

(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 - 532401

(P2003 - 532401A)

(43)公表日 平成15年11月5日(2003.11.5)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		31/7125	4 B 0 2 4
31/7125		35/12	4 B 0 6 5
35/12		35/64	4 C 0 8 4
35/64		39/395	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 66数)			最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001 - 582361(P2001 - 582361)	(72)発明者	マティアス・ゲオルク・クリスティアン・グスタイガー
(86)(22)出願日	平成13年5月11日(2001.5.11)		スイス、ツェーハー - 4054バーゼル、ビル
(85)翻訳文提出日	平成14年11月11日(2002.11.11)		ジッヒシュトラーセ127番
(86)国際出願番号	PCT/EP01/05411	(72)発明者	ヴィルヘルム・クレック
(87)国際公開番号	W001/085762		スイス、ツェーハー - 4125リーヘン、エル
(87)国際公開日	平成13年11月15日(2001.11.15)		レンシュトレスヒェン73番
(31)優先権主張番号	0011439.7	(74)代理人	弁理士 青山 稔 (外3名)
(32)優先日	平成12年5月12日(2000.5.12)		
(33)優先権主張国	イギリス(GB)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌診断および抗癌剤のスクリーニングのためのアッセイ

(57)【要約】

新規RMPホモログ、ならびに本タンパク質をコードする核酸およびアンチセンス核酸が提供される。アミノ酸調節に依存する状態、癌、神経変性、筋肉低下、免疫疾患およびAIDSのようなRMPに依存する状態の診断法ならびにRMPに依存する状態に対して活性化薬剤を同定するためのスクリーニング法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の少なくとも5連続アミノ酸を含むタンパク質またはペプチド。

【請求項2】 配列番号1の少なくとも10連続アミノ酸を含む、請求項1に記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項3】 配列番号1の少なくとも15連続アミノ酸を含む、請求項1に記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項4】 配列番号1の少なくとも20連続アミノ酸を含む、請求項1に記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項5】 配列番号2に明示の配列を含む、請求項1に記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項6】 タンパク質またはペプチドがリン酸化されている、請求項1から5のいずれかに記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項7】 請求項1から5のいずれかに記載のタンパク質またはペプチドを認識する抗体。

【請求項8】 請求項6のホスホペプチドまたはリン酸化タンパク質を特異的に認識する抗体。

【請求項9】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項8に記載の抗体の使用。

【請求項10】 医薬として使用する、請求項8に記載の抗体。

【請求項11】 請求項1から5のいずれかに記載のタンパク質またはペプチドをコードするための核酸またはその相補鎖。

【請求項12】 該核酸が配列番号3に明示の配列の少なくともフラグメントを含む、請求項11に記載の核酸またはその相補鎖。

【請求項13】 該核酸が配列番号4に明示である請求項11に記載の核酸またはその相補鎖。

【請求項14】 配列番号4に記載の核酸の一部に対してアンチセンスな、または配列番号4と少なくとも70%相同性を有し、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズできる配列に対してアンチセンスな核酸。

【請求項15】 核酸がアンチセンスである配列が、配列番号4に少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より更に好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%相同性を有する、請求項12に記載のアンチセンス核酸。

【請求項16】 ヌクレオチド残基の少なくともいくつかがヌクレアーゼ分解に耐性であり、例えば、ホスホロチオエートおよび/またはメチルホスホネートから選択される、請求項12または13に記載のアンチセンス核酸。

【請求項17】 医薬として使用する、請求項12から14のいずれかに記載のアンチセンス核酸。

【請求項18】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項12から14のいずれかに記載のアンチセンス核酸。

【請求項19】 請求項11から13または14から15のいずれかに記載の核酸を含む、核酸構築物。

【請求項20】 請求項19に記載の構築物を含む、宿主細胞。

【請求項21】 真核細胞、好ましくは昆虫細胞または哺乳類細胞である、請求項20に記載の宿主細胞。

【請求項22】 医薬として使用する、請求項19に記載の構築物。

【請求項23】 医薬として使用する、請求項20に記載の宿主。

【請求項24】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項19に記載の構築物の使用。

【請求項25】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項20に記載の宿主の使用。

【請求項26】 RMPまたはそのフラグメントと、RPB5以外の少なくとも一つのタンパク質を含む、複合体。

【請求項27】 更にSkp2、STAP1、TIP48、TIP49、プレフォルディンまたはRPB5を含む、請求項26に記載の複合体。

【請求項28】 (a) 個体からサンプルを回収する；
(b) サンプルのRMPまたはRMP活性を測定する；そして
(c) サンプル中のRMPまたはRMP活性の存在と、アミノ酸調節に依存する状

態を相関させる

段階を含む、アミノ酸と油説に依存性の状態の診断法。

【請求項29】 段階(b)における該分析が細胞抽出物の調製を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 該分析段階が該RMPを、RMPに特異的な抗体を含む反応混合物中でインキュベートすることを含む、請求項28または29に記載の方法。

【請求項31】 該状態が腎臓、心臓、肝臓または肺疾患から選択される、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項32】 該状態が癌である、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項33】 該癌が白血病、前立腺、膀胱、胃、大腸、肺、肝臓および神経芽細胞腫からなる群から選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 該状態がAIDSである、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項35】 該状態がダイエット状態である、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項36】 該状態がラパマイシン処置に感受性である、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項37】 更に該RMPのリン酸化状態を測定し、リン酸化RMPの存在と該状態を相関させる、請求項28から36のいずれかに記載の方法。

【請求項38】 リン酸化RMPの存在をホスホスペシフィック抗体を使用して測定する、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 更に該サンプル中のRMPのレベルを測定し、RMPのレベルを標準レベルと比較する；そして該標準レベルに対して減少したRMPのレベルをアミノ酸調節に依存する状態と相関させることを含む、請求項28から36のいずれかに記載の方法。

【請求項40】 該標準レベルが該状態に罹患していない第二の個体から得たサンプルにおけるRMPのレベルである、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 該状態が癌であり、該標準レベルが該個体から得た非癌性組織におけるRMPレベルである、請求項39に記載の方法。

【請求項42】 該像体が癌であり、該標準レベルが癌性増殖に隣接した組織から除去したサンプルにおけるRMPレベルである、請求項39に記載の方法。

【請求項43】 該サンプルが細胞性サンプルであり、該方法が更に細胞における該RMPの局在化の測定および該RMPの細胞質への局在化と該状態の相関を含む、請求項28から36のいずれかに記載の方法。

【請求項44】 RMP活性を測定し、RMP活性の存在と該状態を層間させることを含む、請求項28から36のいずれかに記載の方法。

【請求項45】 該RMP活性がアミノ酸生合成をもたらす少なくとも一つの遺伝子の発現の誘導、または抑制の上昇である、請求項44に記載の方法。

【請求項46】 該サンプルがRNAである、請求項44または45に記載の方法。

【請求項47】 該サンプルが体液、例えば胸膜液、血液、血清、血漿、尿である、請求項28から42または46のいずれかに記載の方法。

【請求項48】 該分析段階が更に該サンプルにおけるコントロールタンパク質の検出を含む、請求項28から47のいずれかに記載の方法。

【請求項49】 該コントロールタンパク質がアルカリホスファターゼである、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 該方法が更に該RMPに関して得た第1の値を該コントロールタンパク質で得た第2シグナルで標準化することを含む、請求項48または49に記載の方法。

【請求項51】 請求項28から50のいずれかに記載の方法により状態を診断する；そして

ラパマイシンでの処置に関して該状態の診断をした個体を選択することを含む、アミノ酸調節に依存した状態の処置のために個体を選択する方法。

【請求項52】 該状態が癌である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】 (a)RMPを認識する抗体；

(b) サンプルを回収する手段；および

(c) 指示書

を含む、ラパマイシン感受性癌の検出用キット。

【請求項54】 該キットが更に細胞融解緩衝液およびアッセイ緩衝液を含む、請求項53に記載のキット。

【請求項55】 該抗体がホスホスペシフィック抗体である、請求項53または54に記載のキット。

【請求項56】 該キットが更に二次抗体を含む、請求項53から55のいずれかに記載のキット。

【請求項57】 該二次抗体を放射標識、蛍光標識、燐光性標識、クロモゲン、酵素、酵素基質、ビオチン、アビジンまたはジゴキシゲニンで標識する、請求項56に記載のキット。

【請求項58】 該キットが更に該RMP特異的抗体を検出する手段を含む、請求項53から57のいずれかに記載のキット。

【請求項59】 (a) RMPを含む細胞抽出物を、RMP分解の調節剤の可能性のあるものを含む反応混合物中でインキュベートする、

(b) 該RMPまたはリン酸化RMPの量、所望によりまたコントロールタンパク質の量を測定する；そして

(c) RMP分解の調節剤の存在と反応混合物におけるRMPまたはRMPリン酸化のレベルの変化を、該候補調節剤が反応混合物に存在しない場合に関連して相関させる；

段階を含む、RMP分解の調節剤のスクリーニング法。

【請求項60】 該調節剤がRMP抑制剤であり、該変化が非リン酸化RMPレベルの維持である、請求項59に記載の方法。

【請求項61】 該調節剤がRMP活性剤であり、該変化がRMPリン酸化の上昇である、請求項59に記載の方法。

【請求項62】 該調節剤がRMP活性剤であり、該変化がRMPレベルの減少である、請求項59に記載の方法。

【請求項63】 該検出段階が該RMPと抗体をインキュベートすることを

含む、請求項59から62のいずれかに記載の方法。

【請求項64】 該抗体がホスホスペシフィック抗体である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】 該RMPが固定化されている、請求項59から64のいずれかに記載の方法。

【請求項66】 該RMPまたは抗体が蛍光標識、蛍光クエンチャー、放射活性標識、シンチラントまたは酵素で標識されている、請求項63から65のいずれかに記載の方法。

【請求項67】 更に該反応混合物におけるコントロールタンパク質を含む、請求項59から67のいずれかに記載の方法。

【請求項68】 試験化合物のRMPへの結合の測定を含み、所望によりコントロール化合物のRMPへの結合の測定を含む、抗癌化合物の同定法。

【請求項69】 試験化合物の存在下でのRMPのRBP5への結合の測定を含み、所望によりまた試験化合物の非存在下での該結合の測定を含む、抗癌化合物の測定法。

【請求項70】 RMPが配列番号4に明示のものである、請求項69に記載の方法。

【請求項71】 少なくとも一つのタンパク質を標識しおよび/または固体表面に結合する、請求項69または70に記載の方法。

【請求項72】 請求項26または27複合体の一定量と試験化合物を接触させ、ついで：(a)そのまま残る複合体の量、(b)損失したそのままの複合体の量、または(c)複合体から放出された遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニットの量を測定することを含む、抗癌剤を同定する方法。

【請求項73】 更に試験化合物と接触させる前にそのタンパク質サブユニット成分から複合体を形成する段階を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項74】 請求項59から73のいずれかに記載の方法により同定されら、ラパマイシン以外の抗癌剤またはRMP分解の調節剤、好ましくは抗増殖剤。

【請求項75】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、永久抗

59から73のいずれかに記載の方法により同定した、ラパマイシン以外の薬剤の使用。

【請求項76】 請求項59から73のいずれかにキサの方法により同定したラパマイシン以外の化合物の有効量を個体に投与することを含む、癌の予防または処置法。

【請求項77】 医薬としての請求項74に記載の調節剤の使用。

【請求項78】 請求項74に記載の調節剤の有効量を個体に投与することを含む、アミノ酸調節に依存する状態のを阻害する方法。

【請求項79】 該状態が癌、血管形成、糖尿病、細胞加齢、神経変性疾患、免疫学的疾患、筋肉低下、ストレス(トラウマ、熱傷、敗血症、熱)、慢性疾患(慢性腎臓、心臓、肝臓および肺疾患)およびAIDSからなる群から選択される、請求項78に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は癌診断および治療への適用を伴う、細胞増殖の分野に関する。本発明はまた、予防的であれ治療的であれ、抗癌活性の可能性のある化合物のスクリーニングに関する。考慮されるスクリーニングアッセイは、細胞分裂、遺伝子発現および形質転換に関与するそのままの細胞のインビボの生化学的機構の部分を模倣すると考えられる。

【0002】

世界の豊かな国において、癌は概ね5人に1人の死亡の原因である。1993年に、米国癌学会は5種の最も一般的な癌は、肺、胃、胸部、結腸/直腸および子宮頸部のものであると報告している。癌は全ての例において致命的であるわけではなく、癌を発症した人の約半分のみがそれで死亡する。癌患者およびその医師らが対面する問題は、癌の治療をしようと努めることが雑草退治を試みているようであることである。癌細胞は外科的に除去するか、毒性化合物または照射により死滅できるが、癌性細胞の全ての除去は非常に困難である。一般的なゴールは、癌細胞を選択的に殺し、一方体の正常細胞は影響を受けずに残すことである。この努力の一部は、新規抗癌剤の同定に関与する。

【0003】

癌細胞は細胞サイクルの正常制御を失っており、正常細胞と比較して、制御を超えて分裂する。細胞サイクルを制御する細胞下機構は、細胞の中身の複製および分裂の必須の工程を誘導および調和させる相互作用タンパク質のセットからなる複合生化学的デバイスである。正常細胞サイクルにおいて、制御システムは、サイクルの特異的ポイントで停止できるように制御される。停止ポイントは複製または分裂の工程からフィードバックのシステムを可能にする。それらはまた環境シグナルにより制御するためのポイントを提供する。

