

【特許請求の範囲】

【請求項1】 キナーゼポリペプチドをコードする，単離され，濃縮され，または精製された核酸分子であって，

(a) 配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする；

(b) (a)のヌクレオチド配列の相補体である；

(c) ストリンジェントな条件下で(a)のヌクレオチド分子にハイブリダイズし，かつ天然に生ずるキナーゼポリペプチドをコードする；

(d) 配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって，ただし，N末端ドメイン，C末端触媒ドメイン，触媒ドメイン，C末端ドメイン，コイルドコイル構造領域，プロリンリッチ領域，スペーサー領域およびC末端テールの全部ではないが1またはそれ以上を欠失しているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする；または

(e) (d)のヌクレオチド配列の相補体である

のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする核酸分子。

【請求項2】 宿主細胞において転写を開始させるのに有効なベクターまたはプロモーターをさらに含む，請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】 前記核酸分子が，哺乳動物から単離され，濃縮され，または精製されたものである，請求項1記載の核酸分子。

【請求項4】 前記哺乳動物がヒトである，請求項3記載の核酸分子。

【請求項5】 試料においてキナーゼポリペプチドをコードする核酸を検出するために用いられ，前記キナーゼポリペプチドが，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドからなる群より選択されることを特徴とする，請求項1記載の核酸プローブ。

【請求項6】 配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドをコードする請求項1記載の核酸分子を含む組換え細胞。

【請求項7】 単離され，濃縮され，または精製されたキナーゼポリペプチ

ドであって、前記ポリペプチドは、

(a) それぞれ、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) それぞれ配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、ただし、N末端ドメイン、C末端触媒ドメイン、触媒ドメイン、C末端ドメイン、コイルドコイル構造領域、プロリンリッチ領域、スペーサー領域、およびC末端テールからなる群より選択されるドメインの全部ではないが1またはそれ以上を欠失しているアミノ酸配列、を有するアミノ酸配列を含むことを特徴とするポリペプチド。

【請求項8】 前記ポリペプチドが哺乳動物から単離され、精製され、または濃縮されたものである、請求項7記載のキナーゼポリペプチド。

【請求項9】 前記哺乳動物がヒトである、請求項8記載のキナーゼポリペプチド。

【請求項10】 キナーゼポリペプチドまたは前記ポリペプチドのドメインに対する特異的結合親和性を有する抗体または抗体フラグメントであって、前記ポリペプチドは、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドであることを特徴とする抗体または抗体フラグメント。

【請求項11】 配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドに対する特異的結合親和性を有する抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項12】 請求項7または8記載のポリペプチドに結合する抗体および負対照抗体を含むキット。

【請求項13】 キナーゼポリペプチドの活性を調節する物質を同定する方法であって、

(a) 配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドを試験物質と接触させ；

(b) 前記ポリペプチドの活性を測定し；そして

(c) 前記物質が前記ポリペプチドの活性を調節するか否かを判定する

の各工程を含む方法。

【請求項14】 細胞においてキナーゼポリペプチドの活性を調節する物質を同定する方法であって、

(a) 配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドを発現させ；

(b) 試験物質を前記細胞に加え；そして

(c) 細胞表現型または前記ポリペプチドと天然の結合パートナーとの間の相互作用の変化をモニターする

の各工程を含む方法。

【請求項15】 治療を必要とする患者に、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼの活性を調節する物質を投与することにより、疾病または疾患を治療する方法。

【請求項16】 前記疾病または疾患が、癌、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病、脳またはニューロン関連疾病、および代謝性疾患からなる群より選択される、請求項15記載の方法。

【請求項17】 前記疾病または疾患が、組織の癌；血液起源の癌；中枢神経系の疾病；末梢神経系の疾病；アルツハイマー病；パーキンソン病；多発性硬化症；筋萎縮性側索硬化症；ウイルス感染；プリオンにより引き起こされる感染；細菌により引き起こされる感染；真菌により引き起こされる感染；および眼性疾患からなる群より選択される、請求項15記載の方法。

【請求項18】 前記疾病または疾患が、片頭痛；痛み；性的機能不全；気分障害；注意障害；認識障害；低血圧症；高血圧症；精神病性疾患；神経学的疾患；運動異常症；代謝性疾患；および臓器移植拒絶からなる群より選択される、請求項15記載の方法。

【請求項19】 前記物質がインビトロでキナーゼ活性を調節する、請求項15記載の方法。

【請求項20】 前記物質がキナーゼ阻害剤である、請求項19記載の方法。

【請求項21】 疾病または疾患の診断道具として試料中でキナーゼポリペプチドを検出する方法であって、

(a) 前記試料を、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドの核酸標的領域にハイブリダイゼーションアッセイ条件下でハイブリダイズする核酸プローブと接触させ、前記プローブは、前記ポリペプチド、そのフラグメント、または前記配列およびフラグメントの相補体をコードする核酸配列を含み；そして

(b) 前記疾病の指標として、プローブ：標的領域ハイブリッドの存在または量を検出する

の各工程を含む方法。

【請求項22】 前記疾病または疾患が、癌、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病、脳またはニューロン関連疾病、および代謝性疾患からなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項23】 前記疾病または疾患が、組織の癌；血液起源の癌；中枢神経系の疾病；末梢神経系の疾病；アルツハイマー病；パーキンソン病；多発性硬化症；筋萎縮性側索硬化症；ウイルス感染；プリオンにより引き起こされる感染；細菌により引き起こされる感染；真菌により引き起こされる感染；および眼性疾患からなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項24】 前記疾病または疾患が、片頭痛、痛み；性的機能不全；気分障害；注意障害；認識障害；低血圧症；高血圧症；精神病性疾患；神経学的疾患；運動異常症；代謝性疾患；および臓器移植拒絶からなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項25】 疾病または疾患の診断道具として試料中のキナーゼポリペプチドを検出する方法であって、

(a) 試料中の前記キナーゼポリペプチドをコードする核酸標的領域を、前記キナーゼポリペプチド、またはその1またはそれ以上のフラグメントをコードする対照核酸標的領域と比較し、ここで、前記キナーゼポリペプチドは、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列、またはその1またはそれ以上のフラグメントを有しており；そして

(b) 前記疾病または疾患の指標として前記標的領域と前記対照標的領域との間の配列または量の相違を検出する，
の各工程を含む方法。

【請求項26】 前記疾病または疾患が，癌，免疫関連疾病および疾患，心臓血管疾病，脳またはニューロン関連疾病，および代謝性疾患からなる群より選択される，請求項25記載の方法。

【請求項27】 前記疾病または疾患が，組織の癌；血液起源の癌；中枢神経系の疾病；末梢神経系の疾病；アルツハイマー病；パーキンソン病；多発性硬化症；筋萎縮性側索硬化症；ウイルス感染；プリオンにより引き起こされる感染；細菌により引き起こされる感染；真菌により引き起こされる感染；および眼性疾患からなる群より選択される，請求項25記載の方法。

【請求項28】 前記疾病または疾患が，片頭痛，痛み；性的機能不全；気分障害；注意障害；認識障害；低血圧症；高血圧症；精神病性疾患；神経学的疾患；運動異常症；代謝性疾患；および臓器移植拒絶からなる群より選択される，請求項25記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、米国特許仮出願60/195,953(2000年4月10日出願)および60/201,015(2000年5月1日出願)および60/213,805(2000年6月22日出願)に基づく優先権を主張する。これらの出願はすべてその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

【0002】**発明の分野**

本発明は、キナーゼポリペプチド、キナーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ならびに種々のキナーゼ関連疾病および状態の診断および治療に有用な種々の産物および方法に関する。

【0003】**発明の背景**

以下の本発明の背景の記述は、本発明の理解を助けるために提供されるものであり、本発明に対する先行技術であるかまたはそれを記載すると認めるものではない。

【0004】

細胞シグナル伝達は、各種の細胞プロセスを制御する外部刺激を細胞内部にリレーするための基本的メカニズムである。シグナル伝達の重要な生物化学メカニズムの一つは蛋白質の可逆的リン酸化であり、これは、成熟蛋白質の構造と機能を変化させることによりその活性を制御することができる。

【0005】

蛋白質リン酸化は、細胞のシグナル伝達において中枢的役割を果たす。このタイプの翻訳後修飾により制御される生物学的機能には以下のものがある：細胞分裂；分化および死(アポトーシス)；細胞遊走性および細胞骨格構造；DNA複製，転写，スプライシングおよび翻訳の制御；小胞体およびゴルジ装置から膜および細胞外空間への蛋白質輸送事象；蛋白質の核内輸送および核外輸送；代謝反応の制御等。異常な蛋白質リン酸化は、多くの疾病，例えば癌，ならびに免疫性，神経性および代謝性疾患の病因に関連していることが広く認められている。

【0006】

本明細書の全体を通して、キナーゼについては以下の略号を用いる：

- A S K アポトーシスシグナル制御キナーゼ
C a M K $C a^{2+}$ / カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼ
C C R K 細胞サイクル関連キナーゼ
C D K サイクリン依存性キナーゼ
C K カゼインキナーゼ
D A P K 死関連蛋白質キナーゼ
D M 筋緊張性ジストロフィーキナーゼ
D y r k 二重特異性チロシンリン酸化制御キナーゼ
G A K サイクリンG関連キナーゼ
G R K G - 蛋白質共役レセプター
G u C グアニル酸シクラーゼ
H I P K ホメオドメイン相互作用蛋白質キナーゼ
I R A K インターロイキン - 1レセプター関連キナーゼ
M A P K 有糸分裂促進物質活性化蛋白質キナーゼ
M A S T 微小管関連 S T K
M L C K ミオシン軽鎖キナーゼ
M L K ミックスライニージキナーゼ
N I M A N i m A 関連蛋白質キナーゼ
P K A c A M P 依存性蛋白質キナーゼ
R S K リボゾーム蛋白質 S 6 キナーゼ
R T K レセプターチロシンキナーゼ
S G K 血清およびグルココルチコイド制御キナーゼ
S T K セリントレオニンキナーゼ
U L K U N C - 5 1 様キナーゼ

【0007】

真核生物において最もよく特徴決定されている蛋白質キナーゼは、最も一般的なリン酸アクセプターアミノ酸残基である、セリン、トレオニンおよびチロシン

残基のヒドロキシル置換基上で蛋白質をリン酸化する。また、ヒスチジンにおけるリン酸化が細菌において見いだされている。

【0008】

リン酸基の存在は、蛋白質の機能を多くの方法により調節する。一般的なメカニズムには、酵素の活性化または不活性化につながる触媒特性 (V_{max} および K_m) の変化が含まれる。

【0009】

2番目に広く認識されているメカニズムには、蛋白質-蛋白質相互作用の促進が関与する。この例は、リガンド活性化EGFレセプターチロシンキナーゼのチロシン自己リン酸化である。この事象により、レセプターのC末端細胞内ドメイン上のホスホチロシン残基がアダプター分子Grb2のSH2モチーフに高親和性結合することが誘発される。次に、Grb2は、そのSH3モチーフを介して第2のアダプター分子、例えばSHCに結合する。この3成分系複合体の形成は、EGFの生物学的効果を担うシグナリング事象を活性化する。最近、セリンおよびトレオニンのリン酸化事象はまた、ホスホセリンおよびホストレオニンが広範な種類の蛋白質に存在するWWモチーフに高親和性結合することにより媒介される蛋白質-蛋白質相互作用事象を通してその生物学的機能を作用させることが認識されている (Lu, P. J. et al. (1999) Science 283: 1325 - 1328)。

【0010】

蛋白質リン酸化の3番目に重要な結果は、基質の細胞内局在の変化である。例としては、広範な種類の蛋白質の核内輸送および核外輸送事象が蛋白質リン酸化により制御されている (Drier E. A. et al. (1999) Genes Dev 13: 556 - 568)。

【0011】

蛋白質キナーゼは、真核生物蛋白質の最も大きなファミリーの1つであり、数百種類のメンバーが知られている。これらの蛋白質は、250 - 300アミノ酸のドメインを共有し、これは、さらに共通の触媒コア構造を含む12個の別々のサブドメインに分割することができる。最近、これらの保存された蛋白質モチー

フをPCRに基づく方法およびバイオインフォマティクス法を用いて利用して、既知のキナーゼが著しく拡大した。蛋白質キナーゼの触媒ドメインの配列の多重アラインメントおよび続くパルシモニー分析により、これらに関連するキナーゼのサブファミリーに分割することができる。

【0012】

キナーゼは、セリンおよびトレオニンのリン酸化に特異的なものと、チロシンのリン酸化に特異的なものとの2グループに大別される。"二重特異性"キナーゼと称されるあるキナーゼは、チロシンならびにセリン/トレオニン残基をリン酸化することができる。

【0013】

蛋白質キナーゼはまた、細胞中のその位置によっても特徴づけることができる。ある種のキナーゼは、外部環境、例えばリガンドの結合に応答してその触媒的活性を直接変化させることができる、貫膜レセプタータイプ蛋白質である。またあるものは、貫膜ドメインを有しない非レセプタータイプ蛋白質である。これらは細胞膜の内表面から核までの種々の細胞コンパートメントにおいて見いだされる。

【0014】

多くのキナーゼは制御カスケードに関与しており、ここで、その基質には活性がそのリン酸化状態により制御される他のキナーゼが含まれる。最終的に、いくつかの下流エフェクターの活性が、そのような経路の活性化から生ずるリン酸化により調節される。最近PCRに基づくクローニング戦略を用いてこれらのキナーゼの保存蛋白質モチーフが探究され、既知のキナーゼが著しく拡大した。

