N9/50 C12N15/09 C12Q1/68 G01N5/00 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6848 C12Q1/6816 G01N33/5308 C12Q2565/627		
FI分类号	G01N27/62.V C12Q1/68.Z G01N33/483.Z C12M1/00.A C12N9/10 C12N9/12 C12N9/16.B C12N9/48 C12N9/50 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12Q1/6816.C C12Q1/6816.Z		
F-TERM分类号	2G041/AA06 2G041/CA01 2G041/DA05 2G041/EA03 2G041/EA04 2G041/FA11 2G041/FA12 2G041 /GA03 2G041/GA04 2G041/GA05 2G041/GA08 2G041/GA13 2G041/GA17 2G041/GA20 2G041/GA22 2G041/GA23 2G041/GA24 2G041/GA25 2G041/GA27 2G041/GA29 2G041/HA01 2G041/HA02 2G041 /KA01 2G041/LA06 2G041/LA08 2G045/BB14 2G045/BB41 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB08 2G045/GC30 4B024/AA12 4B024/AA14 4B024/AA19 4B024 /BA10 4B024/BA14 4B024/CA03 4B024/HA12 4B029/AA23 4B029/BB13 4B029/CC10 4B050/CC01 4B050/DD01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QQ10 4B063/QQ27 4B063/QQ28 4B063/QQ44 4B063 /QR32 4B063/QR41 4B063/QR56 4B063/QS03 4B063/QS26 4B063/QS28 4B063/QS36		
优先权	60/169552 1999-12-08 US 09/521106 2000-03-07 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明总体上涉及提高高通量筛选测定的准确性和特异性的测定和相关方法，更具体地涉及涉及生物学靶标的方法。一种用于测量一种或多种测试化合物与成分的底物混合物之间的结合的方法，所述成分包括处于平衡状态的双链多核苷酸及其相关的互补单链。 (A) 提供包含至少一种测试化合物和一种底物混合物的溶液，(b) 通过电喷雾电离将溶液转化为离子气体喷雾，(c) 在喷雾中评估步骤 (d) 将离子转移至质谱仪的结果，(d) 在底物混合物成分和测试化合物之间形成的非共价结合的配合物，以及一种方法，包括鉴定与所述底物混合物的组分具有特定的非共价相互作用的测试化合物。

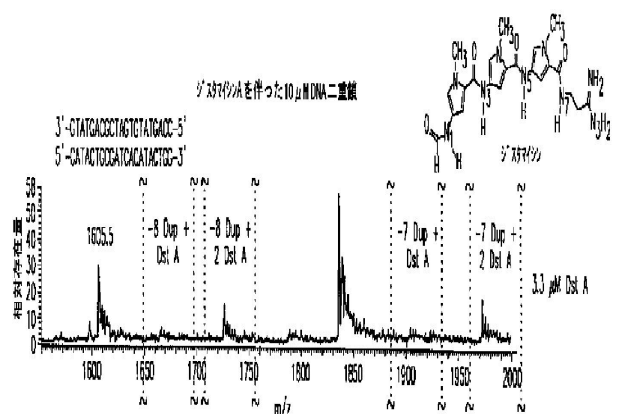


FIG. 1C