【0004】

遺伝子発現は細胞分裂およびその制御において不可欠な部分を担う。細胞分裂の損失は、ある場合、遺伝子発現の変更を本来有し得る。癌細胞における遺伝子変更の分析は、何らかの方法で細胞分裂の制御に関与するタンパク質をコードす

る多くの遺伝子で明らかになっている。

【0005】

癌遺伝子はこのような遺伝子の一つのファミリーである。癌遺伝子は、変異形で癌細胞で発現されるか、過剰発現される。このような癌遺伝子の生成物は細胞増殖を促進する。癌遺伝子の非変異または正常発現バージョンは原癌遺伝子として既知であり、これは正常細胞で発現させ、正常細胞機構の構造タンパク質をコードする。

【0006】

癌に関連する遺伝子生成物の他の種は、腫瘍抑制遺伝子により発現されるものであり、この遺伝子生成物は細胞増殖の抑制に働く。腫瘍抑制遺伝子の変異またはこの遺伝子生成物の機能の損失は、増殖の正常制御の損失および制御を超えた細胞分裂をもたらす。

【0007】

癌細胞およびそれらの癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の研究は、成長因子が、細胞内シグナル伝達カスケードの複合ネットワークを介して正常細胞中で細胞増殖をどのように制御するかを示すのを助けている。これらのカスケードは、最終的に遺伝子転写および細胞サイクル制御システムの構築と活性化を制御する。細胞サイクル制御機構の成分部分およびどのようにそれが作動するかに関する知識が増えるに連れて、癌細胞における制御の損失を正すための可能性は増えている。制御の必須ポイントおよび必須タンパク質が制御ヒエラルキーで同定されており、必要に応じて、プロモーターまたは阻害剤として作用するように薬剤で標的化する可能性がある。

【0008】

細胞サイクル制御システムは、タンパク質の二つの主要なファミリーに基づく。第1は、サイクリン依存性タンパク質キナーゼ(CDK)であり、その多くの変異体、例えば、CDK1およびCDK2が存在する。CDKは選択タンパク質をセリンおよびスレオニン残基でリン酸化する。タンパク質の第2の種類はCDK分子に結合し、標的をリン酸化するその能力を制御するサイクリンと呼ばれる分化した活性化タンパク質のファミリーである。サイクリンそれ自体は細胞サイク

ルの各段階で合成および分解のサイクルに付される。サイクリンの種々の種、例えば、サイクリンAおよびサイクリンBが存在する。

【0009】

Chao Y et al (1998) Cancer Research 58:985-990は、正常サイクリンAレベルを発現する患者と比較した、患者におけるサイクリンAの過剰発現と、腫瘍細胞の増殖活性の間の相関を報告している。サイクリンAを過剰発現する患者は、過剰発現しない患者よりも短い平均無症候期間であった。Chao et al (1998)はまたサイクリンA相互作用タンパク質(Skp2)は過剰発現したとき、サイクリンAと同じ腫瘍細胞活性を示さないと報告した。Chao et al (1998)は、Skp2の発現が細胞サイクル進行にどのように関与するかに注目しているが、Skp2の実際の生化学的機能はまた未知である。

【0010】

より最近の文献において、Chao Y et al (1999) Cancer Letters 139:1-6は、サイクリンAが新規抗肝細胞癌(HCC)治療の検査の有用な標的を提供し得ると示している。例えば、アンチセンスmRNAを使用したSkp2の過剰発現の遮断を調査する実験の結果は、異常Skp2発現がHCC増殖と直接の相関がないことを示す。

【0011】

CDKの活性は細胞の制御の対象であり、CDK阻害タンパク質(p27)は同定されている。正常細胞において、p27はDNA複製に必須のCDKの白湯を制御することが示されている。p27のレベルは、静止細胞で高く、分裂の刺激を受けている細胞で低いことが判明している。p27はそれ自体細胞を分裂に駆動する活性化CDKの阻害により、細胞分裂のブレーキとして作用する。p27のレベルの減少は阻害から活性化CDKを離し、細胞を分裂に駆動する。このp27の活性と一致して、その不安定化が、腫瘍侵略性および癌患者の悪い予後と一般に相関している。

【0012】

細胞サイクル制御システムは動的システムであり、p27それ自体細胞中で一定レベルで残らない。レベルは細胞サイクルのポイントに依存して異なる。p2

7の低いレベルはユビキチン化および続くプロテアソーム仲介分解を介した破壊のためである。p27のユビキチン介在分解の必須条件は、活性化CDKによるスレオニン残基187(T187)のリン酸化である。リン酸化p27のユビキチン化に必要な酵素は知られていないが、酵母のようなシステムにおけるユビキチン化の知識から、p27に特異的なヒトユビキチンタンパク質リガーゼ(E3)が存在し得ると予測される。

【0013】

Sutterluety H et al (1999) Nature Cell Biology 1:207-214は、Skp2が、ユビキチン化経路を介して細胞中のp27の分解を促進することを報告している。Skp2はF-Box-タンパク質(FBP)ファミリーのタンパク質メンバーである。Skp2はSkp1、CluA(Cdc53)、F-Boxタンパク質(SCF)複合体のp27特異的レセプターであるように見える。このような複合体は酵母中で既知であり、FBPサブユニットがユビキチン化の基質に特異性を有するユビキチン-タンパク質リガーゼ(E3)として働く。E3は活性化ユビキチン分子のユビキチン接合酵素(E2)から分解する基質への移動を促進する。同様に、ヒトにおいて、SCF複合体が存在し、Skp2は、p27と特異的に相互作用する能力を有し、p27のユビキチン仲介分解に必須であるように見えるFBPである。インビボおよびインビトロの両方で、Skp2はリン酸化p27をユビキチン化し、分解する細胞性組織の律速成分であることが判明している。

【0014】

Skp2は一つの遺伝子の生成物であり、それ自体細胞を分裂に駆動する点で珍しい能力を有する。この能力は、他の既知の遺伝子生産物のわずか、例えば、E2F-1、c-MycおよびサイクリンE-CD2複合体のみしか共有しない。細胞サイクルのG1/S遷移時のSkp2の適時の蓄積は、哺乳類細胞におけるDNA複製開始の制御をする少数の律速段階の一つであり得る。Sutterluety et al (1999)は、SCF複合体に凝集しないSkp2の変異が、異所性に生成された野生型p27の排除の除外に不完全であることを発見した。また、変異Skp2はサイクリン-E/A関連キナーゼの活性化およびS相の導入を引き起こした。Skp2はまたCDKの独立した結合部位であり、活性化CDKはp27の

T187残基のリン酸化に關与するように見える。Sutterluety et al (1999)は、また、どのように正常Skp2が、サイクリンE/A依存的キナーゼの活性化およびS相への挿入が非分解可能p27変異体の発現により遮断されるときでさえ、サイクリンAタンパク質の蓄積を誘導するかに注目している。考慮されるのは、Skp2がサイクリンAを上方制御し、この下方制御されたp27とは無関係であると結論付けられている。Skp2がサイクリンAを上方制御する機構は未知である。形質転換細胞におけるSkp2の觀察される上昇したレベルは、腫瘍抑制作用因p27の分解の速度の増加をもたらすことにより、腫瘍発生(tumorigenesis)の工程に、少なくとも部分的に寄与するはずであるという示唆がある。p27発現の欠失は、結腸直腸および乳癌の患者の無症状生存と相関する。また、p27は腫瘍抑制にハプロ-不完全(haplo-insufficient)であることが判明している。

【0015】

Carrano A. C. et al (1999) Nature Cell Biology 1:193-199は、どのようにSkp2が物理的にリン酸化p27と、インビトロおよびインビボの両方で相互作用するかを報告している。p27ユビキチン化に機構的に必須であるリガーゼの全ての成分が発見しなければならないままであるが、Carrano et al (1999)は、Skp2がこの機構の重要な部分であり、基質認識およびp27への特異性を提供することを証明している。Skp2に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが細胞においてSkp2発現を減少させ、それにより内因性p27のレベルの増加をもたらすことが判明している。Carrano et al (1999)は、p27のユビキチン化が起こるためには、サイクリンE-CDK2またはサイクリンA-CDK2の更なる必要性を確認している。細胞におけるp27分解は、有糸分裂刺激に続くSkp2およびサイクリンの両方の蓄積による二重制御に付されるよう見える。

【0016】

癌の分子ベースを解明している科学者に興味深いのは、遺伝子発現の制御の分子ベースに關連する研究の分野である。癌におけるSkp2およびp27の見かけの必須の役割と以前は非關連であったのは、Bauer A. et al (1998) Proc. Na

tl. Acad. Sci. USA 95:14787-17492において報告されたPontin 52である。Pontin 52は、TATAボックス結合タンパク質(TBA)の結合部位を有する核タンパク質である。Pontin 52のタンパク質等価物は、TIP49と呼ばれる。Wood M. A. et al (2000) Molecular Cell 5:321-300は、培養ラット胚線維芽細胞のc-Myc腫瘍形成製性形質転換が、TIP49を必須補助因子として必要とすることを観察している。

【0017】

RNAポリメラーゼサブユニットが、遺伝子発現の制御における転写調節剤の標的を提供するはずであると考えられている。RNAポリメラーゼIIサブユニット5(RPB5)は、過剰発現されたとき、Hbxのトランス活性化機能を阻害するタンパク質であるRPB5-仲介タンパク質(RMP)と相互作用することが証明されている(Dorjsuren D. et al. (1998) Molecular Cell Biol. 18:7546-7555)。

【0018】

RMPホモログであるNNX3もまた文献に記載され(Van Leuven et al. (1998) Genomics 54:511-520)、骨格筋、神経節および腫瘍細胞系で発現されることが発見されている。しかし、その機能は解明していなかった。

【0019】

Genebank配列AC008507.6およびAC073732は、対応するRMP/NNX3配列に相同性の領域を有するヒトおよびマウスcontigを各々提供する。

【0020】

Genebank配列AF083242は726塩基対を含み、図1に配列番号2として示す。本DNA配列は、任意の構造的または機能的タンパク質をコードすることも既知でなく、ゲノムにおいて任意の調節性または他の効果を有することが知られている配列でもない。また利用可能なのは、cDNA配列に由来する配列である。これは図2に配列番号1として明示する。また図1に示す、Genebank配列(配列番号2)と種々の程度の相同性を有する多くの発現配列標識(EST)が存在する。

【0021】

発明の要約

本発明は：

MEAPTVETPP DPSPPSAPAP ALVPL(配列番号3)

の少なくとも5連続アミノ酸、好ましくは配列番号3の少なくとも10、15、20またはそれ以上の連続アミノ酸を有するタンパク質またはペプチドを提供する。より好ましくは、ペプチド配列は任意の付加的ペプチドまたはタンパク質配列のN-末端である。最も好ましくは、本発明は配列番号4に明示の配列を有するタンパク質を提供する。所望により、タンパク質またはペプチドはリン酸化し得る。

【0022】

本発明のタンパク質またはペプチドを特異的に認識する抗体、特にホスホスペシフィック(phosphospecific)抗体が提供される。

【0023】

また提供されるのは、所望によりホスホロチオエートおよび/またはメチルホスホネートのようなヌクレアーゼ分解に耐性であるヌクレオチド残基を含み得る、アンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチドを含む、本発明のタンパク質またはペプチドをコードする核酸またはその相補的配列である。

【0024】

また提供されるのは、本発明の核酸を含む拡散功逐物、ならびに構築物を含む、宿主細胞、特に真核宿主細胞、好ましくは昆虫細胞または哺乳類細胞である。

【0025】

本発明はまた願の予防または処置のための医薬の製造のための、ならびに医薬として使用する、本発明の抗体、核酸、構築物または宿主細胞の使用も包含する。

【0026】

本発明の他の態様において、RMPまたはそのフラグメントと、RBP5以外の少なくとも一つの他のタンパク質を含む複合体を提供する。好ましくは、複合体はSkp2、STAP1、TIP48、TIP49またはプレフォルディンを、所望によりRBP5と共に含む。

【0027】

本発明の更なる態様において、アミノ酸調節に依存する状態の種々の診断法が提供される。一つの実施態様において、方法は：

- (a) 個体からサンプルを回収する；
 - (b) サンプルのRMPまたはRMP活性を測定する；そして
 - (c) サンプル中のRMPまたはRMP活性の存在と、アミノ酸調節に依存する状態を相関させる
- 段階を含む。

【0028】

アミノ酸調節に依存する状態は、慢性腎臓、心臓、肝臓、または肺疾患、癌、AIDS、ダイエット状態、およびラパマイシン処置に感受性のある状態を含む。方法は、RMPのリン酸化状態の測定および状態とリン酸化RMPの状態の相関を含み得る。あるいは、サンプル中のRMPのレベルを測定し、標準レベルと比較する；それにより、標準レベルと比較したRMPの減少を、アミノ酸調節に依存する状態と相関させることができる。細胞におけるRMPの細胞性局在化をまた状態の指標として使用できる。更なる態様において、RMP活性を、例えば、アミノ酸生合成をもたらす少なくとも一つの遺伝子の発現の導入(または抑制の上昇)の分析により測定する。

【0029】

また提供されるのは、本発明の診断法に基づいたラパマイシンで処置する個体の選択法である。

【0030】

本発明の診断法に有用な種々の試薬を含むキットも提供され、このようなキットは1個以上のRMPを認識する抗体；特に、ホスホスペシフィック抗体、サンプルを回収する手段、RMP特異的抗体を検出する手段を、所望により、指示書、細胞融解緩衝液、アッセイ緩衝液、二次抗体および診断アッセイの実施に有用な他の試薬または容器を含む。