【0015】

蛋白質キナーゼの触媒ドメイン中の配列の多重アラインメントおよび続くパルシモニー分析により、関連するキナーゼをサブファミリーの区別しうる枝、例えば、チロシンキナーゼ(PTK)、二重特異性キナーゼ、およびセリン/トレオニンキナーゼ(STK)に分類することができる。後者のサブファミリーには、サイクリックヌクレオチド依存性キナーゼ、カルシウム/カルモジュリンキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)、MAP-キナーゼ、セリン-トレオ

ニンキナーゼレセプター，およびあまり明確にされていないいくつかのサブファミリーが含まれる。

【0016】

蛋白質キナーゼは，いくつかの主要なグループに分類することができる：AGC，CAMK，カゼインキナーゼ1，CMGC，STE，チロシンキナーゼ，および非典型的キナーゼ（Plowman, GD et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 96, Issue 24, 13603-13610, November 23, 1999; www.kinase.comも参照）。さらに，小さいがなお区別しうる多くのファミリー，例えば，虫特異的または真菌特異的キナーゼに関連するファミリー，およびいくつかのより小さいファミリーを表す"その他"と称されるファミリーがある。各グループ中には，より密接に関連するキナーゼのいくつかの区別しうるファミリーがある。さらに，"非典型的"ファミリーは，その触媒ドメインが一般的キナーゼと一次配列ホモロジーをほとんどまたは全く有しない蛋白質キナーゼを表し，これにはAGCキナーゼおよびPI3キナーゼが含まれる。

【0017】

AGCグループ

AGCキナーゼは，ArgおよびLysの近傍に見いだされる残基をリン酸化する塩基性アミノ酸指向性酵素である。このグループの例は，G蛋白質共役レセプターキナーゼ（GRK），サイクリックヌクレオチド依存性キナーゼ（PKA，PKC，PKG），NDRまたはDBF2キナーゼ，リボソームS6キナーゼ，AKTキナーゼ，筋緊張性ジストロフィーキナーゼ（DMPK），MAPK相互作用キナーゼ（MNK），MASTキナーゼ，および元々線虫においてのみ同定されているMo3C11.1__ceファミリーである。

【0018】

GRKは，ヘテロ三量体グアニン蛋白質共役レセプター（GPCR）からのシグナリングを制御する。GPCRにおける変異は，多くのヒト疾病を引き起こす。これには，色素性網膜炎，定常的夜盲症，色盲，過度甲状腺腺腫，家族性的

早熟，家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症および新生児重症上皮小体機能亢進症が含まれる (OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>)。GRKによるGPCRの制御は，これらの疾病におけるGRKの関与を間接的に示唆する。

【0019】

cAMP依存性蛋白質キナーゼ (PKA) は2つの触媒 (C) および2つの制御 (R) サブユニットからなるヘテロ四量体から構成される。ここで，Rサブユニットは第2メッセンジャーcAMPに結合し，このことにより活性化Cサブユニットが複合体から解離する。これらのキナーゼの多くは第2メッセンジャー，例えばcAMPに応答して，ホルモンおよび神経伝達物質に対する広範な細胞性応答が生ずる。

【0020】

AKTはホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3-K) により制御される哺乳動物プロトオンコプロテインであり，細胞生存シグナルとして機能して，アポトーシスから細胞を保護するようである。インスリンレセプター，RAS，PI3-K，およびPDK1はすべてAKTの上流アクチベータとして作用するが，脂質ホスファターゼPTENは，PI3-K/AKT経路の負のレギュレータとして機能する。AKT媒介性細胞生存の下流の標的には，プロアポトーシス因子BADおよびカスパーゼ9，およびフォークヘッドファミリー中の転写因子，例えば虫のDAF-16が含まれる。AKTはまたインスリンシグナリングにおける必須のメディエータであり，これは部分的には，これがGSK-3を別の下流標的として使用するためである。

【0021】

S6キナーゼは，有糸分裂促進性応答に関与する広範な種類の細胞プロセス，例えば，蛋白質合成，特定のmRNA種の翻訳，およびG1期からS期への細胞サイクル進行を制御する。遺伝子は染色体領域17q23に位置しており，乳癌において増幅される (Couch, et al., Cancer Res. 1999 Apr 1; 59(7):1408-11)。

【0022】

CAMKグループ

CAMKキナーゼもまた塩基性アミノ酸指向性キナーゼである。これには、Ca²⁺/カルモジュリン制御およびAMP依存性蛋白質キナーゼ (AMPK), ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK), MAPキナーゼ活性化蛋白質キナーゼ (MAPKAPK), チェックポイント2キナーゼ (CHK2), 死関連蛋白質キナーゼ (DAPK), ホスホリラーゼキナーゼ (PHK), RacおよびRho結合トリオキナーゼ, CAMKの"ユニーク"ファミリー, およびEMK関連蛋白質キナーゼが含まれる。

【0023】

STKのEMKファミリーは、細胞極性、微小管安定性および癌の制御に関与している。EMKファミリーの1つのメンバーであるC-TAK1は、Cdc25Cを活性化し、次にこれがCdc2を脱リン酸化することにより、有糸分裂に入ることを制御することが報告されている。EMKファミリーには、転移腫瘍において過剰発現することが示されているMAKVも含まれる (Dokl. Akad. Nauk 354 (4), 554-556 (1997))。

【0024】

CMGCグループ

CMGCキナーゼは、プロリンリッチの状況中に存在する残基をリン酸化する"プロリン指向性"酵素である。これらには、サイクリン依存性キナーゼ (CDK), 有糸分裂促進物質活性化キナーゼ (MAPK), GSK3, RCKおよびCLKが含まれる。ほとんどのCMGCキナーゼは、サブドメインXおよびXI中に挿入物が存在するため、平均より大きいキナーゼドメインを有する。

【0025】

CDKは、細胞分裂の間の有糸分裂の制御に中枢的役割を果たす。細胞分裂のプロセスは4段階で生ずる：S期、この時期に染色体が複製する、G₂、有糸分裂およびG₁または中間期。有糸分裂の間、複製した染色体は均等に分離するため、各娘細胞はゲノムの完全なコピーを受け取ることができる。すべての真核生物細胞における鍵となる有糸分裂レギュレータは、サイクリンBにより制御されるCDKであるSTKcdc2である。しかし、あるCDK様キナーゼ、例えば

CDK5は、サイクリンと関連しておらず、細胞サイクルにも制御されない。

【0026】

MAPKは、多くの細胞シグナリング経路、例えば、ストレス応答および有糸分裂促進において中枢的役割を果たす(Lewis, T.S., Shapiro, P.S., and Ahn, N.G. (1998) *Adv. Cancer Res.* 74, 49-139)。MAPキナーゼは、成長因子、例えばEGF、およびサイトカイン、例えばTNFアルファにより活性化されることができ。EGFに反応して、Rasが活性化され、Raf1を膜にリクルートし、ここでRaf1はリン酸化およびコンフォメーション変化を含むメカニズムにより活性化される(Morrison, D.K., and Cutler, R.E. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 174-179)。活性化Raf1はMEK1をリン酸化し、これは次にERKをリン酸化し、活性化する。

【0027】

チロシン蛋白質キナーゼグループ

チロシンキナーゼグループは、細胞質(例えばsrc)ならびに貫膜レセプターチロシンキナーゼ(例えばEGFレセプター)の両方を含む。これらのキナーゼは、細胞増殖、分化およびアポトーシスを媒介するシグナル伝達プロセスにおいて中枢的な役割を果たす。配列の1つである17000030181412は、ヒトRETキナーゼと関連する。レセプターチロシンキナーゼをコードするRET遺伝子の変異は、遺伝性癌症候群MEN2AおよびMEN2Bと関連づけられている。これらは家族性および散発性骨髄甲状腺癌腫とも関連づけられている。ミスセンス変異によりキナーゼ活性が異常に活性化されて、細胞外ドメインのシステイン残基に影響を与え、強力な発癌性につながりうる(Oncogene 1999 Aug 26; 18(34): 4833-8)。

【0028】

STEグループ

STEファミリーは、MAPKの上流に順番に存在する3種類の蛋白質キナーゼを表す。このグループには、STE7(MEKまたはMAPKK)キナーゼ、

STE11 (MEKKまたはMAPKKK) キナーゼおよびSTE20 (MEKKK) キナーゼが含まれる。ヒトにおいては、STE11ファミリーとは遠いホモロジーしか有しないいくつかの蛋白質キナーゼファミリーもまたMAPKKKのレベルで作用し、これには、RAF, MLK, TAK1, およびCOTが含まれる。MAPKカスケードの異なるレベルにおける蛋白質キナーゼの機能の間にクロストークが生ずるため、多数のSTEファミリーキナーゼは上流シグナルの特異性に対する多大な可能性に変容することができる。

【0029】

パン酵母からのプロトタイプSTE20は、ホルモンレセプターにより制御され、シグナリングによりCDK活性の調節を通して細胞サイクル進行に直接影響を与える。これはまた分枝している経路において細胞骨格および転写プログラムの変化を調和的に制御する。同様にして、ヒトの相同のキナーゼは、成長の細胞外制御、細胞接着および移動、および転写プログラムの変化において役割を果たしているようであり、この3つはすべて腫瘍発生に重要な役割を有する。哺乳動物STE20関連蛋白質キナーゼは、成長因子またはサイトカインへの応答、酸化的に、UVに、または照射に関連したストレス経路、炎症性シグナル(例えばTNF)、アポトーシス刺激(例えばFas)、TおよびB細胞共刺激、細胞骨格構造の制御、および細胞のトランスフォーメーションにおける関与が示唆されている。典型的には、STE20関連キナーゼは、MAPKカスケードの上流レギュレータとして働く。例としては、HPK1、蛋白質キナーゼ経路を活性化してストレス活性化蛋白質キナーゼSAPK/JNKにつながるSTE20様キナーゼドメインを有する蛋白質-セリン/トレオニンキナーゼ(STK); Ras-MAPK経路を介してRacと相互作用して細胞のトランスフォーメーションにおいて役割を果たす上流CDC42結合ドメインを有するSTKであるPAK1; および上流レセプターチロシンキナーゼと相互作用して下流STE11-ファミリーキナーゼと接続するネズミNIKが挙げられる。

【0030】

NEKキナーゼは、繊維状真菌*A. nidulans*において有糸分裂に入るために必要なNIMAと関連している。nimA遺伝子の変異はこの真菌におい

てnim(有糸分裂しない),すなわちG2停止表現型を引き起こす(Fry, A.M. and Nigg, E.A.(1995)Current Biology 5:1122-1125)。いくつかの知見は,高等真核生物がNIMAの機能的対応物を有しているかもしれないことを示唆する:(1)HeLa細胞における優性負の発現型のNIMAはG2停止を引き起こす;(2)NIMAの過剰発現は,A.nidulansにおいてのみならず酵母,アフリカツメガエル卵母細胞およびHeLa細胞においても,クロマチン凝縮を引き起こす(Lu, K.P. and Hunter, T.(1995)Prog.Cell Cycle Res. 1, 187-205);(3)NIMAは,哺乳動物細胞で発現したとき,細胞サイクル制御において機能するプロリン-プロリンイソメラーゼであるpin1と相互作用する(Lu, K.P. et al.(1996)Nature 380, 544-547);(4)オカダイニン酸阻害剤の実験は,有糸分裂を誘導するcdc2非依存性メカニズムの存在を示唆する(Ghosh, S. et al.(1998)Exp.Cell Res. 242, 1-9);および(5)NIMA様キナーゼ(fin1)がAspergillus以外の別の真核生物Saccharomyces pombeに存在する(Krien, M.J.E. et al.(1998)J.Cell Sci. 111, 967-976)。4つの哺乳動物NIMA様キナーゼ,NEK1,NEK2,NEK3およびNRK2が同定されている。NIMA関連キナーゼは触媒領域ではNIMAに対する類似性を有するにもかかわらず,哺乳動物キナーゼは触媒外領域ではNIMAとは構造的に異なる。さらに,哺乳動物キナーゼは,Aspergillus nimA変異体におけるnim表現型を捕捉することができない。これらの知見から,以下の3つの可能性が導かれる:1)哺乳動物NIMAホモログはまだ同定されていない;2)高等真核生物にはNIMAホモログはない;3)高等真核生物においては,NIMAの生物学的機能は,多数の関連するキナーゼにより行われる。追加の哺乳動物NIMA関連キナーゼおよびNEK関連キナーゼの解明および生物学的特性決定が,この疑問の解明を助けるはずである。

カゼインキナーゼ1グループ

CK1ファミリーは、蛋白質キナーゼファミリーの遠い枝である。蛋白質キナーゼサブドメインVIIおよびIXの顕著な特徴を同定することは困難である。1またはそれ以上の形が哺乳動物組織および細胞株に偏在的に分布している。CK1キナーゼは、細胞質、核、膜結合、および細胞骨格に付随して見いだされる。スプライシング変種はその細胞内分布が異なる。

【0032】

"その他"グループ

いくつかのファミリーは、"その他"と名付けられる無関係なキナーゼのグループにクラスター化される。これには、CHK1；伸長2因子キナーゼ(EIFK)；MAPKの上流に順番に存在する3種類のキナーゼを表す酵母ステライルファミリーキナーゼ(STE)のホモログ；カルシウム-カルモジュリンキナーゼキナーゼ(CAMKK)；二重特異性チロシンキナーゼ(DYRK)；IKBキナーゼ(IKK)；インテグリンレセプターキナーゼ(IRAK)；エンドリボヌクレアーゼ付随キナーゼ(IRE)；ミックスライニージキナーゼ(MLK)；LIM-ドメイン含有キナーゼ(LIMK)；MOS；PIM；レセプター相互作用キナーゼ(RIP)；SR-蛋白質特異的キナーゼ(SRPK)；RAF；セリン-トレオニンキナーゼレセプター(STKR)；TAK1；精巢特異的キナーゼ(TSK)；タウズレッド関連キナーゼ(TSL)；UNC51-関連キナーゼ(UNC)；VRK；WEE；有糸分裂キナーゼ(BUB1, AUORRA, PLK, およびNIMA/NEK)；虫に対する密接なホモログであるいくつかのファミリー(C26C2.1, YQ09, ZC581.9, YFL033c, C24A1.3)；ショウジョウバエ(SLOB), または酵母(YDOD__sp, YGR262__sc)キナーゼ；および"ユニーク", すなわち, いずれの明確なファミリーにもクラスター化されないものが含まれる。追加のファミリーはあまり明確にされておらず, 下等真核生物, 例えば酵母または虫において最初に同定された(YNL020, YPL236, YQ09, YWY3, SCY1, C01H6.9, C26C2.1)。