【0031】

本発明によりまた提供されるのは、RMP分解のモジュレーターの種々のスクリーニング法である(または何らかの方法でアミノ酸調節に依存する状態に有効

な試薬の同定)。例えば：

(a) RMPを含む細胞抽出物を、RMP分解の調節剤の可能性のあるものを含む反応混合物中でインキュベートする、

(b) 該RMPまたはリン酸化RMPの量、所望によりまたコントロールタンパク質の量を測定する；そして

(c) RMP分解の調節剤の存在と反応混合物におけるRMPまたはRMPリン酸化のレベルの変化を、該候補調節剤が反応混合物に存在しない場合に関連して相関させる：

段階を含む方法が提供される。調節剤はRMP抑制剤であり得、この場合、レベルの変化は非リン酸化RMPレベルの維持である。あるいは、調節剤はRMP活性化剤であり得、この場合レベルの変化はRMPリン酸化の上昇またはRMPレベルの減少である。

【0032】

試験化合物の存在下でのRMPのRPB5 (RNA pol IIサブユニット5 ; Cheong et al., EMBO J. 14(1), 143-150 (1995))への結合の測定、所望によりまた試験化合物の非存在下での結合の測定を含む、抗癌化合物を同定する方法はまた本発明により提供される。

【0033】

更に別の実施態様において、RMPタンパク質複合体と試験化合物を接触させ、ついで：(a)そのまま残る複合体の量、(b)損失したそのままの複合体の量、または(c)複合体から放出された遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニットの量を測定することを含む、抗癌剤を同定する方法が提供される。所望により、本方法は、試験化合物と接触させる前にそのタンパク質サブユニット成分から複合体を形成する段階を含む。

【0034】

本発明にまた包含されるのは、本発明法の任意の方法により同定された、ラパマイシン以外の、抗癌剤またはRMP分解の調節剤、好ましくは抗増殖剤である。

。

【0035】

他の態様において、本発明は、癌の予防または処置の医薬としてのおよび/またはその医薬を製造するための、本発明のスクリーニング法により同定した、ラマパイシン以外の薬剤の使用を提供する。

【0036】

更なる態様において、本発明は、本発明のスクリーニング法で同定したラマパイシン以外の化合物の有効量を投与することを含む、アミノ酸調節に依存する状態の阻害法を提供する。このような状態は、限定しないが、癌、血管形成、糖尿病、細胞加齢、神経変性疾患、免疫学的疾患、筋肉低下、ストレス(トラウマ、熱傷、敗血症、熱)、慢性疾患(慢性腎臓、心臓、肝臓および肺疾患)およびAIDSを含む。

【0037】

発明の詳細な記載

本発明者らはS k p 2 および p 2 7 の発現レベルに関して、種々の異なる癌細胞タイプのスクリーニングをしている。発明者らはまたS k p 2 およびH - R A S^{G12V}の両方と、一次齧歯類線維芽細胞の共形質転換を行なっている。これらの実験のほかに、発明者らは、S k p 2 が多くのヒト癌を担う癌遺伝子であることを発見している。

【0038】

S k p 2 の癌原性機能の調査において、発明者らはS k p 2 - 関連タンパク質1 (S T A P 1) と呼ばれる新規タンパク質を予想外に発見した。発明者らはS T A P 1 に対する抗体を生成し、これらの抗体をH e L a 細胞からのS T A P 1 を免疫沈降するための抗体として使用した。免疫沈降物は、驚くべきことに、いくつかのS T A P 1 - 共免疫沈降タンパク質を含むことが判明した。S T A P 1 を含むタンパク質は、複合体を形成することが判明した。タンパク質の分子量を質量分析により測定し、ついでタンパク質および遺伝子配列のデータベースをタンパク質の試みおよび同定のために調査した。全く予想外に、タンパク質のS T A P 1 含有複合体は、T I P 4 8、T I P 4 9、R P B 5 (R N A p o l II サブユニット5)、R M P 1 (R N A p o l II メディエータータンパク質)ならびに他の現在まで未知のタンパク質を含むことが判明している。

【0039】

任意の理論に縛れることを望ずに、発明者らはSkp2がSTAP1および、転写制御アパレイタスの既知の要素、例えば、TIP49(およびTIP48)、RPB5およびRMP1との複合体を介して相互作用できる腫瘍遺伝子を代表し、この連結がタンパク質-タンパク質結合および酵素的活性の阻害剤としての攻撃の新しいポイントを提供することを理解する。このような阻害剤は、抗増殖性およびしたがって、抗癌特性を有することが期待される。この発見の観点から、適当なスクリーニングアッセイは、本発明により、例えば、新規抗癌剤の同定のために開発できる。

【0040】

本発明の一つの態様において、RMP1コード配列ならびに得られるタンパク質生成物が提供される。ヒトRMP1ホモログの先に公開された配列は、本発明で提供される配列のN-末端の約70アミノ酸を欠くか(NNX3: Van Leuven et al.; NCBI Accession No. AAD08679, 21 Jan 1999)またはRMP1のN末端から50アミノ酸を、非関連配列由来の約25アミノ酸で置換されている(Dorjsuren et al.; NCBI Accession NO. NP_003787, 1 Nov 2000)。本発明で、ヒトゲノム配列が解明され、本発明により提供されるRMP1を測定するための慣用的事柄であると予期するであろう。それにも関わらず、アップデートされた配列データベースはまだ切断ヒトRMP1ホモログ配列のみ提供している(ACBI Accession No. XP_012802, 16 April 2001)。

【0041】

したがって、本発明の一つの態様において、
MEAPTVETPP DPSPPSAPAP ALVPL(配列番号3)
の少なくとも5連続アミノ酸、好ましくは配列番号3の少なくとも10、15、20またはそれ以上の連続アミノ酸を有するタンパク質またはペプチドを提供する。より好ましくは、ペプチド配列は任意の付加的ペプチドまたはタンパク質配列のN-末端である。最も好ましくは、本発明は配列番号4に明示の配列を有するタンパク質を提供する。所望により、タンパク質またはペプチドはリン酸化し得る。リンペプチドは、ホスホスペシフィックペプチドの製造に特有用意である。

り、それは、ついで、天然に存在するホスホ - R M P との反応に関して試験できる。本発明のタンパク質およびペプチドは、下記に詳述する診断およびスクリーニング法に特に有用である。

【0042】

本発明の方法において有用なのはまた R M P 1 変異体またはそのフラグメントである。R M P 1 変異体は、配列番号 4 と実質的に相同性の配列、特に、少なくとも 60%、好ましくは少なくとも 70 または 80%、より好ましくは少なくとも 90%、より更に好ましくは少なくとも 99% の同一性(相同性)の程度を有する。

【0043】

R M P 1 変異体は好ましくは、少なくとも一つの転写制御因子、所望により細胞の他のタンパク質またはポリペプチドに結合親和性および/または会合親和性を有する。好ましい R M P 1 変異体は、1 個以上の T I P 4 8、T I P 4 9 および R P B 5、所望によりまた他のタンパク質またはポリペプチドに結合親和性および/または会合親和性を有する。

【0044】

R M P 1 の変異体は変異変異体(mutant variant)の全ての形、例えば、少なくとも一つのアミノ酸が欠失または置換しているものを含む。アミノ酸の置換が関与する任意の変化は、好ましくは中性または保存的置換である。

【0045】

他の変異体は、少なくとも 1 個の付加的アミノ酸を配列に含む、および/または融合タンパク質のような更に付加的アミノ酸配列またはドメインを含むタンパク質またはポリペプチドを含み、当分野で既知である。

【0046】

R M P 1 タンパク質またはポリペプチドの更なる変異体は、配列中の少なくとも一つのアミノ酸が天然または非天然アナログであるものを含む。また、配列中の 1 個以上のアミノ酸を、例えば、物理的安定性を増加させるため、または酵素的、特にプロテアーゼまたはキナーゼ活性への感受性を低下させるために、化学的に修飾し得る。

【0047】

本発明の更なる態様において、本発明のタンパク質またはペプチドをコードする核酸、ならびにその相補的配列が提供される。特に、核酸は配列番号5(配列番号3のアミノ酸配列をコードし、配列番号6のフラグメントとして発見)の少なくともフラグメント、またはその相補鎖を含み、好ましくは、配列番号6に記載の配列、またはその相補鎖を含む。このような核酸はプローブおよびプライマーとして、特に、RMP1の完全長核酸コード配列を得るために有用である。

【0048】

本発明のRMP1タンパク質、またはそのポリペプチドフラグメントは、実質的に図4(配列番号6)に明示の核酸配列により、またはそれと少なくとも70%相同性を有し、低ストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズでき、少なくとも配列番号5のフラグメント、好ましくは、少なくとも1または10ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列コードされる。低ストリンジェンシー条件は、約 $0.01 \times SSC$ 緩衝剤を用い、比較して、高ストリンジェンシーは約10倍多い濃度を用いる。配列相同性は少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より更に好ましくは97.5%、最も好ましくは少なくとも99%であり得る。

【0049】

本発明の他の態様は、配列番号5または配列番号6の核酸の全てまたは一部に対する核酸アンチセンス、または配列番号5または配列番号6と少なくとも70%相同性を有し、配列番号5または配列番号6と低ストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズでき、前記のRMP1タンパク質またはポリペプチドをコードする配列に対するアンチセンスを提供する。あるいは、アンチセンスRNAはRMP1遺伝子の制御配列、特に、遺伝子の5'上流配列(プロモーター領域)に対してアンチセンスであり得る。核酸がアンチセンスである配列は、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より更に好ましくは95%、最も好ましくは少なくとも99%の相同性(同一性)を有する。

【0050】

核酸は、好ましくは少なくとも10塩基長、より好ましくは少なくとも15、よりさらに好ましくは少なくとも50塩基長である。核酸はRNAまたはDNA、センスまたはアンチセンス、およびある実施態様において、二本鎖または一本鎖であり得る。ある実施態様において、核酸(センスまたはアンチセンス)の少なくとも数個のヌクレオチド残基をヌクレアーゼ分解に耐性に作り得、これらはホスホチオエートおよび/またはメチルホスホネートのような残基から選択できる。

【0051】

前記のアンチセンス核酸は、有利には医薬として使用でき、好ましい医薬適用は、癌のようなアミノ酸調節に依存する状態の予防または治療用の医薬の製造のためである。

【0052】

したがって、本発明はまた個体に前記の核酸、好ましくはアンチセンス核酸の有効量を投与することを含む、アミノ酸調節に依存する状態を予防または処置する方法を提供する。

【0053】

本発明の他の実施態様は、(a)本発明のRMP1タンパク質またはポリペプチドをコードする少なくとも一つの核酸配列部分(b)前記のアンチセンス核酸(または、例えば、細胞におけるアンチセンスの発現が予測される場合、その相補鎖)、または(c)前記の核酸およびRMP以外のタンパク質をコードする少なくとも一つの核酸配列(またはそのホモログ)を含む。このような構築物は天然に存在しない。構築物は、ベクターとしての機能をそれらに与えるであろうDNAの必須配列を欠くが、通常“ハイブリッド”として存在する。それらはリンカーまたは制限部位として機能する核酸配列を含み得る。好ましい構築物は当業者に既知のオリゴヌクレオチド合成の方法を使用して合成する。

【0054】

また提供されるのは、前記の構築物を含むベクターである。好ましいベクターは、発現ベクター、好ましくはプラスミドまたはウイルスであるが、クローニングベクターも、所望によりプラスミドの形で提供される。

【0055】

本発明はベクターを含む宿主細胞を提供する；好ましくは、宿主細胞は本発明のRMP11タンパク質またはポリペプチドを発現する。好ましい宿主細胞は真核細胞、より好ましくは昆虫細胞または哺乳類細胞である。

【0056】

本発明の構築物、ベクターおよび形質転換宿主細胞は、アミノ酸調節に依存する状態の予防または処置用の医薬として、ならびに、医薬の製造のために、使用する。

【0057】

本発明のタンパク質またはペプチドを特異的に認識する抗体、特にホスホスペシフィック抗体が提供される。抗体を製造する方法は、当分野で既知である。RMPに特異的な抗体は、動物を免疫原性量のRMPで免疫化することにより容易に得ることができる。したがって、RMPを認識する抗体は、動物の免疫化により得られるポリクローナル抗体および抗血清の両方を含み、これはウェスタンブロットティング、ELISA、免疫染色(immunostaining)または他の当分野で既知の慣用法により確認できる。

【0058】

ウシ血清のような担体タンパク質と所望により連結した、RMPの一部も、特に、ホスホスペシフィック抗体が望まれる場合、免疫原として使用できる。タンパク質フラグメントは、ペプチド合成装置により合成し得、好ましくは8以上のアミノ酸を含む。

【0059】

ポリクローナル抗体が感作により得ることができる場合、モノクローナル抗体を、感作動物のリンパ球から得られ得るハイ振り土マにより分泌させる(Chapter 6, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)。したがって、RMPを認識するモノクローナル抗体、特にホスホスペシフィック抗体も提供される。“ホスホスペシフィック抗体”なる用語は、抗体がRMPのリンペプチドフラグメントまたはリン酸化RMPを特異的に認識するが、非リン酸化RMPまたはそのペプチドフラグメントを認識しないことを意味

する。

【0060】

本発明において、抗体はまたその活性フラグメントを含む。活性フラグメントは、抗原 - 抗体反応の活性を有する抗体のフラグメントを意味する。特に、活性フラグメントで、挙げられるのは、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ および $F v$ である。例えば、 $F(a b')_2$ は、本発明の抗体をペプシンで消化させた場合得られ、 $F a b$ はパパインで消化させた場合得られる。 $F a b'$ は、 $F(a b')_2$ を2-メルカプトエタノールのような試薬で還元し、モノヨード酢酸でアルキル化した場合、得られる。 $F v$ は重鎖の可変領域および軽鎖の可変旅行きがリンカーで接続している場合、単活性フラグメントである。キメラ抗体は、これらの活性フラグメントを保存し、これらの活性フラグメント以外のフラグメントに関して他の動物のフラグメントで置換することにより得る。特に、ヒト化抗体が想定される。

【0061】

RMPを検出する方法は、所望により、酵素反応の使用と共に、例えば、上記に言及したように抗体を使用する方法を含む。RMPを認識する抗体は、RMP抗体に特異的な二次抗体を使用して検出でき、それは所望により放射性標識、酵素、アビジンまたはビオチン、または蛍光物質(FITCまたはローダミン)で例えば標識する。

【0062】

本発明にまた包含されるのは、医薬、特に癌の予防または処置のための医薬製造のための、または医薬としての、RMPを特異的に認識する抗体の使用である。

【0063】

本発明の更なる実施態様において、RMP1、その変異体またはフラグメントと、RPB5以外の少なくとも一つの他のタンパク質を含む複合体が提供される。RMP1複合体は、好ましくは、1個以上のSkp2、STAP1(図2;配列番号1)、TIP48、TPI49およびプレフォルディンを、所望によりRPB5と共に含む。サブユニットSTAP1、TIP48、TIP49、RPB

5、RMP1は約1:1:1:1:1の比率で存在得るが、他の比率も可能である。所望により、付加的タンパク質またはポリペプチドは1:1の化学量論的比率で存在し得るが、また他の比率も可能である。

【0064】

本発明は、RMP1、その変異体またはフラグメントおよび3個以上の他のタンパク質またはポリペプチドを含む、転写制御タンパク質複合体を提供する。これらの他のタンパク質またはポリペプチドは、前記の通りであり得る。

【0065】

前記の本発明の任意の複合体において、タンパク質またはポリペプチドサブユニット成分は、各々、5から500kD、好ましくは5から300kD、より好ましくは10から200kD、より更に好ましくは10から100kDの分子量を有し得る。SDS-PAGEまたは質量分析は、分子量を確立する方法を提供する。

【0066】

前記の通りの本発明の複合体は、STAP1またはSTAP1のポリペプチドフラグメントに対して反応性の抗体を使用した免疫沈降により得られ得る。理想的に、本発明の複合体は他の細胞性不純物を実質的に含まない。したがって、単離複合体は、少なくとも80%純度、好ましくは90%純度、より好ましくは95%純度、より更に好ましくは99%純度である。純度は種々の方法、例えば、SDS-PAGEで測定できる。

【0067】

本発明の複合体を生成する別法は、それらを構造タンパク質またはポリペプチドサブユニットから凝集することであり得る。一つの方法は、各構造サブユニットの過剰発現をするように細胞を形質転換し、細胞中で複合体の凝集が起こるようにすることである。好ましい発現システムは形質転換昆虫細胞を用いる。

【0068】

他の方法は、インビトロで構造サブユニットと一緒に複合体の自己凝集に十分な条件下で混合することである。好ましくは、サブユニットの混合は実質的に同じに起こる。形質転換細胞の粒子複合体の集合、続く単離およびそれらのインビ

トロでの全複合体の自己凝集を促進する条件下での残りのサブユニットとの混合を含む、混合の多くの他の可能性が存在する。また、粒子複合体はインビトロで、混合し、次いで残りのサブユニットと混合することにより製造できる。サブユニットまたは粒子複合体のインビトロでの混合の程度は複合体を生成するために重要でないと考える。

【0069】

本発明の更なる態様において、アミノ酸調節に依存する状態の診断法が提供される。最も広い態様において、方法は

- (a) 個体からサンプルを回収する；
- (b) サンプルのRMPまたはRMP活性を測定する；そして
- (c) サンプル中のRMPまたはRMP活性の存在と、アミノ酸調節に依存する状態を相関させる

段階を含む。

【0070】

本発明の方法は、典型的に細胞または組織サンプルにおけるRMPの存在、レベル、細胞性局在化または活性の測定を含み、サンプルはしばしばヒトから得るが、本方法がウシ、ウマ、ヒツジなどの農業的に重要な哺乳類、またはネコおよびイヌのような獣医学的に興味深い他の動物から得ることができることを容易に理解できるであろう。アッセイは、体組織、生殖細胞系列組織、または癌組織のような任意の細胞または組織サンプル、ならびに胸膜液、血液、血清、血漿および尿のような体液からのサンプルで行なうことができる。

【0071】

“サンプル”は、通常、アッセイ可能な形のRMPを提供するために予備処理に付すが、必ずしも付さない、分析する材料である。これは、通常細胞抽出物の形成を必要とし、その方法は当分野で既知である(例えば、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition (Springer-Verlag, N.Y., 1987参照)。

【0072】

本発明の最も広い態様において、一貫性が維持される限り、サンプルの回収お

よび取り扱いに限定はない。サンプルを生検、外科的切除、塗抹標本等のように、当分野で既知の方法により得る。

【0073】

RMPまたはRMP活性恩臨床的サンプルにおける測定の一貫性は、種々の技術の使用により確認できる。例えば、各組織抽出物の質をコントロールするために、アルカリホスファターゼのような他の酵素活性を、内部コントロールとして使用できる。加えて、内部標準は、アッセイ条件のコントロールとしてサンプルにおけるRMPと同時に測定できる。したがって、分析段階は、サンプルにおけるコントロールタンパク質の検出、所望により、コントロールタンパク質で得たシグナルでのRPMで得た値の標準化を含む。

【0074】

サンプル中のRMPの存在は、当分野で既知の方法を使用したRMPタンパク質の検出により決定している。本発明において、RMPまたはRMP活性の測定に使用するアッセイの限定はない。例えば、RMPはRMPに特異的な抗体を使用した免疫アッセイにより検出できる。抗体は、例えば、タンパク質が酵素結合免疫アッセイにより同定したものである二次元ゲルのウェスタンブロットで、または、全細胞性タンパク質、または部分的に精製されたタンパク質のドットブロット(抗体サンドイッチ)アッセイにおいて使用できる。子の増し実施態様において、リン酸化RMPをホスホスペシフィック抗体を使用して測定する。

【0075】

サンプル濃縮およびタンパク質精製の方法は文献に記載されている(Scopes, 1987参照)。例えば、望ましい場合、細胞抽出物に存在するRMPを、硫酸アンモニウムで沈殿させるか、または抽出物を商品として入手できるタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore、限外濾過ユニットを通して濃縮できる。抽出物をアニオンまたはカチオン交換樹脂、またはゲル濾過マトリックスのような適当な精製マトリックスに適用するか、分取電気泳動に付す。このような場合において、各精製段階後に得たRMPおよびタンパク質の収量はサンプル中のRMPの量を測定する際に考慮する必要がある。しかし、これらの分離が一般に困難であり、RMPの損失をもたらす得るため、前処理していない細胞抽出

物がアッセイに好ましい。

【0076】

上記のように、一つの実施態様において、サンプル中のRMPの存在は免疫学的技術を使用して測定する。本発明のRMP、特に、RMP1の存在は、アミノ酸調節に依存する状態の診断に有用な情報を提供できる。好ましい実施態様において、RMPのリン酸化状態を、例えば、細胞抽出物または前処理細胞抽出物のようなサンプルの免疫“ドット”プロットにおけるホスホスペシフィック抗体の使用により、測定する。サンプル中のリン酸化RMPの存在は、アミノ酸調節に依存する状態の指標である。

【0077】

別の実施態様において、サンプル中のRMPのレベルを測定し、標準レベルと比較する。該標準レベルと比較したRMPレベルの減少はアミノ酸調節に依存する状態の指標である。標準レベルは状態に罹患していない第2の個体から得たサンプルにおけるRMPのレベルであり得る。状態が癌であるなら、標準レベルは同じ個体から得た非癌性組織のRMPレベル、または癌性増殖に隣接した組織から除去したサンプルにおけるRMPレベルであり得る。

【0078】

RMPの標準レベルは、アミノ酸調節に依存する状態を有するものおよびそのような状態を有していないものの二つの統計学的有意なクラスに患者の集団を分けるために選択する。本発明の一つの実施態様において、標準値はRMPを有することが既知の組織に見られるRMPのレベル、すなわち、その状態に罹患していない正常組織におけるRMPのレベルであるように選択する。

【0079】

あるいは、RMPの標準レベルを、正常個体と比較した、1個以上のアミノ酸腸背得tに調節に依存する状態のRMPレベルの統計的有意相関を得るために回収することにより決定する。

【0080】

典型的に、罹患および非罹患個体間のRMPレベルの変化は、測定の比較可能な状態下で少なくとも2、好ましくは少なくとも5、より好ましくは10倍で

ある。当業者は、感受性が低いアッセイをサンプル中のRMPのレベルの測定に選択した場合、RMPの検出可能なレベルを提供するために、使用するサンプル/抽出物の量を増やすか、上記のような慣用法を使用して抽出物を予備処理することが必要であり得ることを認識するであろう。アッセイ法は、本発明の方法において相対的値が十分であるため、望まない限りRMPの絶対的値の測定は必要ではない；しかし、RMPレベルの定量のための既知の任意の方法がこの測定に使用される。

【0081】

状態の診断のRMPレベルの予め選択した範囲は、既知の臨床的症状を有する被検体から得た同じ細胞または組織サンプルに関して確立できる。十分な測定は、比較をする値に関する統計的に有意な範囲の値を得るために成す。RMPの予め決定した範囲は、典型的に最も高い相関を確認するために試験した個体に適用した方法と同じアッセイ技術を使用して得る。標準値は、RMPを測定する特異的細胞または組織および使用する特異的アッセイにより変化し得る。一定の細胞または粗S期に関するRMPの予め決定した範囲は、非罹患個体からの値とみなされるRMPレベルの標準値の決定について使用でき、陰性診断と相関する。本発明の方法は任意の他の物質濃度を必要としないか、または、本発明のこの後者の態様において、アッセイ工程の標準レベルを確立したら、一つの測定にさえ依存できる。一つの測定を信頼する場合、アッセイは好ましくはRMPレベルを測定する条件下で行なう。

【0082】

(例えば、そして限定する意図はないが、非希釈サンプルで検出できず、長時間インキュベートしたサンプルでのみ検出可能な活性であるなど)標準値と比較して測定された低いレベルのRMP(またはRMP無し)は、アミノ酸調節に依存する状態指標であり、医師が適切な治療をしなければならないことを示す。標準レベルと同等のまたは高いRMPレベルは、良好な診断の指標である。

【0083】

当業者は、細胞抽出物の使用がほとんどの目的で好ましいが、そのままの細胞を用いることができるように方法を修飾できることも認識するであろう。この実

施態様において、そのままの細胞をRMPに特異的な抗体で処理し、例えば、当分野で既知の免疫組織化学技術を使用してRMPの局在化を可視化する(Van Leuwen, 1998, Genomics 54:511-520)。あるいは、細胞性局在化を、例えば、スクロース勾配上の細胞性成分の分画後に、核抽出物および細胞質抽出物から得たサンプルを分析することにより測定できる。理論に縛れることを望まないが、本発明者らはRMPが、アミノ酸生合成を担う遺伝子の発現を阻害し得る場所である、正常組織の核に局在していると考え。逆に、罹患個体からの罹患組織において、RMPは核から放出され、アミノ酸合成の抑制を上げ、該状態と共に細胞質に移ると考える。好ましい実施態様において、RMP局在化はホスホスペシフィック抗体で可視化する。

【0084】

更なる実施態様において、RMP活性を測定する。好ましい実施態様において、RMP活性はアミノ酸生合成をもたらす少なくとも一つの遺伝子の発現(または抑制の除去)の指標である。

【0085】

好ましい形式において、アミノ酸生合成に関与するタンパク質をコードする種々の遺伝子配列を含むDNAチップアレイを設計する。これらの遺伝子配列は種々のデータベース(例えば、Genebank, NCBI)から容易に得ることができる。個体からのRNAサンプルを試験し、アミノ酸生合成遺伝子が、本質的に上記の技術を使用して測定した標準値と比較して上方制御されているかどうかを測定する。コントロール値またはコントロールサンプルと比較して、特異的なRNA、特に、アミノ酸生合成に関与するタンパク質をコードするものの高いレベルを示すサンプルはアミノ酸調節に感受性の状態の指標である。したがって、この実施態様において、RMP活性はアミノ酸生合成に関与する遺伝子の発現を抑制する能力と同等と考える。この実施態様において、当分野で既知の、またはまだ開発されていないRNA調製の任意の方法を用い得るが、サンプル間のRNAの質を維持する、例えば、分解を最少にする注意をするべきである。

【0086】

どの診断法を使用するかに関係なく、アミノ酸調節に依存する状態は、慢性腎

臓、心臓、肝臓または肺疾患のような慢性病、白血病、膀胱癌、神経芽細胞腫、胃癌、前立腺癌、乳癌、大腸癌、腎臓癌、卵巣癌、肝臓癌および肺癌のような癌(但し、RMPの存在のみが測定されたときは癌はホジキン病ではない)、またはAIDSにおけるような免疫不全、神経変性、筋肉低下、血管形成、糖尿病、細胞加齢、またはダイエット状態を含む。また包含されるのは、ラパマイシン処置に感受性の状態である。