【0033】

RIP2は腫瘍壊死因子(TNF)レセプター複合体に付随するセリン-トレオニンキナーゼであり、哺乳動物細胞においてNF- κ Bの活性化および細胞死に関与することが示唆されている。最近、RIP2がMAPK経路を活性化することが示された(Navas, et al., J Biol. Chem. 1999 Nov 19; 274(47): 33684-33690)。RIP2は、E1k1転写因子の活性化を誘導することにより、AP-1および血清応答要素に制御される発現を活性化する。RIP2は、ERK2をインビボおよびインビトロで直接リン酸化し、活性化する。次にRIP2はRas活性化Raf1との相互作用により活性化される。これらの結果は、キナーゼシグナリング経路の統合された性質を強調する。

【0034】

タウズレッド(TSL)キナーゼは最初に植物*Arabidopsis thaliana*で同定された。TSLは適切な花の発達に必須のセリン/トレオニンキナーゼをコードする。ヒトタウズレッド様キナーゼ(Tlks)は、細胞-サイクルにより制御される酵素であり、S期の中に最大の活性を示す。この制御された活性は、Tlk機能が進行中のDNA複製と連鎖していることを示唆する(Sillje, et al., EMBO J 1999 Oct 15; 18(20): 5691-5702)。

【0035】

非典型的な蛋白質キナーゼグループ

蛋白質キナーゼ活性を有する、真核生物蛋白質キナーゼとは構造的に無関係のようであるいくつかの蛋白質が存在する。これらには、*Dictyostelium*ミオシン重鎖キナーゼA(MHCKA)、*Physarum polycephalum*アクチンフラグミンキナーゼ、ヒトA6PTK、ヒトBCR、ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼおよび分枝鎖脂肪酸デヒドロゲナーゼキナーゼ、および原核生物"ヒスチジン"蛋白質キナーゼファミリーが含まれる。粘菌、虫、およびヒトeEF-2キナーゼホモログは、すべて蛋白質キナーゼ活性を有することが示されているが、予測GxGxxGATP結合モチーフの存在を除き、一般的蛋白質キナーゼとはほとんど似ていない。

【0036】

いわゆるヒスチジンキナーゼは原核生物において多く存在し、*E. coli*では20を越える類似物が存在し、酵母、糸状菌、および植物においても同定されている。これらのキナーゼは、外部刺激に応答して、2成分システムの一部として作用して、標的蛋白質中のアスパラギン酸のリン酸化を通してDNA複製、細胞分裂および分化を制御する。これまで、後生動物においては"ヒスチジン"キナーゼは同定されていないが、ミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDK)および分枝鎖アルファケト酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(BCKDキナーゼ)は配列において関連している。PDKおよびBCKDキナーゼは解糖、クエン酸サイクル、および蛋白質栄養不良における蛋白質合成の制御に関与する非典型的蛋白質キナーゼのユニークファミリーである。これらは構造的には"ヒスチジン"キナーゼのGボックス領域を含むC末端部分のみを保存している。BCKDキナーゼは、BCKD複合体のE1aサブユニットをSer-293でリン酸化し、これを機能的な蛋白質キナーゼとする。真の"ヒスチジン"キナーゼはまだヒトでは同定されていないが、これらはPDKを含む。

【0037】

いくつかの他の蛋白質は、蛋白質キナーゼ様ホモロジーを含み、これには、レセプターグアニリルシクラーゼ、ジアシルグリセロールキナーゼ、コリン/エタノールアミンキナーゼ、およびYLK1関連抗生物質耐性キナーゼが含まれる。これらのファミリーのそれぞれは、我々の低スコアE値でのプロファイル検索により認識されたが、先験的に蛋白質キナーゼとして機能するとは予測されなかった短いモチーフを含む。それよりも、類似性は、蛋白質進化のモジュール的性質および多様なリン酸転移酵素におけるATP結合の根本的な役割を単に反映しているのかもしれない。しかし、YLK1ファミリーの細菌ホモログに関する最近の2つの報告は、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(APH)が構造的および機能的に蛋白質キナーゼに関連することを示唆する。カナマイシン、ゲンタマイシンまたはアミカシンなどのアミノグリコシドに耐性の細菌から40を越えるAPHが同定されている。1つのよく特徴決定されたAPHの結晶構造は、cAMP依存性蛋白質キナーゼ(PKA)の触媒ドメインの2葉構造と40%

を越える構造的同一性を共有し、5本鎖のアンチパラレルベータシートから構成されるN末端ローブおよびすべての蛋白質キナーゼにおいて見いだされるいくつかの不変セグメントを含むC末端ローブのコアを含むことを明らかにする。APHは通常はベータ鎖1と2との間のループに存在するG x G x x Gを欠失しているが、ほとんどの蛋白質キナーゼに存在する12個の厳密に保存された残基の7個、例えばキナーゼサブドメインVIB中のHGD x x x Nの特徴的配列を含む。さらに、APHはまた蛋白質-セリン/トレオニンキナーゼ活性を示すことが明らかにされており、このことは、他のY L K関連分子が実際に機能的な蛋白質キナーゼであることを示唆する。

【0038】

真核生物脂質キナーゼ(P I 3 K, P I 4 K, およびP I P K)もまた、蛋白質キナーゼと類似するいくつかの短いモチーフを含むが、それ以外は最小限の一次配列類似性しか共有しない。しかし、ここでもまた、P I P K I I - ベータの構造分析は、一般の蛋白質キナーゼと著しく類似した保存されたA T P結合コアを明確にする。これらの酵素すべての中で3つの残基が保存されており、これには(P K A配列に対して)、A T Pのガンマリン酸に結合するL y s - 7 2, H R D L Kモチーフの一部であるA s p - 1 6 6および保存されたM g⁺⁺またはM n⁺⁺結合D F GモチーフからのA s p - 1 8 4が含まれる。虫ゲノムは12個のホスファチジルイノシトールキナーゼを含み、これには、3個のP I 3 - キナーゼ、2個のP I 4 - キナーゼ、3個のP I P 5 - キナーゼ、および4個のP I 3 - キナーゼ関連キナーゼが含まれる。後者のグループは4個の哺乳動物メンバー(D N A - P K, F R A P / T O R, A T M, およびA T R)を有し、これは、D N A障害に応答したゲノム一体性の維持に関与し、真の蛋白質キナーゼ活性を示すことが示されており、このため他のP I - キナーゼも蛋白質キナーゼとして作用する可能性が高い。これらが真の蛋白質キナーゼ活性を有するか否かにかかわらず、P I 3 - キナーゼは、多くの成長因子レセプターの下流での関与およびA K T蛋白質キナーゼにより媒介される細胞生存応答の上流アクチベータとしての関与により明らかなように、蛋白質キナーゼシグナリングに密接に関連している。

【0039】

発明の概要

本発明は、部分的には、ゲノム配列決定から同定されたヒト蛋白質キナーゼおよび蛋白質キナーゼ様酵素に関する。

【0040】

チロシンおよびセリン/トレオニンキナーゼ(PTKおよびSTK)が同定され、本発明の一部としてその蛋白質配列が予測された。バイオインフォマティクス戦略を用いてこれらのファミリーの哺乳動物メンバーが同定された。これらのキナーゼの部分配列または完全配列が、その分類、予測されたまたは推定された蛋白質構造とともに本明細書に記載される。

【0041】

本発明の1つの観点は、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドをコードする、同定された、単離された、濃縮されたまたは精製された核酸分子を特徴とする。

【0042】

核酸に関して"同定された"との用語は、これまでに知られていない新規蛋白質キナーゼの一部をコードすると予測されることに基づいて、ゲノム、EST、またはcDNA配列データベースから配列が選択されたことを意味する。

【0043】

核酸に関して"単離された"とは、互いに結合した10個(好ましくは21個、より好ましくは39個、最も好ましくは75個)またはそれ以上のヌクレオチドのポリマーを意味し、天然起源から単離された、またはセンス鎖または相補的なアンチセンス鎖として合成されるDNAおよびRNAが含まれる。本発明のある態様においては、より長い核酸が好ましく、例えば、300、600、900、1200、1500、またはそれ以上のヌクレオチドのもの、および/または配列番号1および配列番号2に記載される配列からなる群より選択される配列と、少なくとも50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の同一性を有するものが好ましい。

【0044】

本発明の単離された核酸は、これが自然には純粋なまたは分離された状態で見いだされないという点において独特である。"単離された"との用語の使用は、天然に生ずる配列がその通常の細胞環境(すなわち染色体)から除かれていることを表す。すなわち、配列は、無細胞溶液中にあってもよく、または異なる細胞環境に置かれていてもよい。この用語は、この配列が存在する唯一のヌクレオチド鎖であることを意味するものではなく、天然にこれに付随する非ヌクレオチド物質を本質的に含まず(少なくとも約90-95%純粋)、したがって、単離された染色体とは区別されることを意味する。

【0045】

核酸に関連して、"濃縮された"との用語の使用は、特定のDNAまたはRNA配列が、目的とする細胞または溶液中に存在する総DNAまたはRNA中で、正常または疾病細胞、またはこの配列が由来する細胞におけるより有意に高い割合(2-5倍)を占めることを意味する。これは、存在する他のDNAまたはRNAの量の優先的減少、または特定のDNAまたはRNA配列の量の優先的増加、またはこれらの2つの組み合わせにより、人が生じさせることができる。しかし、濃縮されたとは、他のDNAまたはRNA配列が存在しないことを意味するものではなく、単に、目的とする配列の相対的な量が有意に増加されていることを意味することに注意すべきである。"有意に"との用語は、増加のレベルがそのような増加を作成した人にとって有用であることを示すために用いられ、一般に、他の核酸に比べて少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも5-10倍、またはそれ以上増加していることを意味する。またこの用語は、他の起源からのDNAまたはRNAが存在しないことを意味するものではない。他の起源のDNAは、例えば、酵母または細菌ゲノム、またはクローニングベクター、例えばpUC19からのDNAでありうる。この用語は、1つのmRNAのレベルが他の種のmRNAと比較して自然に増加している天然に生ずる事象、例えばウイルス感染または腫瘍タイプの成長から区別される。すなわち、この用語は、人が介在して所望の核酸の比率を上昇させる状況のみをカバーする。

【0046】

ある目的のためには、ヌクレオチド配列が精製された形であることも有利である。核酸に関して、"精製された"との用語は、絶対的純度（例えば均一な調製物）を要求するものではない。むしろ、これは配列が天然の環境におけるより比較的純粋であることを示す（天然のレベルと比較して、このレベルは、例えばmg/mLで少なくとも2 - 5倍高い）。cDNAライブラリから単離された個々のクローンは、電気泳動的に均一にまで精製することができる。これらのクローンから得られた本発明のDNA分子は、総DNAからまたは総RNAから直接得ることができる。cDNAクローンは天然に生じず、好ましくは部分的に精製した天然に生ずる物質（メッセンジャーRNA）の操作により得る。mRNAからのcDNAライブラリの構築は、合成物質（cDNA）の作成を含み、純粋な個々のcDNAクローンは、cDNAライブラリを有する細胞のクローン選択により合成ライブラリから単離することができる。すなわち、mRNAからcDNAライブラリを構築し、個々のcDNAクローンを単離することを含む工程により、天然のメッセンジャーのおよそ 10^6 倍の精製が得られる。すなわち、少なくとも1桁、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁の精製が明示的に企図される。

【0047】

"キナーゼポリペプチド"とは、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド中の、32個（好ましくは40、より好ましくは45、最も好ましくは55個）またはそれ以上の連続するアミノ酸を意味する。ある観点においては、100、200、300、400、450、500、550、600、700、800、900個またはそれ以上のアミノ酸のポリペプチドが好ましい。キナーゼポリペプチドは、ポリペプチドの機能的活性が保持される限り、完全長核酸配列または完全長核酸配列の任意の部分（例えば、本明細書において定義される"フラグメント"）、例えば、触媒ドメイン（本明細書において定義される）またはその一部によりコードされることができる。当業者は、キナーゼまたはキナーゼ様活性、例えば本明細書において定義される触媒的活性を示すこれらの触媒ドメインまたはその一部を選択することができるであろう。遺伝コードの縮重のため、多数の異なる核

酸配列が同じアミノ酸配列をコードしうることは当該技術分野においてよく知られている。同じく、アミノ酸の保存的変更を行って、元の機能を保持している蛋白質またはポリペプチドを得ることができることも、当該技術分野においてよく知られている。そのような置換には、アミノ酸を類似の物理化学的特性を有する残基で置き換えること、例えば、1つの脂肪族残基(Ile, Val, LeuまたはAla)を別のもので、または塩基性残基LysとArg, 酸性残基GluとAsp, アミド残基GlnとAsn, ヒドロキシル残基SerとTyr, または芳香族残基PheとTyrとの間で置き換えることが含まれる。蛋白質全体に対して、あったとしてもわずかの影響しか与えないアミノ酸の交換を作成することに関するさらなる情報は、Bowie et al., Science, 1990, 247, 1306 - 1310に見いだすことができる(図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)。すべての場合において、すべての順列が本明細書の開示によりカバーされることが意図される。