【0087】

本発明の診断法は、医師が適当な治療を施すことを可能にする。RMPのこれらのアッセイを含む、あるアナライトのアッセイは、付加的情報の非存在下で主治医により得られるか、解釈されることは予期されない。RMPを試験する方法は、状態に関してより有用な情報を提供するが、本方法と組み合わせて付加的情報を提供し得る試験を使用し得る。更に、任意のアッセイの結果は、絶対的な証明よりむしろ臨床的状态の存在の可能性の指標として最もよく考慮される。同じ状況が本発明に関して存在する。それにもかかわらず、診断の指標は臨床的に有用な情報であり、情報が利用可能でない場合に可能であるよりも、より銃砲に基づく方法で患者を処置するための他の情報と組合せて、医学専門家が使用できる。特に、医師はRMPを定量する更なる診断試験が、治療の効果を追跡するために定期的に必要であるかを決定できる。

【0088】

RMPリン酸化におけるラパマイシンの効果は、更に、本発明の診断法が個体がラパマイシンに感受性であるか否かを決定するために使用できることを示唆する。癌に罹患している多くの個体はラパマイシンに応答せず、特定の治療に患者が応答するかしないかを選択するための医師の能力は特に有用である。したがって、本発明の更なる態様において、本明細書に記載の任意の診断法を使用して、ラパマイシン、またはIGFまたはTPR経路に依存する任意の他の薬剤で処置するための、アミノ酸調節に依存する状態の処置のために個体を選択する方法が提供される。

【0089】

本発明はまた本発明の方法を実施するためのキットを提供する。このようなキ

ットは容易に入手可能な物質から製造でき、種々の実施態様がある。例えば、このようなキットは以下の物質の1個以上を含む；RMPを認識する抗体、好ましくはホスホスペシフィック抗体、フィルターまたは他の半多孔性支持体のようなサンプルを回収する手段、反応試験管、緩衝液(例えば、細胞融解緩衝液またはアッセイ緩衝液)、二次抗体、RMP特異的抗体を検出する手段、酵素基質、コントロール試薬、オリゴヌクレオチドおよび指示書。広範囲の種々のキットおよび成分を本発明により製造でき、キットの考えられる使用者および使用者の特定の要求に依存する。

【0090】

明確化のために、本発明のスクリーニング法(およびある場合、サンプルに依存して診断法)は、RMP1または、当分野で既知のNNX3またはRMOのような任意の変異機能的フラグメントまたはホモログを使用(または検出)できる。したがって、内容から明らかでない限り、RMPまたはRMP1に関する言及は、RMP1の両方の変異体およびそのフラグメントを含むが、典型的にRMP、RMP1またはNNX3が好ましい。好ましくは、図3に明示のRMP1をスクリーニング法で使用するか、それが診断法で検出される。

【0091】

したがって、他の態様において、本発明は、本発明のRMP1タンパク質またはポリペプチドへの試験化合物の結合を測定することを含み、所望によりまたRMP1タンパク質またはポリペプチドへのコントロール化合物の結合の測定も含む、抗癌化合物の同定法を提供する。

【0092】

また提供されるのは：

- (a) RMPを含む細胞抽出物を、RMP分解の調節剤の可能性のあるものを含む反応混合物中でインキュベートする、
- (b) 該RMPまたはリン酸化RMPの量、所望によりまたコントロールタンパク質の量を測定する；そして
- (c) RMP分解の調節剤(すなわち、アミノ酸調節に依存する状態に対して有効な薬剤)の存在と反応混合物におけるRMPまたはRMPリン酸化のレベルの変

化を、該候補調節剤が反応混合物に存在しない場合に関連して相関させる：
段階を含む、アミノ酸調節に依存する状態、特に癌に対して有効な薬剤のスクリーニング法である。

【0093】

本質において、細胞抽出物を製造するおよび診断法においてRMPを測定する上記の技術は、本発明のスクリーニング法に適用できる。例えば、検出段階はRMPと抗体、好ましくはホスホスペシフィック抗体とのインキュベートを含む。RMP分解、リン酸化、細胞レベル、局在化およびRMP活性における化合物の影響は、有効な薬剤のスクリーニングにおいて決定できる。同様に、コントロールタンパク質を使用してRMP検出のために得た値を標準化できる。

【0094】

本方法は、例えば、レベルの変化は非リン酸化RMPレベルの維持であるRMP抑制剤、またはレベルの変化がRMPリン酸化の上昇または全体的RMPレベルの減少であるRMP活性剤の同定に適用できる。

【0095】

本発明によりまた提供されるのは、RMPのRBP5への結合を試験化合物の存在下で測定し、所望よりまた試験化合物の非存在下での結合を測定することを含む、アミノ酸調節に依存する状態、特に癌に対して有効な薬剤の同定法である。RMPは好ましくは配列番号4に明示の通りである。

【0096】

好ましい方法は固相アッセイであり、最も好ましい実施態様において、RMP1タンパク質、そのフラグメントまたは変異体を支持体上に固定化する。リガンド結合アッセイに最も好ましい支持体は、ニッケルまたはニッケル被覆、例えばニッケル被覆マイクロタイタープレートであり、固体表面へのHIS6標識RMP1の容易な接着を可能にする。本来、接着の他の手段を容易に適用できる。免疫アッセイのために、ニトロセルロースのようなタンパク質を結合するフィルターまたは他の適当なプロット材料が最も好ましい。

【0097】

タンパク質および/またはその結合パートナー(例えば抗体)を、例えば、蛍光

標識、ビオチン、金属ゾル粒子または放射標識で標識し得る。好ましい実施態様において、標識はユーロピウムである。

【0098】

他の態様において、本発明は、前記の通りの一定量の複合体と試験化合物を接触させ、1個以上の：(a)そのまま残る複合体の量、(b)損失したそのままの複合体の量、または(c)複合体から放出された遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニットの量を測定することを含む、抗癌剤の同定法を提供する。

【0099】

複合体の量は、複合体の1個以上の活性、好ましくは、酵素のおよび/またはリガンド結合活性の測定により決定し得る。リガンド結合を測定する場合、リガンドは核酸またはタンパク質から選択され得、好ましくはタンパク質結合活性は腫瘍遺伝子生成物である。例えばc - M y cまたはS k p 2結合活性、ベータ - カテニン結合活性、H b x結合アッセイまたはRNAポリメラーゼII結合アッセイ。酵素活性を測定する場合、それはA T P a s e活性、および/またはDNAヘリカーゼ活性であり得る。

【0100】

複合体から損失した遊離タンパク質またはポリペプチドの量を測定する方法において、遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニットは1個以上のR B P 5、R M P 1、T I P 4 8、T I P 4 9または前記の通りのS T A P 1タンパク質またはポリペプチドであり得る。遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニット量は、酵素のおよび/またはリガンド結合活性の測定により決定し得る。リガンド結合アッセイの場合、リガンドは核酸またはタンパク質から選択され得、好ましくはタンパク質結合活性は、腫瘍遺伝子生成物、例えばc - M y cまたはS k p 2結合活性、ベータ - カテニン結合活性、H b x結合アッセイまたはRNAポリメラーゼII結合であり得る。酵素活性を測定する場合、それはA T P a s e活性、および/またはDNAヘリカーゼ活性であり得る。

【0101】

抗癌剤スクリーニングの全ての方法において、試験化合物と接触させる前に、そのタンパク質サブユニット成分からの複合体の形成の更なる段階が存在し得る

。

【0102】

本発明の他の態様は、スクリーニングの方法、好ましくは、前記の任意の方法における、RMP1の使用である。本発明のこの態様に関連するのは、前記の複合体のインビトロ凝集のための1個以上のRMP1の使用である。

【0103】

下記の実施例で証明するように、IGFおよびTOR経路はRMPに収束するように見え、RMPを多くの可能性のある治療剤の標的とする。本発明は、本明細書に記載の任意のスクリーニング法の実施による、アミノ酸合成により調節される状態に対して有効な薬剤、特に抗癌剤の同定を可能にする。

【0104】

本発明はラパマイシン以外の本方法の実施により同定される全ての薬剤、および医薬としての、特に、癌および他のアミノ酸生合成により調節される状態の予防または処置のための医薬としての使用を含む。

【0105】

したがって、更なる態様において、本発明は医薬としての、本発明のスクリーニング法により同定された薬剤(ラパマイシン以外)の使用を提供する。

【0106】

本発明は更にアミノ酸調節に依存する状態の予防または処置のための医薬の製造のための、本発明のスクリーニング法により同定された薬剤を低kyうするが、但し、薬剤は癌または免疫学的不全の処置に使用するためのラパマイシンではない。

【0107】

本発明は、個体に上記の構築物、ベクター、宿主細胞または抗体の有効量を投与することを含む、アミノ酸調節に依存する状態を予防または処置する方法を提供する。

【0108】

本発明はまた個体に、上記の本発明のスクリーニング法により同定された、癌または免疫学的不全の処置に使用するためのラパマイシン以外の調節剤の有効量

を投与することを含む、アミノ酸調節に依存する状態を予防または処置する方法を提供する。

【0109】

本明細書でアミノ酸調節に依存する状態に関して言及している場所でこれらの状態はRMPに依存する臨床的状态の一つのセットを例示するとみなすべきである。したがって、本発明の診断法はRMPに依存する任意の状態の診断に使用できる。同様に、本発明は、ラパマイシン以外の、RMPに依存する状態に対して活性な薬剤のスクリーニング法、本方法により同定された薬剤、ならびにRMPに依存する状態のためのこれらの薬剤の使用を提供する。

【0110】

本発明によりまた提供されるのは、恐らく当業者に既知の適当な賦形剤の存在下である、医薬組成物中の上記の薬剤である。組成物は、組成物は、下記に詳述の任意の適当な組成物の形で、当業者の知識の範囲内の投与の適当な方法により投与し得る。投与の好ましい経路は非経腸である。非経腸投与において、本発明の組成物は、薬学的に許容される賦形剤と共に、溶液、懸濁液またはエマルジョンのような単位投与注射可能形に製剤される。このような賦形剤は本質的に非毒性および非治療剤である。このような賦形剤の例は生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液およびハックス溶液である。不揮発性油およびオレイン酸エチルのような非水性賦形剤も使用し得る。好ましい賦形剤は5%デキストロースの生理食塩水液である。賦形剤は、緩衝剤および防腐剤を含む、等張性および化学安定性を促進する物質のような少量の添加剤を含み得る。

【0111】

タンパク質は異種移植片拒絶反応、GVHD、アレルギーおよび自己免疫疾患の予防に治療的に有効な濃度で投与する。投与量および投与の形態は個体に依存する。一般に、組成物は機能的タンパク質が1pg/kgから10mg/kg、より好ましくは10μg/kgおよび5mg/kg、最も好ましくは0.1mg/kgおよび2mg/kgの間で提供されるように投与する。好ましくは1回注射投与(bolus dose)として投与する。連続的単時間輸液(30分間)も使用し得る。本発明の組成物は、5および20μg/kg/分、より好ましくは7および15μg/kg/分の間で注入し得

る。

【0112】

特異的例にしたがい、必要な組成物の“治療的有効量”は、処置を必要とする患者後流に十分な量、または少なくとも疾患およびその合併症を部分的に抑制する量として決定すべきである。このような使用に有効な量は疾患の重症度および患者の健康の一般的状態に依存する。一回または複数回投与が、患者に必要なおよび耐容性される投与量および頻度に依存して必要であり得る。

【0113】

本発明の好ましい実施態様を実施例の方法でここに記載し、それは簡便には図面を参照する：

図1はSTAP1の核酸配列(配列番号2)を示す。

図2はSTAP1の誘導されるアミノ酸配列(配列番号1)を示す。

図3は先に公開された配列と提携した、RMP1の他のヌクレオチド配列(“新”配列番号4)を示す。

図4はRMP1の最初の25アミノ酸をコードするヌクレオチド配列(配列番号5)を示す。およびRMP1をコードするヌクレオチド配列(配列番号6)。

【0114】

実施例1 - 細胞のSkp2およびH-Ras^(G12V)トランスフェクションは、それらを形質転換する。

Skp2はH-Ras^(G12V)と協同し、軟観点におけるコロニー形成で採点して一次齧歯類線維芽細胞の細胞形質転換、およびヌードマウスにおける腫瘍形質転換をもたらす。このような形質転換体は、正常線維芽細胞またはE1A/H-Ras^{G12V}-形質転換誘導体よりも有意に低いレベルのp27を発現する。

【0115】

候補腫瘍遺伝子の機能的特性の感受性アッセイは、これらの遺伝子単独で、または組み合わせてトランスフェクトできる胚細胞培養の使用に由来する。ラット胚線維芽細胞に挿入したとき、E1AまたはR2F1のような腫瘍遺伝子は、Gly¹²がValに変えられた(G12V)H-Rasの腫瘍形成バージョンのよう、共挿入された、協力する腫瘍細胞の存在下でのみそれらを形質転換できる

。Skp2およびH-Ras^{G12V}をコードする哺乳類発現プラスミドを単独でまたは組み合わせて、一次ラット胚線維芽細胞にトランスフェクトした。3週間のG418における選択の後、プレートを形態学的に形質転換されたコロニーに関して採点する。H-Ras^{G12V}の非存在下で、Skp2単独は形態学的に形質転換された増殖巣の発生に失敗した。対照的に、Skp2遺伝子と一緒にH-Ras^{G12V}は、実質的に増加した数の形態学的に形質転換されたコロニーを発生させ、プレート当たり平均70-110コロニーを発生させた。Skp2とH-Ras^{G12V}のトランスフェクションにより製造したコロニーは、容易に確立され、培養で急速に増殖する細胞系を発生させた。これらのSkp2/H-Ras^{G12V}-発現細胞は、半固体培地(0.3%寒天含有新鮮培地)で平板培養した。2週間後、プレートをコロニーの存在に関して分析した。Skp2/H-Ras^{G12V}-発現細胞は軟寒天で容易にコロニーを形成し、それは培養細胞形質転換の強い基準であった。加えて、 1×10^6 Skp2/H-Ras^{G12V}発現細胞を、2-3週齢ヌードマウスの脇腹に注射した。マウスを、注射部位の腫瘍の存在に関して採点した。それから2週間後、腫瘍形成が、Skp2/H-Ras^{G12V}発現細胞を注射した全ての実験動物で検出されたが、コントロールREFではなかった。共トランスフェクション実験の結果は、Skp2が腫瘍遺伝子として働くことができることを示す。

【0116】

実施例2 - 細胞の免疫組織化学的分析は、腫瘍細胞におけるSkp2とp27の間の有意な逆関係を示す。

Skp2発現を、ヒト一次口腔扁平上皮癌細胞癌、乳癌、リンパ腫および前立腺癌のシリーズで分析した。一般に、5マイクロメートルの厚さのホルマリン固定およびパラフィン包埋組織セクションを、p27に対するモノクローナル抗体およびSkp2に対するポリクローナル抗体を使用して免疫組織化学的にp27およびSkp2タンパク質に関して染色した。

【0117】

p27に対するモノクローナル抗体はTransduction Laboratories1から入手可能である。Skp2に対するポリクローナル抗体は、適当に精製したSkp2町

生物で動物を免疫化することにより、平均的当業者により容易に生成される。ポリクローナル抗体は、ポリクローナル抗体は、更に、Lisztwaig J et al (1998) EMBO J 17:368-363に記載のように親和性精製できる。

【0118】

結果は、p27およびSkp2の発現が、試験した全ての癌に反比例することを示す。これは、Skp2が最も腫瘍遺伝子として機能しそうであることを確認する。

【0119】

これらの結果は、ヒト癌の進行におけるSCFユビキチンタンパク質リガーゼ複合体の基質認識サブユニットが関係しているとみなす。

【0120】

実施例3 - Skp2関連タンパク質(STAP1)をコードするcDNAの単離およびクローニング。

酵母2ハイブリッドスクリーニングを、ベイトとしてSkp2を使用して行なった。これから、約18kDaのタンパク質をコードするcDNAがクローン化され、それはここで我々はSTAP1(Skp2関連タンパク質1)と呼ぶ。STAP1タンパク質は現在まで未知である。

【0121】

約 1×10^6 クローンをpGAD-GH(Clontech)において構築されたHeLa細胞ライブラリーからスクリーニングし、それはGAL4 DNA結合ドメインベクターはS2-1にクローン化されたヒトSkp2の残基101-423をコードするベイトである。相互作用クローンは、トリプルドロップアウト媒体(Leu/Trp/Hisがなく25mM 3-アミノ-トリアゾールを伴う)での選択後に同定され、強いガラクトシダーゼ活性に関してアッセイした。35陽性クローンを配列決定した。配列比較は、全てのクローン化cDNAは、約18kDの分子量を有する、新規タンパク質STAP1をコードすることを明らかにした。

【0122】

実施例4 - 組換えSTAP1の製造。

ヒトSTAP1完全長バージョンを、Eshcherichia coli BL21において、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として発現させ、グルタチオン-セファロースで精製し、グルタチオンで溶出した。方法は、Kaelin et al (1991) Cell. 64:521-532およびまたKrek et al (1994) Cell. 78:161-172に記載されている。

【0123】

実施例5 - STAP1に対して反応性の抗体の製造。

上記実施例4からの溶出STAP1物質をマウスに注射し、モノクローナル抗体を生成した。慣用のモノクローナル抗体製造プロトコールは当業者に既知のように行なった。ポSTAP1に対するリクローナル抗血清および抗体もまた当業者に良く知られた標準形のプロトコールにしたがった、上記実施例4のSTAP1溶出物質のウサギへの注射により生成した。

【0124】

実施例6 - HeLa細胞からのSTAP1含有複合体の免疫沈降および電気泳動的分離。

大規模免疫沈降を、HeLa全細胞抽出物で行なった。100 µgのプロテインAに結合したモノクローナル抗-STAP1抗体を、50mlのHeLa核抽出物(約2から10⁹)に添加し、2時間、4で回転させた。免疫沈降物を次いで25mlのTNN[20mM トリス-HCl(pH8.0)、0.1M NaCl、1mM EDTA、0.5% NP-40]で4回洗浄した。沈殿タンパク質を300 µlの0.2Mグリシン(pH2.5)でLaemlli緩衝液に輸出し、10%SDSポリアクリルアミドゲルで分離した。ゲルを次いで銀で染色した。

【0125】

実施例7 - 質量分析によるSTAP1関連タンパク質の分析。

SDS-PAGE分離タンパク質を、Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Anal. Chem., 68:850-858に記載のように、実施例6のゲルから切除し、DTTで還元し、ヨードアセトアミドでアルキル化し、トリプシンで開裂した。切除したトリプティックペプチドを5%ギ酸、5%メタノールのH₂O溶液で、1 µl Poros P20カラムで脱塩し、1 µlに5%ギ酸、50%メタ

ノールのH₂O溶液と共に、直接ナノエレクトロスプレーイオン化(NanoESI)針中に濃縮する。NanoESI質量分析(MS)は、Wilm, M. and Mann, M. (1996) Anal. Chem., 68:1-8の公開されている方法にしたがって行なった。マススペクトルは、NanoESI源(Protana, Odense, Denmark)を備えたAPI 300マススペクトロメーター(PE Sciex, Toronto, Ontario, Canada)に獲得した。またW. R. Pearson & D. J. Lipman (1998) PNAS, 85:2444-2448参照。

【0126】

STAP1含有複合体は、多数の、約20程度のタンパク質を含むことが判明している。STAP1のみならず、複合体はまたTIP48、TIP49(二つの進化的に保存されたATPaseおよびDNAヘリカーゼ)、RPB5(RNA pol IIサブユニット5)、RMP1(RNA pol IIメディエータータンパク質)および少なくとも3個の他の現在未知のタンパク質を含むことが判明している。

【0127】

実施例8 - スクロース密度勾配遠心およびウェスタン・プロテイングによるSTAP含有複合体の分析。

粗HeLa細胞抽出物を5-30%および10-30%(w/v)密度遠心に付した。サンプルを、10mMトリス(pH7.5)、250mM NaCl、0.5%NP40、1mM DTT、バナジウム酸ナトリウム、PMSFおよびアプロチニンから成るTNN緩衝液に充填した。緩衝液はまたスクリース勾配でも使用したが、NP40は除いた。

【0128】

フラクションの各々をサンプル緩衝液と混合し、標準Laemlli変性SDS-PAGEで12%で付した。多数のゲルを流し、ついで各々を抗体とプロットした。RMP1およびTIP49に対するポリクローナルを、RPB5、TIP48、STAP1およびSkp2に対するモノクローナルのように使用した。プロットしたゲルのレーンをその各々のシュクロースフラクションで配置し、明らかになるのは、STAP1含有複合体の成分が明らかに互いに会合し、勾配におけるタンパク質の主ピークの部分ではないことである。複合体の成分は、全て、高

分子量タンパク質沈殿物の早い溶出フラクションに全て見られる。Skp2はSTAP1含有複合体と比較して勾配において異なるパターンを有し、タンパク質の主ピークの直前にピークである。

【0129】

また最初に記載されたのは、どのようにTIP49抗体がSDS-PAGE上でのダブレットを認識するかである。わずかに高い分子量の免疫学的に関連したTIP49変異体がある。

【0130】

実施例9 - STAP1関連DNAヘリカーゼ複合体の阻害剤である、抗癌剤のスクリーニング。

STAP1含有TIP49、TIP48、RPB5、RMP1、STAP1およびSkp2の成分の間の特異的相互作用を破壊する小分子化合物が、例えば、抗癌剤と推定される。複合体の成分タンパク質は、組換えバキュロウイルスを使用してSf9昆虫細胞に発現する。複合体のサブユニットの間のペアを成す相互作用の全ての可能な組合せを構築し、合成および天然化合物のスクリーニングに使用する。実際には、昆虫細胞の共感染、続く適当な抗体での免疫沈降は、スクリーニングアッセイに使用する複合体基質を提供する。上記の成分の二つの間の共免疫沈降は、直接相互作用を示し、したがって、推定される抗癌剤による相互作用の破壊の標的である。例えば、STAP1およびSkp2は、このシステムで共発現されたときに共免疫沈降し、何らかの方法でその結合を破壊する号し得または天然化合物のスクリーニングアッセイの基盤として適当な結合対を提供する。小分子化合物をスクリーニングするために、組換えヘキサヒスチジン-標識STAP1を昆虫細胞から精製し、ニッケル被覆96ウェルプレートの表面に固定する。固定化STAP1を精製ビオチニル化Skp2とインキュベートし、洗浄する。続いて、ユーロピウム標識ストレプトアビジンを添加する。ついで、ユーロピウムの時間分解蛍光を合成化学ライブラリーおよび天然生成物の非存在下または存在下で追跡する。

【0131】

実施例10 - TIP48および/またはTIP49 ATPase活性の阻

害剤である抗癌剤のスクリーニング。

組換えTIP48およびTIP49を、Makino Y et al (1999) J Biol. Chem. 274:15329-15335に記載の実験法を使用して、E. coliに発現させる。組換えTIP48およびTIP49の精製、ならびにATPase活性およびDNAヘリカーゼ活性のアッセイは、またMakino Y et al (1999)に記載されている。精製組換えタンパク質を使用して、TIP48および/またはTIP49の正常酵素活性を干渉する天然生成物または合成化合物をスクリーニングする。

【0132】

スクリーニングアッセイは、簡便にはマイクロタイタープレートで行なう。TIP48および/またはTIP49タンパク質をウェルに入れ、一方または両方の酵素アッセイを天然または合成化学ライブラリー由来の化合物の存在下または非存在下で行なう。有利には、ATPaseマイクロアッセイ形式を、Henkel R D et al (1988) Anal. Biochem. 169:312-318に記載のように使用できる。

【0133】

実施例11 - ヒトRMP1におけるラパマイシン感受性シグナル伝達

ヒト胚腎臓(HEK293)細胞をDMEM+10%FCSで増殖させる。指数的に増殖するHEK293細胞を一晩血清から離し、ついで20nMラパマイシンの存在下または非存在下で50nMインシュリンで誘導する。タンパク質抽出物をインシュリン誘導後0時間、1時間、2時間、4時間および8時間後に回収した細胞から調製した。細胞抽出物をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に付し、得られたゲルをウサギポリクローナル抗ヒトRMP抗体を使用した免疫プロットにより分析した。RMPに特異的な抗体は、標準実験室法を使用して容易に調製できる。標識したウサギ抗体に特異的な二次抗体を使用して慣用法を使用して免疫プロット上にRMPを可視化した。

【0134】

RMPからの遅い移動が1時間誘導後にインシュリンにより誘導され、それは実験の8時間にわたり維持され、速く移動する形の損失/消失およびゆっくり移動する形の徐々の損失を伴った。20nMラパマイシン存在下で、この遅く移動する形の形成は完全に遮断され、速く移動する形が実験中維持された。

【0135】

これらの発見は、インシュリンシグナル伝達経路およびTPR/S6キナーゼ経路の新規基質としてのRMP1を示唆する。RMPシグナル伝達のラパマイシン感受性は、TORまたはS6キナーゼがRMP1の新規インシュリン誘導形の形成をコントロールする良好なキナーゼ候補物であることを示唆する。インシュリンおよびアミノ酸の存在下で(この実施例の培養培地中)、RMPは遅く移動する形として存在し、リン酸形を示す。これらの条件下で、細胞はアミノ酸を合成し続ける。ラパマイシンの添加により、RMPは速く移動する形として存在し、アミノ酸の合成を遮断する。

【0136】

本明細書および2000年5月12日出願の優先権主張出願GB0011439.7に記載の全ての引用文献は、個々に言及したのと同程度に出典明示により本明細書に包含させる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 STAP1の核酸配列(配列番号2)を示す。

【図2】 STAP1の誘導されるアミノ酸配列(配列番号1)を示す。

【図3】 先に公開された配列と提携した、RMP1の他のヌクレオチド配列(“新”配列番号4)を示す。

【図4】 RMP1の最初の25アミノ酸をコードするヌクレオチド配列(配列番号5)を示す。およびRMP1をコードするヌクレオチド配列(配列番号6)。

【图1】

Fig. 1**□1: AF083242 . Homo sapiens HSPC024-iso...[gi:5106778] Protein, Related Sequences**

LOCUS AF083242 726 bp mRNA PRI 21-JUN-1999
DEFINITION Homo sapiens HSPC024-iso mRNA, complete cds.
ACCESSION AF083242
VERSION AF083242.1 GI:5106778
KEYWORDS FLI_CDNA.
SOURCE human.
ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 726)
AUTHORS Zhou,J., Ye,M., Fu,G., Zhang,Q., Shen,Y., Huang,Q., Xu,S., He,K.,
 Chen,S., Mao,M. and Chen,Z.
TITLE Human HSPC024-iso gene, complete cds
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 726)
AUTHORS Zhou,J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-AUG-1998) Shanghai Second Medical University, Rui-Jin
 Hospital, Shanghai Institute of Hematology, 197, Rui-Jin Road II,
 Shanghai, P. R. China, 200025

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..726
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /cell_type="CD34+"

CDS 156..665
 /codon_start=1
 /product="HSPC024-iso"
 /protein_id="AAD39840.1"
 /db_xref="GI:5106779"
 /translation= "MVFPLPTQEPIMATPPKRRAVEATGEKVLRYETFISDVLQRDL
 RKVLDHRDKVYEQ LAKYLQLRNVIERLQEAHSELYMQVDLGCNFFVDTVVPDTSRIY
 VALGYGFFLELT LAEALKFIDRKSSLLTELSNSLTKDSMNIKAHIHMLLEGLRELQGL
 QNFPEKPHH"

【図1-1】

Fig. 1 (cont.)