【0048】

本発明のキナーゼペプチドのアミノ酸配列は、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列、または対応する完全長アミノ酸配列、またはそのフラグメントを有する配列に実質的に類似するであろう。

【0049】

配列番号3および配列番号4に記載される配列からなる群より選択される配列と実質的に類似する配列は、好ましくは配列と少なくとも90%の同一性(より好ましくは少なくとも95%, 最も好ましくは99 - 100%)を有するであろう。

【0050】

"同一性"とは、その類似性または関係の尺度である配列の性質を意味する。同一性は、同一である残基の数を、既知の配列または既知の配列のドメイン中の残基の総数で割り、100を乗ずることにより測定する。"ギャップ"とは、アミノ酸の付加または欠失により生じたアラインメント中の空間である。すなわち、完全に同一の配列の2つのコピーは100%の同一性を有するが、より低い程度に

保存され、欠失、付加または置換を含む配列はより低い程度の同一性を有するであろう。当業者は、標準的なパラメータを用いて配列の同一性を決定するためのいくつかのコンピュータプログラム、例えば、Gapped BLASTまたはPSI-BLAST(Altschul, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402), BLAST(Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410), およびスミス-ウォーターマン(Smith-Waterman)(Smith, et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 147:195-197)が利用可能であることを認識するであろう。好ましくは、これらのプログラムのデフォルト設定を用いるが、当業者は、これらの設定を変更することが必要であるか否かを認識しており、どのようにして変更するを理解している。

【0051】

"類似性"は、同一の残基の数と保存的に置換された残基の数(Bowie, et al. *Science*, 1999, 247, 1306-1310を参照(図面および表を含め、その全体を本明細書の一部としてここに引用する)との合計を残基とギャップの総数で割り、100を乗ずることにより測定することができる。

【0052】

好ましい態様においては、本発明は、以下のヌクレオチド配列を含むキナーゼポリペプチドをコードする、単離された、濃縮されたまたは精製された核酸分子を特徴とする：

- (a) 配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする；
- (b) (a)のヌクレオチド配列の相補体である；
- (c) (a)のヌクレオチド分子に高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ天然に生ずるキナーゼポリペプチドをコードする；
- (d) 配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、ただしN末端ドメイン、触媒ドメイン、C末端

触媒ドメイン，C末端ドメイン，コイルドコイル構造領域，プロリンリッチ領域，スペーサー領域，およびC末端テールからなる群より選択されるドメインの全部ではないが1またはそれ以上を欠失しているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする；および

(e)(d)のヌクレオチド配列の相補体である。

【0053】

"相補体"との用語は，互いに多くの望ましい相互作用を形成しうる2つのヌクレオチドを表す。例えば，アデニンはチミンと2つの水素結合を形成することができるため，チミンに相補的である。同様に，グアニンとシトシンは3つの水素結合を形成することができるため，相補的である。あるヌクレオチド配列は，第1の配列のすべてのヌクレオチドが第2の配列のすべてのヌクレオチドと相補的である場合，他のヌクレオチド配列の相補体である。

【0054】

所望の特異性および選択性に応じて，種々の低いまたは高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を用いることができる。これらの条件は，当業者にはよく知られている。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下では，高度に相補的な核酸配列のみがハイブリダイズする。好ましくは，そのような条件は，20個の連続するヌクレオチド中に1または2個より多いミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止し，より好ましくは，そのような条件は，50個の連続するヌクレオチド中に1または2個より多いミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止し，最も好ましくは，そのような条件は，100個の連続するヌクレオチド中に1または2個より多いミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。場合によっては，この条件は，全長配列中に5個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。

【0055】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件とは，少なくとも以下の程度にストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件を意味する：50%ホルムアミド，5XSSC，50mM NaH_2PO_4 ，pH6.8，0

．5% SDS，0.1 mg/mL 超音波処理サケ精子DNA，および5 X デンハルト溶液中で42℃で一夜のハイブリダイゼーション；2 X SSC，0.1% SDSで45℃での洗浄；および0.2 X SSC，0.1% SDSで45℃での洗浄。いくつかの最もストリンジेंटなハイブリダイゼーションアッセイ条件においては，2回目の洗浄は，0.1 X SSCで70℃までの温度で行うことができる (Berger et al (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, pg 421 (図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する))。しかし，他の用途は，これらの条件の組の間に入る条件の使用を必要とするかもしれない。所望のハイブリダイゼーションを達成するのに必要な条件を決定する方法は当業者にはよく知られており，いくつかの因子，例えば，限定されないが，ハイブリダイズすべき配列および試験すべき試料に基づく。低いストリンジエンシーの洗浄条件は，しばしば洗浄工程の間により低い温度，例えば，65℃，60℃，55℃，50℃，または42℃を用いる。

【0056】

"ドメイン"との用語は，特定の機能を含むポリペプチドの領域を表す。例えば，シグナル伝達蛋白質のN末端またはC末端ドメインは，例えば，限定されないが，シグナル伝達分子を細胞の異なる領域に局在させる分子に結合し，特定の細胞シグナルを伝播するのに直接関与する他のシグナリング分子に結合する，等の機能を提供することができる。あるドメインは蛋白質の残部と別々に発現させてそれ自身で機能することができるが，他のドメインはその機能を保持するためには無傷の蛋白質の一部のままでなければならない。後者は蛋白質の機能的領域とも称され，これもまたドメインと関連する。

【0057】

"N末端ドメイン"との用語は，蛋白質キナーゼの開始メチオニンと触媒的ドメインとの間に位置する触媒外領域を表す。N末端ドメインは，蛋白質配列を非重複蛋白質データベースに対してスミス-ウォーターマンアラインメントを行い，触媒的ドメインのN末端境界を規定することにより同定することができる。N末端ドメインは，その長さに応じて，キナーゼ機能において制御的役割を果たすか

または果たさない。N末端ドメインが制御的役割を果たすことが知られている蛋白質キナーゼの例はPAK65であり、これはCdc42およびrac結合に用いられるCRIBモチーフを含む(Burbelo, P.D. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 29071-29074)。

【0058】

"触媒ドメイン"との用語は、典型的に25-300アミノ酸の長さであり、高エネルギーリン酸ドナー分子、例えばATPまたはGTPからそれ自身へ(自己リン酸化)または他の蛋白質へ(外因性リン酸化)のリン酸転移反応を担う、蛋白質キナーゼの領域を表す。蛋白質キナーゼの触媒ドメインは、適切なポリペプチドの折り畳みおよび触媒作用を担う高度に保存されたアミノ酸残基を含む12個のサブドメインから構成されている。触媒ドメインは、蛋白質配列を非重複蛋白質データベースに対してスミス-ウォーターマンアラインメントを行うことにより同定することができる。

【0059】

本明細書において用いる場合、"触媒活性"との用語は、キナーゼ触媒ドメインが基質をリン酸化する速度を規定する。触媒活性は、例えば、リン酸化された生成物に変換される基質の量を時間の関数として決定することにより測定することができる。触媒活性は、時間を一定にして定められた時間の後にリン酸化された基質の濃度を決定することにより、本発明の方法により測定することができる。基質のリン酸化は、蛋白質キナーゼの活性部位において生ずる。活性部位は、通常は、基質が蛋白質キナーゼに結合し、リン酸化される空洞である。

【0060】

本明細書において用いる場合、"基質"との用語は、本発明のキナーゼによりリン酸化される分子を表す。キナーゼは、セリン/トレオニンまたはチロシンアミノ酸で基質をリン酸化する。分子は別の蛋白質またはポリペプチドであってもよい。

【0061】

"C末端ドメイン"との用語は、蛋白質キナーゼの触媒ドメインまたは最後の(C末端に最も近い位置の)機能的ドメインとカルボキシ末端アミノ酸残基との間

に位置する領域を表す。"機能的"ドメインとは、他の蛋白質に対するアミノ酸配列ホモロジーから、または特定の構造的コンフォメーションを与えるであろうアミノ酸配列の存在（例えばN末端ドメイン）により、制御的または触媒的役割を果たすであろう、ポリペプチドの任意の領域を意味する。C末端ドメインは、非重複蛋白質データベースに対して蛋白質配列のスミス・ウォーターマンアラインメントを用いて、触媒ドメインまたは任意の機能的なC末端の触媒外ドメインのC末端境界を規定することにより同定することができる。その長さおよびアミノ酸組成に依存して、C末端ドメインは、キナーゼ機能において制御的機能を果たすかもしれないし果たさないかもしれない。そのC末端ドメインが制御的役割を果たすかもしれない蛋白質キナーゼの例はPAK3であり、これはそのC末端近くにヘテロ三量体G_βサブユニット結合部位を含む（Leeuw, T. et al. (1998) Nature, 391, 191-195）。本発明のいくつかのキナーゼについては、C末端ドメインはまた触媒ドメインを含むかもしれない（上述）。

【0062】

本明細書において用いる場合、"C末端テール"との用語は、ホモロジーにより、その最も近いホモログのC末端アミノ酸を越えて伸長または突出している蛋白質キナーゼのC末端ドメインを表す。C末端テールは、蛋白質配列を非重複蛋白質データベースに対してスミス・ウォーターマン配列アラインメントを用いることにより、またはDNASTARプログラムMegalignを用いる相同な配列の多重配列アラインメントにより、同定することができる。C末端テールは、その長さに依存して、キナーゼ機能において制御的役割を果たすかもしれないし果たさないかもしれない。

【0063】

本明細書において用いる場合、"コイルドコイル構造領域"との用語は、コンピュータアルゴリズム、例えばCOILS（Lupas, A. (1996) Meth. Enzymology 266: 513-525）により推定してコイルドコイル構造をとる可能性が高いポリペプチド配列を表す。コイルドコイルは、平行な2または3個の両親媒性 - ヘリックスから形成される。コイルドコイルは

、他のポリペプチドのコイルドコイルドメインと結合してホモ二量体またはヘテロ二量体を生ずることができる (Lupas, A. (1991) Science 252: 1162 - 1164)。コイルドコイル依存性オリゴマー化は、蛋白質機能、例えばセリン/トレオニンキナーゼの触媒活性に必要であることが示されている (Roe, J. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272: 5838 - 5845)。

【0064】

本明細書において用いる場合、"プロリンリッチ領域"との用語は、蛋白質キナーゼの、所定のアミノ酸長さにわたるプロリン含量が蛋白質において見いだされるこのアミノ酸の平均含量より高い(すなわち、>10%)領域を表す。プロリンリッチ領域は、アミノ酸配列を目で調べることにより容易に識別され、標準的なコンピュータ配列分析プログラム、例えばDNAStarプログラムEditSeqにより定量することができる。プロリンリッチ領域は、制御的な蛋白質-蛋白質相互作用に関与することが示されている。これらの相互作用の中で、本発明に最も関連性が深いものには、ある種の蛋白質キナーゼ(例えばヒトPAK1)およびアダプター分子NckのSH3ドメインに見いだされる"PxxP"プロリンリッチモチーフが関与する (Galisteo, M. L. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 20997 - 21000)。“PxxP”プロリンリッチモチーフが関与する他の制御的相互作用にはWWドメインがある (Sudol, M. (1996) Prog. Biophys. Mol. Bio. 65: 113 - 132)。

【0065】

本明細書において用いる場合、“スペーサー領域”との用語は、予測される機能的ドメインの間に位置する蛋白質キナーゼの領域を表す。スペーサー領域は、データベース中の任意のアミノ酸配列に対する検出可能なホモロジーを有しない。これは、非重複蛋白質データベースに対して蛋白質配列のスミスウォーターマンアラインメントを用いて、これを挟む機能的ドメインのCおよびN末端境界を規定することにより同定することができる。スペーサー領域は、蛋白質キナーゼ機能において基本的な機能を果たすかもしれず果たさないかもしれない。スペーサ

一領域のキナーゼ機能における制御的役割の先例は、srcキナーゼスペーサーのドメイン間相互作用における役割により提供される(Xu, W. et al (1997) Nature 385:595-602)。

【0066】

本明細書において用いる場合、"挿入物"との用語は、蛋白質キナーゼの密接なホモロジーを有しない一部を表す。挿入物は、エクソンの選択的スプライシングの産物であるかもしれないしそうではないかもしれない。挿入物は、蛋白質配列の非重複蛋白質データベースに対するスミス-ウォーターマン配列アラインメントを用いて、またはDNASTARプログラムMegalignを用いる相同な配列の多重配列アラインメントにより、同定することができる。挿入物は、蛋白質-蛋白質相互作用のための新規なインターフェースを提示することにより、またはそのような相互作用を妨害することにより、機能的役割を果たすかもしれない。

【0067】

"シグナル伝達経路"との用語は、細胞外シグナルを細胞膜を通して伝播し、細胞内シグナルとなる分子を表す。このシグナルは、次に細胞性応答を刺激することができる。シグナル伝達プロセスに参与するポリペプチド分子は、典型的にはレセプターおよび非レセプター蛋白質チロシンキナーゼ、レセプターおよび非レセプター蛋白質ホスファターゼ、SRCホモロジー2および3ドメイン、ホスホチロシン結合蛋白質(SRCホモロジー2(SH2)およびホスホチロシン結合(PTBおよびPH)ドメイン含有蛋白質)、プロリンリッチ結合蛋白質(SH3ドメイン含有蛋白質)、GTPase、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、プロリルイソメラーゼ、プロテアーゼ、Ca²⁺結合蛋白質、cAMP結合蛋白質、グアニルシクラーゼ、アデニルシクラーゼ、NO生成蛋白質、ヌクレオチド交換因子および転写因子である。