BASE COUNT 193 a 186 c 198 g 149 t
ORIGIN

```

1 ggaggtaaag gccgcgcttg ggtgtccctg ggtggtcggg tccccgagtt gggaggggcg
61 gaaggctgaa cctccagett gagccggaca agccgattcc cagcgttgag agggtagaga
121 tgaactgtgt gtgaggccaa actggatcgg tcaacatggt cttccccctc cccactcccc
181 aggagcccat catggcgacg ccccctaagc ggcgggcggg ggaggccacg ggggagaaaag
241 tgctgcgcta cgagaccttc atcagtgcg tgctgcagcg ggacttgcga aagggtgctgg
301 accatcgaga caaggtatat gagcagctgg ccaaatacct tcaactgaga aatgtcattg
361 agcgactcca ggaagctaag cactcggagt tatatatgca ggtggatttg ggctgtaact
421 tcttcggtga cacagtggtc ccagatactt cacgcactca tgtggccctg ggatatggtt
481 ttttcctgga gttgacctg gcagaagctc tcaagttcat tgatcgtaa agctctctcc
541 tcacagagct cagcaacagc ctcaccaagg actccatgaa tatcaaagcc catatccaca
601 tgttgctaga ggggcttaga gaactacaag gctgcagaa tttcccagag aagcctcacc
661 attgacttet tcccccatc ctcagacatt aaagagcctg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
721 aaaaaa

```

Program: blastp
Database: nrcrc
Number: 5083
e-mail:
Format: plain_text
Sequence:
MATPPKRRAVEATGEKVLRYETTFISDVLQDRLRKVLDHRDKVYEQLAKYLQLRNVIERLQEAKHSELYMQV
DLGCNFFVD
TVVPDTSRIYVALGYGFFLELTAEALKFIDRKSSLLTELSNLSLTKDSMNIKAHIHMLLEGLRELQGLQNF
PEKPHH

Fig. 2

【 図 4 】

Fig. 4**RMP1 cDNA sequence**

CTGGCTGGGCCCGCACCGGAGAGGCCGTCTCGGTACCTGGCAGGCGGCCCTGCTACTCGGAGCCCGCTGGGGGGCGGGCGG
 GCGGGGACATGCACGTGTGAGATGCGGCAGCGGGCGGGCGGACCGGAACAGCAGCGGCGGGCGGGCGGGCGGCTCCTG
 GGGCGGGCGCGCGGTGCCCTGAGGGCGGGCGGGCGGCTGGGCAACTGCCGGCCGCGCCGCTGCGCAGGGCGTGGT
 TCAGGACTCACACGCCGCGCTGAGGCCCGGGCCCGTTCATGGAGGCGCCACCCTGGAGACGCCCCCGACCCTCGCC
 CCTTCGGCCCCGGCCCTGCCCTGGTTCCGTTGCGCGCCCCGGATGTGGCGGGCTGCCGAGGAGCAGAAAAGGTGG
 TCACTAACTGCCAAGAGAGAATCCAGCATTGGAAGAAGGTAGATAATGACTATAATGCCCTTCGAGAAAGACTCAGCACC
 TTGCCTGATAAATGTCTTATAATATAATGGTACCATTGGCCCTTTTGCCTTCATGCCAGGAAAACCTGTCCATACTAA
 TGAAGTCACTGTTTTACTGGGGGACAACTGGTTTGCAAGTGCTCAGCAAGCAGGCTGTAGGTTTGTAGTGGACCCGGA
 AAGAACATGTAAGAAAACAATAGATGACTTAAAAAAGTGATGAAAAATTTTGAATCCAGAGTTGAATTCACAGAAGAT
 TTGCAGAAAATGAGCGATGCTGCAGGTGATAATTGTTGACATACGAGAAGAAATTAATGTGACTTCGAATTTAAAGCAA
 ACACCGAATTGCTCATAAACCGCATTCCAACCAAAAACCTTCAGATATTTTGAAGCAGATATTGCAAAATGATGTGAAT
 CCAAGGATTTGCTAGCTGATAAAGAACTGTGGGCTCGACTTGAAGAACTAGAGAGACAGGAAGAATTGCTGGGTGAACCT
 GATAGTAAGCCTGATACTGTGATTGCAAAATGGAGAAGATACGACATCTTCTGAGAGGAAAAGGAAGATCGTAACACAAA
 TGTGAATGCCATGCATCAAGTAACAGACTCTCATACTCCTTGTGATAAGGATGTTCAAGTTCAGAACCATTCAAGTGGTC
 AAGTGAATAGTCAGTTGAAGTGTTCAGTGAATGGTTCAGTTCCTACCACAGTATGATGATGATGATGATGATGATGACGAC
 GACGACGACAACTTACGACGATGATGGTGATAACGACCATGAGGCTTAGGGGTTGGAGATAATCTATAACCAACAAT
 ATATTTTTCACATACTGTTGAGCCTAAGAGGGTCCGAATAAATACTGGAAAGAATACCCTTTAAAATTCAGTGAAGA
 AAGAAGAAGCCAAACGTAACGAAAGAACAGCACTGGCAGTGGCCACTCTGCCAGGAGCTGCCACCATCAGGACGCCCT
 GCAGACATTTACAGAGCCTTTGTTGATGTTGTGAATGGAGAATATGTCCCTCGCAAATCCATCTTGAAGTCTCGAAGTAG
 AGAGAATAGTGTGTGTAGCGACACTAGTGAAGCAGTGTCTGAATTTGATGATGGGCGGGGAGTTTTGAGGAGTATCA
 GCTCGAAGAAGCCACTTGCAGTGACACCAGTGAGAGCATTTTGGAAGAGGAACCACAAGAAAATCAAAGAACCTTTTG
 CCCTTATCAGTAACACCTGAGGCTTTTCTGGAAGTGTATAGAAAAGAATTTGTATCACCTTCTTAAACACCACCCCC
 AGCCATTGCTCATCCCGCACTACCCACTATTCCAGAACGAAAGGAAGTCTGTTGGAAGCATCTGAAGAACCTGAAAGA
 GGGTTTCAAAGTTTAAAGCTGCCAGATTGCAACAGAAAGACTAGGCCCTGTCTAGGAAATGGGAATTTACATCCTAAAC
 CTAGTTGTTCAATTTGTTTAGAGTATCTATAGCAAAATAGGTTACATGTAGTTTGAATAAGGTATCCTGAGTTACTTTGG
 CAACAAGTCTTTTACCCCTTACCCGTTGTTTGAAAAAATCAAGGTAACCTGTCTGAATACTTTAATATCAGCTTGT
 TGTGAATCTCTGAATACTGTCAACACTCTTATCTAAGTTTGCCTTTATGATGCAGTGGCAGCATTGTAATTACTTTTC
 AAAGAATACTGTTCAATATGCATGTTTTTGTGTTTTCAAATAAATACAGGCAGTTTTGTGCCAGCTGTGATATTGTGCAT
 ACCATATGGACCATTTTAAAGAAAATTTAAAATTTCAAATAGATTCAACAATTACATTACTTGCCTTTCACATTTTAAAG
 GCACTTTAAAAAATCTACTTCTCTGTAGGTTTTGCGGCTAGTTGGCTATTCAAGAAACCTCGCCCTCTGAATGTCAT
 ACTGTAATCTTTAAGGAAGAAAGCTACATGAATTAATGTACTCTATGGGAAAATTTCTTTGGAAAGATATTTGTAAAA
 CTTTTTTTCCAAGTAAAACTTTATGAACTTGGTCTC

SEQ ID NO 6

ATG CAC GTG TGA GAT GCG GCA GCG GGC GGC GCG GAC GCG AAC AGC AGC GGC
 GGC GGC GGG CGC GGC CTC CTG GGC

SEQ ID NO 5

【手続補正書】**【提出日】**平成14年12月6日(2002.12.6)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号3の少なくとも5連続アミノ酸を含むタンパク質またはペプチド。

【請求項2】 配列番号3の少なくとも10連続アミノ酸を含む、請求項1に記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項3】 配列番号3の少なくとも15連続アミノ酸を含む、請求項1に記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項4】 配列番号3の少なくとも20連続アミノ酸を含む、請求項1に記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項5】 配列番号4に明示の配列を含む、請求項1に記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項6】 タンパク質またはペプチドがリン酸化されている、請求項1から5のいずれかに記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項7】 請求項1から5のいずれかに記載のタンパク質またはペプチドを認識する抗体。

【請求項8】 請求項6のホスホペプチドまたはリン酸化タンパク質を特異的に認識する抗体。

【請求項9】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項8に記載の抗体の使用。

【請求項10】 医薬として使用する、請求項8に記載の抗体。

【請求項11】 請求項1から5のいずれかに記載のタンパク質またはペプチドをコードするための核酸またはその相補鎖。

【請求項12】 該核酸が配列番号5に明示の配列の少なくともフラグメントを含む、請求項11に記載の核酸またはその相補鎖。

【請求項13】 該核酸が配列番号6に明示である請求項11に記載の核酸またはその相補鎖。

【請求項14】 配列番号6に記載の核酸の一部に対してアンチセンスな、または配列番号6と少なくとも70%相同性を有し、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズできる配列に対してアンチセンスな核酸。

【請求項15】 核酸がアンチセンスである配列が、配列番号6に少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より更に好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%相同性を有する、請求項12に記載のアンチセンス核酸。

【請求項16】 ヌクレオチド残基の少なくともいくつかはヌクレアーゼ分解に耐性であり、例えば、ホスホロチオエートおよび/またはメチルホスホネートから選択される、請求項12または13に記載のアンチセンス核酸。

【請求項17】 医薬として使用する、請求項12から14のいずれかに記載のアンチセンス核酸。

【請求項18】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項12から14のいずれかに記載のアンチセンス核酸。

【請求項19】 請求項11から13または14から15のいずれかに記載の核酸を含む、核酸構築物。

【請求項20】 請求項19に記載の構築物を含む、宿主細胞。

【請求項21】 真核細胞、好ましくは昆虫細胞または哺乳類細胞である、請求項20に記載の宿主細胞。

【請求項22】 医薬として使用する、請求項19に記載の構築物。

【請求項23】 医薬として使用する、請求項20に記載の宿主。

【請求項24】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項19に記載の構築物の使用。

【請求項25】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項20に記載の宿主の使用。

【請求項26】 RMPまたはそのフラグメントと、RPB5以外の少なくとも一つのタンパク質を含む、複合体。

【請求項27】 更にSkp2、STAP1、TIP48、TIP49、プレフォルディンまたはRPB5を含む、請求項26に記載の複合体。

【請求項28】 (a) 個体からサンプルを回収する；

(b) サンプルのRMPまたはRMP活性を測定する；そして

(c) サンプル中のRMPまたはRMP活性の存在と、アミノ酸調節に依存する状態を相関させる

段階を含む、アミノ酸と油説に依存性の状態の診断法。

【請求項29】 段階(b)における該分析が細胞抽出物の調製を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 該分析段階が該RMPを、RMPに特異的な抗体を含む反応混合物中でインキュベートすることを含む、請求項28または29に記載の方法。

【請求項31】 該状態が腎臓、心臓、肝臓または肺疾患から選択される、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項32】 該状態が癌である、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項33】 該癌が白血病、前立腺、膀胱、胃、大腸、肺、肝臓および神経芽細胞腫からなる群から選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 該状態がAIDSである、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項35】 該状態がダイエット状態である、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項36】 該状態がラパマイシン処置に感受性である、請求項28から30のいずれかに記載の方法。

【請求項37】 更に該RMPのリン酸化状態を測定し、リン酸化RMPの存在と該状態を相関させる、請求項28から36のいずれかに記載の方法。

【請求項38】 リン酸化RMPの存在をホスホスペシフィック抗体を使用

して測定する、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 更に該サンプル中のRMPのレベルを測定し、RMPのレベルを標準レベルと比較する；そして該標準レベルに対して減少したRMPのレベルをアミノ酸調節に依存する状態と相関させることを含む、請求項28から36のいずれかに記載の方法。

【請求項40】 該標準レベルが該状態に罹患していない第二の個体から得たサンプルにおけるRMPのレベルである、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 該状態が癌であり、該標準レベルが該個体から得た非癌性組織におけるRMPレベルである、請求項39に記載の方法。

【請求項42】 該像体が癌であり、該標準レベルが癌性増殖に隣接した組織から除去したサンプルにおけるRMPレベルである、請求項39に記載の方法。

【請求項43】 該サンプルが細胞性サンプルであり、該方法が更に細胞における該RMPの局在化の測定および該RMPの細胞質への局在化と該状態の相関を含む、請求項28から36のいずれかに記載の方法。