【0068】

別の好ましい態様においては、本発明は、キナーゼポリペプチドをコードし、宿主細胞において転写を開始するのに有効なベクターまたはプロモーターをさらに含む、単離された、濃縮されたまたは精製された核酸分子を特徴とする。本発

明はまた、組換え核酸を特徴とし、これは好ましくは細胞または生物内にある。組換え核酸は、配列番号1および配列番号2に記載される配列からなる群より選択される配列、またはその機能的誘導体、および宿主細胞において転写を開始させるのに有効なベクターまたはプロモーターを含むことができる。あるいは、組換え核酸は、細胞において機能的な転写開始領域、キナーゼポリペプチドをコードするRNA配列に相補的な配列および細胞において機能的な転写終止領域を含んでいてもよい。特定のベクターおよび宿主細胞の組み合わせは本明細書において議論される。

【0069】

"ベクター"との用語は、細胞にトランスフェクトすることができ、細胞ゲノム中でまたはそれとは独立に複製しうる一本鎖または二本鎖の環状核酸分子を表す。環状二本鎖核酸分子は、制限酵素で処理することにより切断し、したがって直鎖状にすることができる。核酸ベクターの分類、制限酵素、および制限酵素により切断されるヌクレオチド配列の知識は、当業者には容易に入手可能である。キナーゼをコードする核酸分子は、ベクターを制限酵素で切断し、2つの断片を一緒にライゲーションすることにより、ベクター中に挿入することができる。

【0070】

"トランスフェクトする"との用語は、核酸ベクターまたは他の核酸分子を細胞性生物中に挿入する多数の方法を規定する。これらの方法には、種々の手法が含まれ、例えば、細胞を高濃度の塩、電界、界面活性剤、またはDMSOで処理することにより、細胞の外膜または壁を目的の核酸分子に対して透過性にする、または種々のウイルス伝達戦略を用いることが含まれる。

【0071】

本明細書において用いる場合、"プロモーター"との用語は、遺伝子配列の発現に必要な核酸配列を表す。プロモーター領域は生物によって様々であるが、種々の生物について当業者によく知られている。例えば、原核生物においては、プロモーター領域は、プロモーター（RNA転写の開始を指示する）ならびに、RNAに転写されたときに合成の開始を合図するDNA配列の両方を含む。そのような領域は、通常は転写および翻訳の開始に關与する5'非コーディング配列、例

例えばTATAボックス，キャッピング配列，CAAT配列等を含む。

【0072】

好ましい態様においては，単離された核酸は，配列番号1および配列番号2に記載される配列からなる群より選択される核酸配列を含むか，本質的にそれからなるか，それからなり，かつ，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列，その機能的誘導体，または配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択される少なくとも35，40，45，50，60，75，100，200，または300個の連続するアミノ酸をコードする。核酸は，cDNAクローニングにより，またはサブトラクティブハイブリダイゼーションにより，天然の起源から単離することができる。天然の起源は哺乳動物であることができ，好ましくはヒト，好ましくは血液，精液または組織であり，核酸はトリエステル法によりまたは自動化DNA合成機を用いることにより合成してもよい。

【0073】

"哺乳動物"とは，好ましくはマウス，ラット，ウサギ，モルモット，ヒツジ，およびヤギ等の生物を表し，より好ましくはネコ，イヌ，有尾サル，および無尾サルを表し，最も好ましくはヒトを表す。

【0074】

さらに別の好ましい態様においては，核酸は，例えば，追加のポリペプチドの同定およびクローニングを容易にするためのハイブリダイゼーションプローブを設計するのに，追加のポリペプチドのクローニングを容易にするためのPCRプローブを設計するのに，ポリペプチド領域に対する抗体を得るために，およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計するのに有用な，保存されたまたは独特の領域である。

【0075】

"保存された核酸領域"とは，キナーゼポリペプチドをコードする2つまたはそれ以上の核酸に存在する領域を意味し，特定の核酸配列は低いストリンジェンシー条件下でこの領域にハイブリダイズすることができる。キナーゼポリペプチドをコードする核酸のスクリーニングに適した低ストリンジェンシー条件の例は，

Wahl et al. Meth. Enzym. 152:399-407 (1987) および Wahl et al. Meth. Enzym. 152:415-423 (1987) (図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する) に提供される。好ましくは、保存領域は、20ヌクレオチド中5個以下で異なり、より好ましくは20ヌクレオチド中2個、最も好ましくは20ヌクレオチド中1個が異なる。

【0076】

"独特の核酸領域"とは、キナーゼポリペプチドをコードする核酸中に存在し、天然に生ずる任意の他のポリペプチドをコードする配列中には存在しない配列を意味する。そのような領域は、好ましくは32個(好ましくは40個、より好ましくは45個、最も好ましくは55個)またはそれ以上の連続するアミノ酸、例えば、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする。特に、独特の核酸領域は、好ましくは哺乳動物起源のものである。

【0077】

本発明の別の観点では、試料において、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドをコードする核酸を検出するための核酸プローブを特徴とする。核酸プローブは、配列番号1および配列番号2、またはその機能的誘導体に記載される配列からなる群より選択される配列にハイブリダイズするであろうヌクレオチド塩基配列を含む。

【0078】

好ましい態様においては、核酸プローブは、少なくとも12, 32, 75, 90, 105, 120, 150, 200, 250, 300または350個の連続するアミノ酸をコードする核酸にハイブリダイズし、ここで、核酸配列は、配列番号1および配列番号2、またはその機能的誘導体からなる群より選択される。

【0079】

プローブを使用する方法には、ハイブリダイゼーションが生ずるような条件下で試料を核酸プローブと接触させ、キナーゼRNAに結合したプローブの存在ま

たは量を検出することにより，試料中のキナーゼRNAの存在または量を検出することが含まれる。プローブとキナーゼポリペプチドをコードする核酸配列との間に形成される核酸デュプレックスを，検出された核酸の配列の同定において用いることができる(Nelson et al., Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, San Diego, Kricka, ed., p. 275, 1992 (図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)。そのような方法を実施するためのキットは，その中に核酸プローブが置かれている容器手段を含むように構築することができる。

【0080】

プローブを使用する方法には，これらのプローブを用いて，例えば当該技術分野において知られる技術を用いて予測キナーゼのそれぞれの完全長クローンを見いだすことも含まれる。これらのクローンは，コードされるキナーゼの触媒的活性を阻害し，癌，免疫関連疾病および疾患，心臓血管疾病，脳またはニューロン関連疾病，および代謝性疾患の治療において潜在的有用性を有する小分子化合物をスクリーニングするのに有用であろう。より詳細には，疾患には，組織，血液，または造血細胞起源の癌，特に乳，結腸，肺，前立腺，子宮頸部，脳，卵巣，膀胱，または腎臓が関与する癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態，例えば，片頭痛，痛み，性的機能不全，気分障害，注意障害，認識障害，低血圧症，および高血圧症；精神病性および神経学的疾患，例えば不安，精神分裂病，躁うつ病，せん妄，痴呆，重症の精神遅滞および運動異常症，例えばハンチントン病またはツレット症候群；神経変性性疾患，例えばアルツハイマー病，パーキンソン病，多発性硬化症，および筋萎縮性側索硬化症；HIV 1，HIV - 2または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患，例えば糖尿病および肥満およびこれに関連する症候群，特に，心臓血管疾患，例えば再灌流再狭窄，冠状動脈血栓症，凝固疾患，制御されない細胞成長疾患，アテローム性動脈硬化症；眼性疾患，例えば緑内障，網膜症，および黄斑変性；炎症性疾患，例えば慢性関節リウマチ，慢性炎症性腸疾病，慢性炎症性骨盤疾病，多発性硬化症，ぜん息，変形性

関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植拒絶が含まれる。

【0081】

別の観点においては，本発明は，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドをコードする核酸分子を含む組換え細胞または組織を記述する。そのような細胞においては，核酸は遺伝的制御要素の制御下にあってもよく，または外来性プロモーターを含む外来性制御要素の制御下にあってもよい。"外来性"とは，通常はキナーゼポリペプチドのコーディング配列とインビボで転写的にカップリングしていないプロモーターを意味する。

【0082】

ポリペプチドは，好ましくは，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列によりコードされる蛋白質のフラグメントである。"フラグメント"とは，キナーゼポリペプチド中に存在するアミノ酸配列を意味する。好ましくは，そのような配列は，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択される配列の，少なくとも32，45，50，60，100，200，または300個の連続するアミノ酸を含む。

【0083】

別の観点においては，本発明は，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する，単離された，濃縮されたまたは精製されたキナーゼポリペプチドを特徴とする。

【0084】

ポリペプチドに関して"単離された"とは，互いに結合した6個（好ましくは12個，より好ましくは18個，最も好ましくは25，32，40，または50個）またはそれ以上のアミノ酸のポリマーを意味し，天然起源から単離されたポリペプチドまたは合成されたポリペプチドが含まれる。ある種の観点においては，より長いポリペプチド，例えば，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む，100，200，30

0, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900個またはそれ以上の連続するアミノ酸を含むものが好ましい。

【0085】

本発明の単離されたポリペプチドは、天然には純粋なまたは分離された形で見いだされない点において独特である。"単離された"との用語の使用は、天然に生ずる配列がその正常な細胞性環境から除かれていることを示す。すなわち、配列は、無細胞溶液中にあってもよく、異なる細胞性環境に置かれていてもよい。この用語は、その配列が存在する唯一のアミノ酸鎖であることを意味するものではなく、配列が天然にこれに付随する非アミノ酸物質を本質的に含まない(少なくとも約90 - 95%純粋)ことを意味する。

【0086】

ポリペプチドに関して使用する場合、"濃縮された"との用語は、特定のアミノ酸配列が、正常または疾病細胞におけるより、または配列が由来する細胞におけるより、目的とする細胞または溶液中に存在する総アミノ酸配列の有意に高い割合(2 - 5倍)を占めることを意味する。これは、存在する他のアミノ酸配列の量の優先的減少により、または目的とする特定のアミノ酸配列の量の優先的増加により、またはこれら2つの組み合わせにより、人が生じさせることができる。しかし、濃縮されたとは、他のアミノ酸配列が存在しないことを意味するものではなく、単に目的とする配列の相対的な量が有意に増加していることを意味することに注意すべきである。本明細書において"有意"にとの用語は、増加のレベルがそのような増加を作成した人にとって有用であることを示し、一般に、他のアミノ酸配列と比較して少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも5 - 10倍、またはそれより多い増加を意味する。この用語はまた、他の起源からのアミノ酸配列が存在しないことを意味するものではない。アミノ酸配列の他の起源は、例えば、酵母または細菌のゲノム、またはクローニングベクター、例えばpUC19によりコードされるアミノ酸配列を含みうる。この用語は、人が介在して所望のアミノ酸配列の比率を増加させる状況のみをカバーすることを意味する。

【0087】

ある目的のためには、アミノ酸配列が精製された形であることも有利である。

ポリペプチドに関して"精製された"との用語は絶対的純度（例えば均一調製物）を要求するものではなく、この用語は配列が天然の環境におけるより比較的純粋であることを示す。天然のレベルと比較して、このレベルは少なくとも2 - 5倍高くあるべきである（例えばmg/mLで）。少なくとも1桁の精製、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁の精製が明示的に意図される。物質は、好ましくは機能的に有意なレベルで夾雑物を含まず、例えば、90%、95%、または99%純粋である。

【0088】

好ましい態様においては、キナーゼポリペプチドは、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列によりコードされる蛋白質のフラグメントである。好ましくは、キナーゼポリペプチドは、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列、またはその機能的誘導体からなる群より選択される配列の、少なくとも32、45、50、60、100、200、または300個の連続するアミノ酸を含む。

【0089】

好ましい態様においては、キナーゼポリペプチドは、(a)配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；および(b)配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、ただし、C末端触媒ドメイン、N末端ドメイン、触媒ドメイン、C末端ドメイン、コイルドコイル構造領域、プロリンリッチ領域、スペーサー領域、およびC末端テールからなる群より選択されるドメインの1またはそれ以上が欠失している配列；を有するアミノ酸配列を含む。

【0090】

ポリペプチドは、当該技術分野においてよく知られる方法により、天然の起源から単離することができる。天然の起源は哺乳動物であることができ、好ましくはヒトであり、好ましくは、血液、精液、または組織であり、またはポリペプチドは自動化ポリペプチド合成機を用いて合成してもよい。

【0091】

ある態様においては、本発明は、(a)配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する組換えキナーゼポリペプチドを含む。"組換えキナーゼポリペプチド"とは、その存在位置(例えば、天然に見いだされる物とは異なる細胞または組織に存在)、純度または構造において天然に生ずるポリペプチドと区別されるように、組換えDNA技術により製造されるポリペプチドを意味する。一般に、そのような組換えポリペプチドは、天然に通常観察される量とは異なる量で細胞中に存在するであろう。

【0092】

宿主細胞中で発現させるべきポリペプチドは、異種蛋白質からの領域を含む融合蛋白質であってもよい。そのような領域を含むことにより、例えば、分泌させ、安定性を改良し、またはポリペプチドの精製を容易にすることができる。例えば、適当なシグナルペプチドをコードする配列を発現ベクター中に組み込むことができる。シグナルペプチド(分泌リーダー)のDNA配列を、ポリペプチドがシグナルペプチドを含む融合蛋白質として翻訳されるように、ポリヌクレオチド配列にインフレームで融合させることができる。意図する宿主細胞において機能的であるシグナルペプチドは、ポリペプチドの細胞外分泌を促進する。好ましくは、シグナル配列はポリペプチドが細胞から分泌される際にポリペプチドから切断される。すなわち、キナーゼポリペプチドのN末端が運搬ペプチドに融合されている好ましい融合蛋白質を作成することができる。

【0093】

1つの態様においては、ポリペプチドは、ポリペプチドの精製を容易にするために用いられる異種領域を含む融合蛋白質を含む。そのような機能のために用いられる入手可能なペプチドの多くは、融合蛋白質が結合パートナーに選択的に結合することを可能とする。好ましい結合パートナーには、プロテインAのIgG結合ドメインの1またはそれ以上が含まれ、融合蛋白質は、IgG結合セファローズ等のアフィニティークロマトグラフィーにより容易に均一にまで精製される。あるいは、多くのベクターは、標的蛋白質のN末端またはC末端で発現されることができるヒスチジン残基のストレッチを有するという利点を有しており、したがって、金属キレート化クロマトグラフィーにより目的とする蛋白質を回収す

ることができる。蛋白質加水分解酵素，例えばエンテロキナーゼ，ファクターXプロコラゲナーゼまたはトロンビンの認識部位をコードするヌクレオチド配列をキナーゼポリペプチドの配列のすぐ上流に配置すると，融合蛋白質を切断して成熟キナーゼポリペプチドを得ることができる。融合蛋白質結合パートナーのさらなる例には，限定されないが，酵母I - 因子，sf9昆虫細胞におけるミツバチメラチンリーダー，6 - His タグ，チオレドキシントグ，ヘマグルチニンタグ，GSTタグ，およびOmp Aシグナル配列タグが含まれる。当業者には理解されるように，ペプチドを認識しこれに結合する結合パートナーは，任意のイオン，分子または化合物であることができ，例えば金属イオン（例えば金属アフィニティーカラム），抗体，またはそのフラグメント，およびペプチドに結合する任意の蛋白質またはペプチド，例えばFLAGタグが含まれる。

【0094】

別の観点においては，本発明は，キナーゼポリペプチドまたはキナーゼポリペプチドドメインまたはフラグメントに対して特異的結合親和性を有する抗体（例えば，モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体）を特徴とし，ここで，ポリペプチドは，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択される。"特異的結合親和性"とは，抗体が，特定の条件下において，他のポリペプチドに結合するより高い親和性をもって標的キナーゼポリペプチドに結合することを意味する。抗体または抗体フラグメントは，他のポリペプチドに結合しうる領域を含むポリペプチドである。"特異的結合親和性"との用語は，特定の条件下で，他のポリペプチドに結合するより高い親和性をもってキナーゼポリペプチドに結合する抗体を記述する。抗体を用いて，キナーゼポリペプチドの内因性起源を同定して，細胞サイクル制御をモニターすることができ，または，キナーゼポリペプチドの細胞中の免疫局在化に用いることができる。

【0095】

"ポリクローナル"との用語は，抗原またはその抗原性機能的誘導体で免疫した動物の血清から誘導される抗体分子の異成分集団である抗体を表す。ポリクローナル抗体の製造のためには，種々の宿主動物に抗原を注射することにより免疫す

ることができる。宿主の種により、種々のアジュバントを用いて免疫学的応答を増加させることができる。

【0096】

"モノクローナル抗体"は、特定の抗原に対する抗体の実質的に均一な集団である。モノクローナル抗体は、培養連続細胞株による抗体分子の生成を与える任意の技術により得ることができる。モノクローナル抗体は、当業者に知られる方法により得ることができる(Kohler et al. Nature 256: 495-497, 1975, および米国特許4,376,110(これらの両方は、図面または表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する))。

【0097】

"抗体フラグメント"との用語は、特定の分子に対して特異的結合親和性を表示する抗体の一部、しばしば超可変領域および周囲の重鎖および軽鎖の一部を表す。超可変領域は、抗体のポリペプチド標的に物理的に結合する部分である。

【0098】

本発明のキナーゼポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体または抗体フラグメントは、試料をキナーゼ-抗体免疫複合体の形成に適した条件下で抗体で探索し、キナーゼポリペプチドに結合した抗体の存在および/または量を検出することにより、試料中のキナーゼポリペプチドの存在および/または量を検出する方法において用いることができる。そのような方法を実施するための診断キットは、キナーゼに特異的な抗体または抗体フラグメント、ならびに抗体の結合パートナーまたは抗体それ自体のコンジュゲートを含むように構築することができる。

【0099】

本発明のキナーゼポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体または抗体フラグメントは、原核生物または真核生物から単離、濃縮、または精製することができる。当業者に知られる日常的な方法により、原核生物および真核生物の両方において、抗体または抗体フラグメントを製造することができる。ポリペプチド分子である抗体の精製、濃縮および単離は、上に記載される。

【0100】

本発明のキナーゼポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体は、免疫複合体が形成するような条件下で試料を抗体と接触させ、キナーゼポリペプチドに結合した抗体の存在および/または量を検出することにより、試料中のキナーゼポリペプチドの存在および/または量を検出するための方法において用いることができる。そのような方法を実施するための診断キットは、抗体を含む第1の容器および抗体の結合パートナーおよび標識（例えば放射性同位体）を含む第2の容器を含むように構築することができる。診断キットはまた、FDAに認可された使用の通知およびその指針を含んでいてもよい。

【0101】

別の観点においては、本発明は、キナーゼポリペプチドまたはキナーゼポリペプチドドメインに対して特異的結合親和性を有する抗体を産生するハイブリドーマを特徴とし、ここで、ポリペプチドは、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択される。"ハイブリドーマ"とは、抗体、例えば本発明のキナーゼに対する抗体を分泌しうる不死化細胞株を意味する。好ましい態様においては、キナーゼに対する抗体は、本発明のキナーゼポリペプチドに特異的に結合することができるアミノ酸の配列を含む。

【0102】

別の観点においては、本発明はまた、上述したいずれかの核酸分子によりコードされるポリペプチドに結合する抗体、および負対照抗体を含むキットに関する。

【0103】

"負対照抗体"との用語は、特異的結合親和性を有する抗体と類似の起源に由来するが、本発明のポリペプチドに対して結合親和性を示さない抗体を表す。

【0104】

別の観点においては、本発明は、(a)配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択されるキナーゼポリペプチドに結合することができるキナーゼポリペプチド結合剤を特徴とする。結合剤は、好ましくは、本発明のキナーゼポリペプチド上に存在

するエピトープを認識する精製された抗体である。他の結合剤には、キナーゼポリペプチドに結合する分子およびキナーゼポリペプチドに結合する類似の分子が含まれる。そのような結合剤は、キナーゼ結合パートナー活性を測定するアッセイ、例えばPDGFR活性を測定するアッセイを用いて同定することができる。

【0105】

本発明はまた、本発明のキナーゼポリペプチドまたは同等の配列を含むヒト細胞をスクリーニングする方法を特徴とする。該方法は、当該技術分野において日常かつ標準的な技術、例えば本発明のキナーゼの同定のために本明細書において記載される技術（例えば、クローニング、サザンまたはノザンプロット分析、インシトゥーハイブリダイゼーション、PCR増幅等）を用いて、ヒト細胞において新規ポリペプチドを同定することを含む。

【0106】

別の観点においては、本発明は、キナーゼ活性を調節する物質を同定する方法を特徴とする。該方法は、(a)配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択されるキナーゼポリペプチドを試験物質と接触させ；(b)前記ポリペプチドの活性を測定し；そして(c)前記物質が前記ポリペプチドの活性を調節するか否かを判定する、の各工程を含む。当業者は、本発明のキナーゼポリペプチド、例えば、触媒ドメインまたはその一部等の完全長配列の一部が、キナーゼ活性を調節する物質を同定するのに有用であることを理解するであろう。機能的活性（例えば、本明細書において定義される触媒的活性）を有するキナーゼポリペプチドは、キナーゼ活性を調節する物質を同定するのに有用である。

【0107】

"調節する"との用語は、化合物が本発明のキナーゼの機能を変化させる能力を表す。調節剤は、好ましくは、キナーゼに暴露される化合物の濃度に依存して本発明のキナーゼの活性を活性化するかまたは阻害する。

【0108】

"調節する"との用語はまた、キナーゼと天然の結合パートナーとの間に複合体が形成される確率を増加または減少させることにより、本発明のキナーゼの機能

を変更することを表す。調節剤は、好ましくは、キナーゼと天然の結合パートナーとの間にそのような複合体が形成される確率を増加させ、より好ましくは、キナーゼに暴露される化合物の濃度に依存してキナーゼと天然の結合パートナーとの間に複合体が形成される確率を増加または減少させ、最も好ましくは、キナーゼと天然の結合パートナーとの間に複合体が形成される確率を減少させる。

【0109】

"活性化する"との用語は、キナーゼの細胞活性を増加させることを表す。阻害するとの用語は、キナーゼの細胞活性を減少させることを表す。キナーゼ活性は、好ましくは、天然の結合パートナーとの相互作用である。

【0110】

"複合体"との用語は、互いに結合した少なくとも2つの分子の集合を表す。シグナル伝達複合体は、しばしば、互いに結合した少なくとも2つの蛋白質分子を含む。例えば、蛋白質チロシンレセプター蛋白質キナーゼ、GRB2、SOS、RAF、およびRASは、有糸分裂促進リガンドに応答して、集合してシグナル伝達複合体を形成する。

【0111】

"天然の結合パートナー"との用語は、細胞中でキナーゼに結合するポリペプチド、脂質、小分子、または核酸を表す。キナーゼと天然の結合パートナーとの間の相互作用の変化は、相互作用が形成される確率の増加または減少、またはキナーゼ/天然の結合パートナー複合体の濃度の増加または減少として現れることができる。

【0112】

本明細書において用いる場合、"接触させる"との用語は、試験化合物を含む溶液を、本発明の方法の細胞を浸している液体培地と混合することを表す。化合物を含む溶液はまた、該方法の細胞内への試験化合物の取り込みを容易にする他の成分、例えばジメチルスルホキシド(DMSO)を含んでいてもよい。試験化合物を含む溶液は、輸送装置、例えば、ピペットに基づく装置またはシリンジに基づく装置を用いて、細胞を浸している培地に加えることができる。

【0113】

別の観点においては、本発明は、細胞においてキナーゼ活性を調節する物質を同定する方法を特徴とする。該方法は、(a)細胞においてキナーゼポリペプチドを発現させ、ここで、前記ポリペプチドは、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択され；(b)試験物質を前記細胞に加え；そして(c)細胞表現型または前記ポリペプチドと天然の結合パートナーとの間の相互作用の変化をモニターする、の各工程を含む。当業者は、本発明のキナーゼポリペプチド、例えば、触媒ドメインまたはその一部等の完全長配列の一部がキナーゼ活性を調節する物質を同定するのに有用であることを理解するであろう。機能的活性(例えば、本明細書に定義される触媒的活性)を有するキナーゼポリペプチドは、キナーゼ活性を調節する物質を同定するのに有用である。

【0114】

本明細書において用いる場合、"発現"との用語は、細胞中でキナーゼ遺伝子を含む核酸ベクターから本発明のキナーゼが産生されることを表す。本明細書に記載されるように、核酸ベクターを、当該技術分野においてよく知られる手法を用いて細胞中にトランスフェクトする。

【0115】

本発明の別の観点は、本発明のキナーゼポリペプチドに結合する化合物を同定する方法に関する。該方法は、キナーゼポリペプチドを化合物と接触させ、化合物がキナーゼポリペプチドに結合するか否かを判定することを含む。結合は、当業者によく知られる結合アッセイ、例えば、限定されないが、ゲルシフトアッセイ、ウエスタンブロット、放射性標識競合アッセイ、ファージに基づく発現クローニング、クロマトグラフィーによる共分画、共沈澱、架橋、相互作用トラップ/ツーハイブリッド分析、サウスウエスタン分析、ELISA等により判定することができる。このようなアッセイは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, 1999, John Wiley & Sons, NY(その全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。スクリーニングすべき化合物には、限定されないが、細胞外、細胞内、生物学的または化学的起源の化合物が含まれる。

【0116】

本発明の方法はまた、標識、例えば放射性標識（例えば ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^3P 、 ^3H ）、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識および免疫学的標識に結合した化合物を包含する。そのような試験において用いるキナーゼポリペプチドは、溶液中で遊離であってもよく、固体支持体に結合していてもよく、細胞表面上に存在してもよく、細胞内に存在してもよく、または細胞の一部に付随していてもよい。当業者は、例えば、キナーゼポリペプチドと試験化合物との間の複合体の形成を測定することができる。あるいは、当業者は、試験化合物により引き起こされる、キナーゼポリペプチドとその基質との間の複合体形成の減少を調べることができる。

【0117】

他のアッセイを用いて、酵素活性を調べることができる。これには、限定されないが、測光法、放射線法、HPLC、電気化学的方法等が含まれ、これは、例えば、Enzyme Assays: A Practical Approach, eds. R. E. Szent-Gyorgyi and M. J. Danson, 1992, Oxford University Press (その全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

【0118】

本発明の別の観点では、キナーゼポリペプチドを化合物と接触させ、化合物がキナーゼポリペプチドの活性を調節するか否かを判定することを含む、キナーゼポリペプチドの活性を調節する（すなわち、増加または減少させる）化合物を同定する方法に関する。本明細書に記載されるように、本発明のキナーゼポリペプチドには、完全長配列の一部、例えば本明細書において定義される触媒ドメインが含まれる。場合によっては、本発明のキナーゼポリペプチドは、全触媒ドメインより小さいが、なおキナーゼまたはキナーゼ様活性を示す。これらの化合物もまた、"蛋白質キナーゼの調節剤"と称される。試験化合物の存在下における活性を、試験化合物の非存在下における活性に対して測定する。試験化合物を含む試料の活性が試験化合物を含まない試料の活性より高い場合、その化合物は活性を増加させたのであろう。同様に、試験化合物を含む試料の活性が試験化合物を含ま