【請求項44】 RMP活性を測定し、RMP活性の存在と該状態を層間させることを含む、請求項28から36のいずれかに記載の方法。

【請求項45】 該RMP活性がアミノ酸生合成をもたらす少なくとも一つの遺伝子の発現の誘導、または抑制の上昇である、請求項44に記載の方法。

【請求項46】 該サンプルがRNAである、請求項44または45に記載の方法。

【請求項47】 該サンプルが体液、例えば胸膜液、血液、血清、血漿、尿である、請求項28から42または46のいずれかに記載の方法。

【請求項48】 該分析段階が更に該サンプルにおけるコントロールタンパク質の検出を含む、請求項28から47のいずれかに記載の方法。

【請求項49】 該コントロールタンパク質がアルカリホスファターゼである、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 該方法が更に該RMPに関して得た第1の値を該コントロールタンパク質で得た第2シグナルで標準化することを含む、請求項48または

49に記載の方法。

【請求項51】 請求項28から50のいずれかに記載の方法により状態を診断する；そして

ラパマイシンでの処置に関して該状態の診断をした個体を選択する

ことを含む、アミノ酸調節に依存した状態の処置のために個体を選択する方法。

【請求項52】 該状態が癌である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】 (a)RMPを認識する抗体；

(b)サンプルを回収する手段；および

(c)指示書

を含む、ラパマイシン感受性癌の検出用キット。

【請求項54】 該キットが更に細胞融解緩衝液およびアッセイ緩衝液を含む、請求項53に記載のキット。

【請求項55】 該抗体がホスホスペシフィック抗体である、請求項53または54に記載のキット。

【請求項56】 該キットが更に二次抗体を含む、請求項53から55のいずれかに記載のキット。

【請求項57】 該二次抗体を放射標識、蛍光標識、燐光性標識、クロモゲン、酵素、酵素基質、ビオチン、アビジンまたはジゴキシゲニンで標識する、請求項56に記載のキット。

【請求項58】 該キットが更に該RMP特異的抗体を検出する手段を含む、請求項53から57のいずれかに記載のキット。

【請求項59】 (a)RMPを含む細胞抽出物を、RMP分解の調節剤の可能性のあるものを含む反応混合物中でインキュベートする、

(b)該RMPまたはリン酸化RMPの量、所望によりまたコントロールタンパク質の量を測定する；そして

(c)RMP分解の調節剤の存在と反応混合物におけるRMPまたはRMPリン酸化のレベルの変化を、該候補調節剤が反応混合物に存在しない場合に関連して相関させる；

段階を含む、RMP分解の調節剤のスクリーニング法。

【請求項60】 該調節剤がRMP抑制剤であり、該変化が非リン酸化RMPレベルの維持である、請求項59に記載の方法。

【請求項61】 該調節剤がRMP活性剤であり、該変化がRMPリン酸化の上昇である、請求項59に記載の方法。

【請求項62】 該調節剤がRMP活性剤であり、該変化がRMPレベルの減少である、請求項59に記載の方法。

【請求項63】 該検出段階が該RMPと抗体をインキュベートすることを含む、請求項59から62のいずれかに記載の方法。

【請求項64】 該抗体がホスホスペシフィック抗体である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】 該RMPが固定化されている、請求項59から64のいずれかに記載の方法。

【請求項66】 該RMPまたは抗体が蛍光標識、蛍光クエンチャー、放射活性標識、シンチラントまたは酵素で標識されている、請求項63から65のいずれかに記載の方法。

【請求項67】 更に該反応混合物におけるコントロールタンパク質を含む、請求項59から67のいずれかに記載の方法。

【請求項68】 試験化合物のRMPへの結合の測定を含み、所望によりコントロール化合物のRMPへの結合の測定を含む、抗癌化合物の同定法。

【請求項69】 試験化合物の存在下でのRMPのRBP5への結合の測定を含み、所望によりまた試験化合物の非存在下での該結合の測定を含む、抗癌化合物の測定法。

【請求項70】 RMPが配列番号4に明示のものである、請求項69に記載の方法。

【請求項71】 少なくとも一つのタンパク質を標識しおよび/または固体表面に結合する、請求項69または70に記載の方法。

【請求項72】 請求項26または27複合体の一定量と試験化合物を接触させ、ついで：(a)そのまま残る複合体の量、(b)損失したそのままの複合体の量、または(c)複合体から放出された遊離タンパク質またはポリペプチドサブユ

ニットの量を測定することを含む、抗癌剤を同定する方法。

【請求項73】 更に試験化合物と接触させる前にそのタンパク質サブユニット成分から複合体を形成する段階を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項74】 請求項59から73のいずれかに記載の方法により同定されら、ラパマイシン以外の抗癌剤またはRMP分解の調節剤、好ましくは抗増殖剤。

【請求項75】 癌の予防または処置のための医薬の製造のための、永久抗59から73のいずれかに記載の方法により同定した、ラパマイシン以外の薬剤の使用。

【請求項76】 請求項59から73のいずれかにキサの方法により同定したラパマイシン以外の化合物の有効量を個体に投与することを含む、癌の予防または処置法。

【請求項77】 医薬としての請求項74に記載の調節剤の使用。

【請求項78】 請求項74に記載の調節剤の有効量を個体に投与することを含む、アミノ酸調節に依存する状態のを阻害する方法。

【請求項79】 該状態が癌、血管形成、糖尿病、細胞加齢、神経変性疾患、免疫学的疾患、筋肉低下、ストレス(トラウマ、熱傷、敗血症、熱)、慢性疾患(慢性腎臓、心臓、肝臓および肺疾患)およびAIDSからなる群から選択される、請求項78に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 01/05411
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/47 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Category of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DORJSUREN D ET AL: "RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by Hepatitis B virus X protein" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 18, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 7546-7555, XP002126923 ISSN: 0270-7306 cited in the application the whole document	28-50
X	US 5 874 276 A (CLARKSON KATHLEEN A ET AL) 23 February 1999 (1999-02-23) the whole document	1
--- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Other documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
Symbols used to indicate the documents: *A* document indicating the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *I* document considered published on or after the international filing date *P* document which may throw doubts on priority claims) or which may establish the publication date of another document for a special reason (as specified) *O* document referred to in an oral disclosure, use, exhibition or other means *E* 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. *G* document member of the same patent family		
Date of the start of completion of the international search 9 November 2001		Date of mailing of the international search report 22 November 2001 (22.11.01)
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL 7280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Döpfer, K-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/05411

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 25434 A (WISTAR INST ;BAYER AG (US); HALAZONETIS THANOS (US); HARTWIG WOLFG) 22 August 1996 (1996-08-22) the whole document -----	1

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No.
PCT/EP 01/05411**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.: 51, 52
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
28-50
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-11 (part)

A peptide or protein comprising at least 5 consecutive amino acids of SEQ ID No 1

1.1. Claim : 1

165 five amino acid sequences from MATTP (N terminal) through EKPHH (C terminal) represent each a separate invention

2. Claims: 12-27 (complete)

Nucleic acids comprising at least parts of the SEQ ID Nos 3 and 4, constructs, host cells comprising these nucleic acid fragments and their uses

3. Claims: 26, 27 (complete)

A complex comprising RMP or a fragment thereof and at least one other protein than RPB5

4. Claims: 28-52 (complete)

A method of diagnosing a condition dependent on amino acid regulation comprising analysing RMP or RMP activity

5. Claims: 53-58 (complete)

Kit for detecting rapamycin-sensitive cancers

6. Claims: 59-67 (complete)

Method for screening for a modulator of RMP degradation

7. Claims: 68-73 (complete)

Method for identifying anti-cancer compounds by binding of RMP to RBP5

8. Claims: 74-79 (Complete)

Anti-cancer agents other than rapamycin and their uses

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Please note that all inventions mentioned under item 1, although not necessarily linked by a common inventive concept, could be searched without effort justifying an additional fee.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

The method per se, i.e. the decision to select an individual for a treatment of a pathological condition represents a purely mental act, for which a search is not required.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 51, 52

Rule 39.1(iii) PCT - Scheme, rules and method for performing mental acts

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/05411

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874276	A	23-02-1999	US 5861271 A 19-01-1999
			AT 203373 T 15-08-2001
			AU 685210 B2 15-01-1998
			AU 1383695 A 03-07-1995
			CA 2156066 A1 22-06-1995
			CA 2178636 A1 22-06-1995
			CN 1118131 A 06-03-1996
			DE 69427812 D1 30-08-2001
			DK 684770 T3 17-09-2001
			WO 9516360 A1 22-06-1995
			EP 0733115 A1 25-09-1996
			EP 0684770 A1 06-12-1995
			FI 953867 A 03-10-1995
			FI 962444 A 12-06-1996
			JP 9506514 T 30-06-1997
			NO 953218 A 16-10-1995
			NZ 278373 A 24-10-1997
			WO 9516782 A1 22-06-1995
			US 6268196 B1 31-07-2001
			WO 9625434
AU 718963 B2 04-05-2000			
AU 4915096 A 04-09-1996			
CA 2213229 A1 22-08-1996			
EP 0809655 A1 03-12-1997			
JP 11500311 T 12-01-1999			
WO 9625434 A1 22-08-1996			
US 6245886 B1 12-06-2001			

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K 39/395	T 4 C 0 8 6
	45/00	45/00	4 C 0 8 7
	48/00	48/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P	1/16	A 6 1 P 1/16	
	3/10	3/10	
	7/00	7/00	
	9/00	9/00	
	11/00	11/00	
	13/12	13/12	
	17/02	17/02	
	21/00	21/00	
	25/00	25/00	
	31/04	31/04	
	31/18	31/18	
	35/00	35/00	
	37/00	37/00	
	43/00	43/00	1 1 1
C 0 7 K	14/47	C 0 7 K 14/47	
	16/18	16/18	
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N 1/15	
	1/19	1/19	
	5/10	5/10	
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N 33/15	Z
	33/50	33/50	Z
	33/53	33/53	D
	33/574	33/574	A
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	B

(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 O , C R , C U , C Z , D E
, D K , D M , D Z , E C , 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 S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

(71)出願人 Novartis Forschungs
stiftung Zweigniede
rlassung Friedrich
Miescher Institute
for Biomedical Rese
arch

(72)発明者 マティアス・ゲオルク・クリスティアン・
グスタイガー
スイス、ツェーハー - 4054バーゼル、ビル
ジッヒシュトラーセ127番

(72)発明者 ヴィルヘルム・クレック
スイス、ツェーハー - 4125リーヘン、エル
レンシュトレスヒェン73番

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 DA78 FB03 FB07
FB08

4B024 AA01 AA12 BA80 CA04 DA02
DA11 DA12 EA04 GA11 HA15

4B065 AA57X AA72X AA90X AA90Y
AB01 BA02 CA23 CA24 CA44
CA46

4C084 AA13 AA17 NA14 ZA012
ZA362 ZA512 ZA592 ZA752
ZA812 ZA892 ZA942 ZB072
ZB262 ZB352 ZC202 ZC352
ZC552

4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 EE01

4C086 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04
NA14 ZA01 ZA36 ZA59 ZA75
ZA81 ZA89 ZA94 ZB07 ZB26
ZB35 ZC35 ZC55

4C087 BB21 BB65 BC83 NA14 ZA01
ZA36 ZA59 ZA75 ZA81 ZA89
ZA94 ZB07 ZB26 ZB35 ZC35
ZC55

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40
DA75 DA76 EA28 EA51 FA72
FA74

专利名称(译)	用于癌症诊断和抗癌剂筛选的分析		
公开(公告)号	JP2003532401A	公开(公告)日	2003-11-05
申请号	JP2001582361	申请日	2001-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯研究基金会弗里德里克·米谢尔生物医学研究所		
申请(专利权)人(译)	诺华公司·フォルシュングスシュティフトゥング·ツヴァイクニエーダーラッスング·フリードリッヒ·寛松谢·安装的红茶トウート·米面、生物医药ー		
[标]发明人	マティアスゲオルククリスティアングスタイガー ヴィルヘルムクレック		
发明人	マティアス·ゲオルク·クリスティアン·グスタイガー ヴィルヘルム·クレック		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K31/711 A61K31/7125 A61K35/12 A61K35/64 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/18 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12N9/00 C12N9/16 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/25 C12Q1/34 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47 G01N33/574		
FI分类号	A61K31/7088 A61K31/7125 A61K35/12 A61K35/64 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/574.A C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA362 4C084/ZA512 4C084/ZA592 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C084/ZB352 4C084/ZC202 4C084/ZC352 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/EE01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA36 4C086/ZA59 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZB07 4C086/ZB26 4C086/ZB35 4C086/ZC35 4C086/ZC55 4C087/BB21 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA36 4C087/ZA59 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA94 4C087/ZB07 4C087/ZB26 4C087/ZB35 4C087/ZC35 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2000011439 2000-05-12 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了新的RMP同源物，以及编码该蛋白质的核酸和反义核酸。依赖于氨基酸调节，癌症，神经退行性疾病，肌肉萎缩，免疫失调和依赖RMP的疾病（例如艾滋病）的诊断方法以及鉴定可对抗RMP依赖的疾病的药物的筛选方法 提供。

Program: blastp

Database: nrcc

Number:

5083

e-mail:

Format: plain_text

Sequence:

MAITPERGATGCKVLEKVFETLSVTCQDQKNTLDRKNTVPEQVAVYLAQVLTRECPKAKHSLSLWQY
DLGQNFVD

TVYFDRIYVAGVGFETLPAALAKFDKNSLITFSLSTFOSVNTKATHEWLRGSLGQNF
PERFHE