ない試料の活性より低い場合、その化合物は活性を阻害したのであろう。

【0119】

本発明は、種々の薬剤スクリーニング手法の任意のものにおいてキナーゼポリペプチドを用いて化合物をスクリーニングするのに特に有用である。スクリーニングすべき化合物には、限定されないが、細胞外、細胞内、生物学的または化学的起源のものが含まれる。そのような試験において用いるキナーゼポリペプチドは、任意の形状であることができ、好ましくは、溶液中で遊離しているか、固体支持体に結合しているか、細胞表面上に存在するか、または細胞内に存在する。当業者は、例えば、キナーゼポリペプチドと試験化合物の間の複合体の形成を測定することができる。あるいは、当業者は、試験化合物により引き起こされる、キナーゼポリペプチドとその基質との間の複合体形成の減少を調べることができる。

【0120】

本発明のキナーゼポリペプチドの活性は、例えば、化学的に合成されたペプチドリガンドに結合するかまたはそれにより活性化される能力を調べることにより決定することができる。あるいは、キナーゼポリペプチドの活性は、カルシウム等の金属イオン、ホルモン、ケモカイン、神経ペプチド、神経伝達物質、ヌクレオチド、脂質、臭気物質、および光子に結合する能力を調べることによりアッセイすることができる。すなわち、キナーゼポリペプチドの活性の調節剤は、キナーゼの機能、例えばキナーゼの結合特性またはシグナル伝達等の活性または膜局在を変化させるであろう。

【0121】

本発明の方法の種々の態様においては、アッセイは、酵母成長アッセイ、エクオリンアッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、有糸分裂促進アッセイ、MAPキナーゼ活性アッセイ、ならびに当該技術分野において一般に知られている結合または機能に基づくキナーゼ活性の他のアッセイの形をとることができる。これらの態様のいくつかにおいては、本発明は、レセプターおよび非レセプター蛋白質チロシンキナーゼ、レセプターおよび非レセプター蛋白質ホスファターゼ、SRCホモロジー2および3ドメインを含有するポリペプチド、ホスホチロシン結合蛋

白質 (SRCホモロジー2 (SH2) およびホスホチロシン結合 (PTBおよびPH) ドメイン含有蛋白質), プロリンリッチ結合蛋白質 (SH3ドメイン含有蛋白質), GTPases, ホスホジエステラーゼ, ホスホリパーゼ, プロリルイソメラーゼ, プロテアーゼ, Ca²⁺結合蛋白質, cAMP結合蛋白質, グアニルシクラーゼ, アデニルシクラーゼ, NO生成蛋白質, ヌクレオチド交換因子, および転写因子の任意のものを含む。本発明にしたがうキナーゼの生物学的活性には, 限定されないが, 天然のまたは合成のリガンドの結合, ならびに当該技術分野において知られるキナーゼの機能的活性のいずれかが含まれる。キナーゼ活性の非限定的例には, キナーゼ結合相互作用および/またはシグナル伝達に及ぼす影響を含む種々の形の貫膜シグナリングが含まれる。

【0122】

本発明の調節剤は, 種々の化学構造を示し, これは一般に, 天然のキナーゼリガンドの模倣体, およびキナーゼのペプチドおよび非ペプチドアロステリックエフェクターに分類することができる。本発明は適切な調節剤の起源を限定するものではなく, これは, 天然起源, 例えば植物, 動物または無機抽出物, または非天然起源, 例えば小分子ライブラリ (コンビナトリアル化学方法により構築したライブラリを含む) およびペプチドライブラリから得ることができる。

【0123】

キナーゼをコードするcDNAを薬剤発見プログラムにおいて用いることはよく知られている。ハイスループットスクリーニング (HTS) において1日に数千種類の未知の化合物を試験することができるアッセイが詳細に記載されている。文献は, 薬剤発見のためにHTS結合アッセイにおいて放射性標識リガンドを使用する例を多数記載している (Williams, Medicinal Research Reviews, 1991, 11, 147-184を参照; 総説については, Sweetnam, et al., J. Natural Products, 1993, 56, 441-455)。結合アッセイHTSのためには, 組換えレセプターが好ましい。これは特異性がより高く (より高い相対純度), 大量のレセプター材料を生成する能力を提供し, 広範な種類のフォーマットで用いることができるためである (Hodgson, Biol Technol

ogy, 1992, 10, 973-980を参照；その全体を本明細書の一部としてここに引用する）。

【0124】

組換えレセプターの機能的発現には種々の異種システムが利用可能であり、当業者にはよく知られている。そのようなシステムには、細菌（Strosberg, et al., Trends in Pharmacological Sciences, 1992, 13, 95-98）、酵母（Pausch, Trends in Biotechnology, 1997, 15, 487-494）、何種類かの昆虫細胞（Vanden Broeck, Int. Rev. Cytology, 1996, 164, 189-268）、両生類細胞（Jayawickreme et al., Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8, 629-634）およびいくつかの哺乳動物細胞株（CHO, HEK293, COS等；Gerhardt, et al., Eur. J. Pharmacology, 1997, 334, 1-23を参照）が含まれる。これらの例は他の可能な細胞発現システム、例えば線虫から得られる細胞株を使用することを排除するものではない（PCT出願WO98/37177）。

【0125】

発現されたキナーゼを、その規定されたりガンド（この場合にはこれを活性化するためのペプチド）とともにHTS結合アッセイにおいて用いることができる。同定されたペプチドは、適当な放射性同位体、例えば、限定されないが、¹²⁵I、³H、³⁵Sまたは³²Pで、当業者によく知られる方法により標識する。あるいは、ペプチドは、適当な蛍光誘導体を用いてよく知られる方法により標識してもよい（Baindur, et al., Drug Dev. Res., 1994, 33, 373-398；Rogers, Drug Discovery Today, 1997, 2, 156-160）。組換え蛋白質を発現する細胞株から作成した膜調節物において、レセプターに特異的に結合する放射活性リガンドは、いくつかの標準的な方法の1つ、例えば、レセプター-リガンド複合体を濾過して結合したリガンドを未結合リガンドから分離する方法において、HTS

アッセイにより検出することができる (Williams, Med. Res. Rev., 1991, 11, 147-184.; Sweetnam, et al., J. Natural Products, 1993, 56, 441-455)。別の方法としては, シンチレーション近接アッセイ (SPA) またはそのような分離を必要としないフラッシュプレート (FlashPlate) フォーマットが挙げられる (Nakayama, Cur. Opinion Drug Disc. Dev., 1998, 1, 85-91 Bosse, et al., J. Biomolecular Screening, 1998, 3, 285-292)。蛍光リガンドの結合は, 例えば, 蛍光エネルギー転移 (FRET), 結合したリガンドの直接分光蛍光分析, または蛍光分極等の種々の方法により検出することができる (Rogers, Drug Discovery Today, 1997, 2, 156-160; Hill, Cur. Opinion Drug Disc. Dev., 1998, 1, 92-97)。

【0126】

キナーゼおよび異種キナーゼポリペプチドの機能的発現に必要な天然の結合パートナーは, 宿主細胞の天然の構成物であってもよく, またはよく知られる組換え技術により導入してもよい。キナーゼポリペプチドは無傷であってもよく, キメラであってもよい。キナーゼ活性化により他の天然蛋白質が刺激または阻害され, これらの事象を測定可能な応答に結びつけることができる。

【0127】

そのような生物学的応答の例には, 限定されないが, 以下のものが含まれる: 特別に遺伝子工学処理した酵母細胞において制限栄養の非存在下で生存する能力 (Pausch, Trends in Biotechnology, 1997, 15, 487-494); 蛍光色素により測定される細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化 (Murphy, et al., Cur. Opinion Drug Disc. Dev., 1998, 1, 192-199)。蛍光の変化を用いてリガンド誘導性の膜電位または細胞内 pH の変化をモニターすることもできる。このような目的のために HTS に適した自動化システムが記載されている (Schroeder, et al., J. Biomolecular Screenin

g, 1996, 1, 75-80)。共通のセカンドを測定するためのアッセイもまた利用可能であるが、これらは一般的にはHTSには好ましくない。

【0128】

本発明は、キナーゼポリペプチドに結合するリガンドの阻害剤をスクリーニングし同定する多数のアッセイを企図する。1つの例においては、キナーゼポリペプチドを固定化し、候補調節剤、例えば阻害剤化合物の存在下および非存在下において、結合パートナーとの相互作用を評価することができる。別の例においては、キナーゼポリペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用は、溶液アッセイにおいて、候補阻害剤化合物の存在下および非存在下の両方で評価することができる。いずれのアッセイにおいても、阻害剤はキナーゼポリペプチドとその天然の結合パートナーとの間の結合を減少させる化合物として同定される。別の企図されるアッセイには、PCT国際公開WO95/20652(1995年8月3日公開；図面および表を含め本明細書の一部としてここに引用する)に記載されるような、トランスフォームしたまたはトランスフェクトした宿主細胞におけるポジティブシグナルの検出により蛋白質/蛋白質相互作用の阻害剤を同定する、ジハイブリッドアッセイの変種が含まれる。

【0129】

本発明により企図される調節剤の候補には、潜在的活性化剤または潜在的阻害剤のいずれかのライブラリから選択される化合物が含まれる。小分子調節剤の同定に用いられる多くの多様なライブラリが存在し、これには、例えば、(1)化学ライブラリ、(2)天然産物ライブラリ、および(3)ランダムペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機分子から構成されるコンビナトリアルライブラリが含まれる。化学ライブラリはランダムな化学構造から構成され、その一部は既知の化合物の類似体または他の薬剤発見スクリーニングにおいて"ヒット"または"リード"として同定された化合物の類似体であるが、別のものは天然産物から誘導され、さらに別のものは、無指向性有機合成化学から生ずる。天然産物ライブラリは、(1)土壌、植物または海洋生物からの培養液の発酵および抽出、または(2)植物または海洋生物の抽出、によりスクリーニング用の混合物を作成するために用いられる、微生物、動物、植物、または海洋生物の収集物である。天

然産物ライブラリには、ポリケタイド、非リボソームペプチド、およびそれらの変種（天然に生じない）が含まれる。総説については、*Science* 282 : 63 - 68 (1998) を参照。コンビナトリアルライブラリは、混合物としての多数のペプチド、オリゴヌクレオチド、または有機化合物から構成される。これらのライブラリは、伝統的自動化合成法、PCR、クローニング、または私有の合成法により比較的容易に製造することができる。特に興味深いものは非ペプチドコンビナトリアルライブラリである。さらに興味深い他のライブラリには、ペプチド、蛋白質、ペプチド模倣物、多重平行合成収集物、リコンビナトリアル、およびポリペプチドライブラリが含まれる。コンビナトリアルケミストリおよびこれから作成されるライブラリの総説については、*Myers, Curr. Opin. Biotechnol.* 8 : 701 - 707 (1997) を参照。本明細書に記載される、種々のライブラリを用いる調節剤の同定により、候補物質である"ヒット"（または"リード"）を改変して、"ヒット"が活性を調節する能力を最適化することができる。

【0130】

本発明により企図される他の候補阻害剤を設計することができ、これには溶解型の結合パートナー、ならびにキメラ、または融合蛋白質等の結合パートナーが含まれる。本明細書において用いる場合、"結合パートナー"は、上述したような天然の結合パートナーならびにキメラポリペプチド、天然のリガンド以外のペプチド調節剤、抗体、抗体フラグメント、および同定されたキナーゼ遺伝子の発現産物に免疫特異的な抗体ドメインを含む改変型化合物を広く包含する。

【0131】

キナーゼポリペプチドの特異的ペプチドリガンドを同定するために他のアッセイを用いることができ、これには、試験リガンドの標的蛋白質への直接結合の測定により標的蛋白質のリガンドを同定するアッセイ、ならびにイオンスプレー質量分析計/ HPLC 方法または他の物理学および分析的方法を用いてアフィニティー限外濾過により標的蛋白質のリガンドを同定するアッセイが含まれる。あるいは、そのような結合相互作用は、*Fields et al., Nature*, 340 : 245 - 246 (1989), および *Fields et al.*

, Trends in Genetics, 10:286-292 (1994) (いずれも本明細書の一部としてここに引用する)に記載される酵母ツーハイブリッド系を用いて間接的に評価することができる。ツーハイブリッド系は2つの蛋白質またはポリペプチドの間の相互作用を検出するための遺伝子アッセイである。これを用いて、目的とする既知の蛋白質に結合する蛋白質を同定し、相互作用に重要なドメインまたは残基を線引きすることができる。この方法論の変形が、DNA結合蛋白質をコードする遺伝子のクローニング、蛋白質に結合するペプチドの同定、および薬剤のスクリーニング用に開発されている。ツーハイブリッド系は、1対の相互作用する蛋白質が転写活性化ドメインをレポーター遺伝子上流活性化配列(UAS)に結合するDNA結合ドメインの近くに配置させる能力を利用しており、一般に酵母において行われる。アッセイにおいては、(1)第1の蛋白質に融合されたDNA結合ドメイン、および(2)第2の蛋白質に融合された活性化ドメイン、をコードする2つのハイブリッド遺伝子を構築することが必要である。DNA結合ドメインは、第1のハイブリッド蛋白質をレポーター遺伝子のUASにターゲティングする。しかし、ほとんどの蛋白質は活性化ドメインを有していないため、このDNA結合ハイブリッド蛋白質はレポーター遺伝子の転写を活性化しない。活性化ドメインを含む第2のハイブリッド蛋白質は、UASに結合しないため、それ自身ではレポーター遺伝子の発現を活性化しない。しかし、両方のハイブリッド蛋白質が存在する場合には、第1の蛋白質と第2の蛋白質との非共有結合的相互作用が活性化ドメインをUASにつなぎ、レポーター遺伝子の転写を活性化させる。例えば、第1の蛋白質が、他の蛋白質または核酸と相互作用することが知られているキナーゼ遺伝子産物、またはそのフラグメントである場合、このアッセイを用いて結合相互作用を妨害する薬剤を検出することができる。異なる試験薬剤を系に添加してレポーター遺伝子の発現をモニターする。阻害剤が存在すると、レポーターシグナルが発生しない。

【0132】

キナーゼポリペプチド遺伝子産物の機能が未知であり、遺伝子産物に結合するリガンドが知られていない場合においても、酵母ツーハイブリッドアッセイを用いて遺伝子産物に結合する蛋白質を同定することができる。キナーゼポリペプチ

ドまたはそのフラグメントに結合する蛋白質を同定するアッセイにおいては、キナーゼポリペプチド（またはフラグメント）およびUAS結合ドメイン（すなわち、第1の蛋白質）の両方をコードする融合ポリヌクレオチドを用いることができる。さらに、それぞれが活性化ドメインに融合された異なる第2の蛋白質をコードする多数のハイブリッド遺伝子を製造し、このアッセイにおいてスクリーニングすることができる。典型的には、第2の蛋白質は総cDNAまたはゲノムDNA融合ライブラリの1またはそれ以上のメンバーによりコードされ、ここで、それぞれの第2の蛋白質のコーディング領域は活性化ドメインに融合されている。この系は広範な種類の蛋白質に適用することができ、第2の結合蛋白質の種類または機能を知ることすら必要ではない。この系は非常に感度が高く、他の方法では明らかにされない相互作用を検出することができる。過渡的相互作用であっても、転写を誘発して安定なmRNAを生成し、これは繰り返し翻訳されてレポーター蛋白質を生成することができる。

【0133】

他のアッセイを用いて、標的蛋白質に結合する薬剤を検索してもよい。試験リガンドの標的蛋白質への直接結合を同定する1つのそのようなスクリーニング方法が、米国特許5,585,277（本明細書の一部としてここに引用する）に議論されている。この方法は、蛋白質は一般に折り畳まれた状態と折り畳まれていない状態の混合物として存在し、2つの状態の間で継続的に交替しているという原理に基づく。試験リガンドが折り畳まれた形の標的蛋白質に結合する場合（すなわち、試験リガンドが標的蛋白質のリガンドである場合）、リガンドに結合した標的蛋白質分子は折り畳まれた状態のままである。すなわち、折り畳まれた標的蛋白質は、標的蛋白質に結合する試験リガンドの存在下で、リガンドの非存在下におけるよりも多く存在する。リガンドの標的蛋白質への結合は、折り畳まれた状態と折り畳まれていない状態の標的蛋白質とを区別する任意の方法により検出することができる。このアッセイを行うためには、標的蛋白質の機能がわかっている必要はない。この方法により事実上すべての薬剤、例えば、限定されないが、金属、ポリペプチド、蛋白質、脂質、多糖類、ポリヌクレオチドおよび小有機分子を試験リガンドとして評価することができる。

【0134】

標的蛋白質のリガンドを同定する別の方法は、Wieboldt et al., Anal. Chem., 69:1683-1691 (1997) (本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。この手法は、1回に溶液相中の20-30種類の薬剤のコンビナトリアルライブラリを標的蛋白質に対する結合についてスクリーニングする。簡単な膜洗浄により標的蛋白質に結合する薬剤を他のライブラリ成分から分離する。次にフィルター上に保持された特定の選択された分子を標的蛋白質から遊離させ、HPLCおよび気体補助エレクトロスプレー(イオンスプレー)イオン化質量分析により分析する。この方法は、標的蛋白質に対して最も高い親和性を有するライブラリ成分を選択し、特に小分子ライブラリについて有用である。

【0135】

本発明の好ましい態様においては、キナーゼ活性を調節する化合物をスクリーニングする方法は、試験化合物をキナーゼポリペプチドと接触させ、化合物とキナーゼポリペプチドとの間の複合体の存在についてアッセイすることを含む。そのようなアッセイにおいては、典型的にはリガンドを標識する。適当にインキュベートした後、遊離のリガンドを結合した形のリガンドから分離する。遊離のまたは複合体を形成していない標識の量は、特定の化合物がキナーゼポリペプチドに結合する能力の尺度である。

【0136】

本発明の別の態様においては、キナーゼポリペプチドに対して適切な結合親和性を有する化合物のハイスループットスクリーニングを用いる。簡単には、多数の様々な小ペプチド試験化合物を固体支持体上で合成する。ペプチド試験化合物をキナーゼポリペプチドと接触させ、洗浄する。次に、結合したキナーゼポリペプチドを当該技術分野においてよく知られる方法により検出する。本発明の精製ポリペプチドはまた、上述した薬剤スクリーニング手法において用いるために、直接プレート上にコーティングすることができる。さらに、非中和抗体を用いて蛋白質を捕獲し、これを固体支持体上に固定化することができる。

【0137】

本発明の別の態様は、本発明のポリペプチドに結合しうる中和抗体がポリペプチドに対する結合について試験化合物と特異的に競合する、競合スクリーニングアッセイを用いることを含む。このようにして、抗体を用いて、キナーゼポリペプチドと1またはそれ以上の抗原性決定基を共有するペプチドの存在を検出することができる。放射性標識した競合結合実験は、A. H. Lin et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, vol. 41, no. 10. pp. 2127 - 2131に記載されており、この開示はその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

【0138】

別の観点においては、本発明は、治療を必要とする患者に、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるキナーゼポリペプチド、ならびに、その完全長ポリペプチド、または機能的活性（本明細書において記載される）を保持するこれらの配列のいずれかの一部の活性を調節する物質を投与することにより疾病を治療する方法を提供する。好ましくは疾病は、癌、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病、脳またはニューロン関連疾病、および代謝性疾患からなる群より選択される。より詳細には、これらの疾病には、組織、血液、または造血細胞起源の癌、特に、乳、結腸、肺、前立腺、子宮頸部、脳、卵巣、膀胱、または腎臓が関与する癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態、例えば、片頭痛、痛み、性的機能不全、気分障害、注意障害、認識障害、低血圧症、および高血圧症；精神病性および神経学的疾患、例えば、不安、精神分裂病、躁うつ病、せん妄、痴呆、重症の精神遅滞および運動異常症、例えば、ハンチントン病またはツレット症候群；神経変性性疾患、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、および筋萎縮性側方硬化症；HIV-1、HIV-2または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患、例えば糖尿病および肥満、およびこれらに関連する症候群、特に、心臓血管疾患、例えば、再灌流再狭窄、冠状動脈血栓症、凝固疾患、制御されない細胞成長疾患、アテローム性動脈硬化症；眼性疾患、例えば緑内障、網膜症、および黄斑変性；炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチ、慢性炎症性腸疾病、慢性炎症性骨盤疾病、多

発性硬化症，ぜん息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植拒絶が含まれる。

【0139】

好ましい態様においては，本発明は，治療を必要とする患者に，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチド，ならびにその完全長ポリペプチド，または機能的活性（本明細書において記載される）を保持するこれらの配列のいずれかの一部の活性を調節する物質を投与することにより，疾病または疾患を治療または予防する方法を提供する。好ましくは，疾病は，癌，免疫関連疾病および疾患，心臓血管疾病，脳またはニューロン関連疾病，および代謝性疾患からなる群より選択される。より詳細には，これらの疾病には，組織，血液，または造血細胞起源の癌，特に，乳，結腸，肺，前立腺，子宮頸部，脳，卵巣，膀胱，または腎臓が関与する癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態，例えば，片頭痛，痛み，性的機能不全，気分障害，注意障害，認識障害，低血圧症，および高血圧症；精神病性および神経学的疾患，例えば，不安，精神分裂病；躁うつ病，せん妄，痴呆，重症の精神遅滞および運動異常症，例えば，ハンチントン病，またはツレット症候群；神経変性性疾患，例えばアルツハイマー病，パーキンソン病，多発性硬化症，および筋萎縮性側方硬化症；HIV-1，HIV-2または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患，例えば，糖尿病および肥満，およびこれらに関連する症候群，特に，心臓血管疾患，例えば，再灌流再狭窄，冠状動脈血栓症，凝固疾患，制御されない細胞成長疾患，アテローム性動脈硬化症；眼性疾病，例えば，緑内障，網膜症，および黄斑変性；炎症性疾患，例えば，慢性関節リウマチ，慢性炎症性腸疾病，慢性炎症性骨盤疾病，多発性硬化症，ぜん息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植拒絶が含まれる。

【0140】

本発明はまた，治療を必要とする患者に，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポ

リペプチド，ならびにその全長ポリペプチド，または機能的活性（本明細書に記載される）を保持するこれらの配列のいずれかの一部の活性を調節する物質を投与することにより，疾病または疾患を治療または予防する方法を特徴とする。好ましくは，疾病は，癌，免疫関連疾病および疾患，心臓血管疾病，脳またはニューロン関連疾病，および代謝性疾患からなる群より選択される。より詳細には，これらの疾病には，組織，血液，または造血細胞起源の癌，特に乳，結腸，肺，前立腺，子宮頸部，脳，卵巣，膀胱，または腎臓が関与する癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態，例えば，片頭痛，痛み，性的機能不全，気分障害，注意障害，認識障害，低血圧症，および高血圧症；精神病性および神経学的疾患，例えば不安，精神分裂病，躁うつ病，せん妄，痴呆，重症の精神遅滞および運動異常症，例えばハンチントン病またはツレット症候群；神経変性性疾患，例えばアルツハイマー病，パーキンソン病，多発性硬化症，および筋萎縮性側方硬化症；H I V - 1，H I V - 2または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患，例えば糖尿病および肥満およびこれらに関連する症候群，特に，心臓血管疾患，例えば再灌流再狭窄，冠状動脈血栓症，凝固疾患，制御されない細胞成長疾患，アテローム性動脈硬化症；眼性疾患，例えば緑内障，網膜症，および黄斑変性；炎症性疾患，例えば慢性関節リウマチ，慢性炎症性腸疾病，慢性炎症性骨盤疾病，多発性硬化症，ぜん息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植拒絶が含まれる。

【0141】

本発明はまた，配列番号3および配列番号4に記載される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチド，ならびにその完全長ポリペプチド，または機能的活性（本明細書に記載される）を保持するこれらの配列の一部の活性を調節する物質を投与することにより，疾病または疾患を治療または予防する方法を特徴とする。好ましくは，疾病は，免疫関連疾病および疾患，心臓血管疾病，および癌からなる群より選択される。より好ましくは，これらの疾病には，組織，血液，または造血細胞起源の癌，特に乳，結腸，肺，前立腺，子宮頸部，脳，卵巣，膀胱，または腎臓が関与する癌；中枢神経または末梢神

経系疾病および状態，例えば，片頭痛，痛み，性的機能不全，気分障害，注意障害，認識障害，低血圧症，および高血圧症；精神病性および神経学的疾患，例えば，不安，精神分裂病，躁うつ病，せん妄，痴呆，重症の精神遅滞および運動異常症，例えば，ハンチントン病またはツレット症候群；神経変性性疾患，例えばアルツハイマー病，パーキンソン病，多発性硬化症，および筋萎縮性側方硬化症；HIV-1，HIV-2又は他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患，例えば糖尿病および肥満およびこれらに関連する症候群，特に，心臓血管疾患，例えば再灌流再狭窄，冠状動脈血栓症，凝固疾患，制御されない細胞成長疾患，アテローム性動脈硬化症；眼性疾患，例えば緑内障，網膜症，および黄斑変性；炎症性疾患，例えば慢性関節リウマチ，慢性炎症性腸疾患，慢性炎症性骨盤疾患，多発性硬化症，ぜん息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植拒絶が含まれる。最も好ましくは，免疫関連疾患および疾患は，慢性関節リウマチ，慢性炎症性腸疾患，慢性炎症性骨盤疾患，多発性硬化症，ぜん息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植からなる群より選択される。

【0142】

キナーゼ関連疾患または疾病の治療に有用な物質は，好ましくは，問題とする疾病または疾患の治療に対応する活性についての1またはそれ以上のインビトロアッセイにおいて陽性の結果を示す（そのようなアッセイの例は，以下のVI節における参照文献および本明細書の実施例7において提供される）。望ましい活性についてスクリーニングすることができる物質の例は，以下のVI節に提供され参照される。キナーゼの活性を調節する物質は，好ましくは，限定されないが，アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび以下のVI節および実施例7において参照される方法およびスクリーニングにより決定されるような蛋白質キナーゼの阻害剤を含む。

【0143】

"予防する"との用語は，生物が異常な状態に罹患するかこれを発達させる可能性を減少させることを表す。

【0144】

"治療する"との用語は、生物において治療効果を有し、異常な状態を少なくとも部分的に緩和するかまたは排除することを表す。

【0145】

"治療効果"との用語は、異常な状態を引き起こすかまたはこれに寄与する阻害または活性化率を表す。治療効果は、異常な状態の1またはそれ以上の症状をある程度緩和する。異常な状態の治療に関して、治療効果は、以下の1またはそれ以上を表すことができる：(a)細胞の増殖、成長、および/または分化の増加；(b)細胞死の阻害（すなわち、遅延または停止）；(c)変性の阻害；(d)異常な状態に伴う1またはそれ以上の症状のある程度の緩和；および(e)影響を受けた細胞の集団の機能の増強。異常な状態に対して有効性を示す化合物は、本明細書に記載されるようにして同定することができる。

【0146】

"異常な状態"との用語は、生物の細胞または組織における、その生物における正常な機能からはずれた機能を表す。異常な状態は、細胞増殖、細胞分化、または細胞生存に関連する。

【0147】

異常な細胞増殖状態には、癌、例えば繊維性およびメサンギウム疾患、異常な新脈管形成および脈管形成、創傷治癒、乾癬、真性糖尿病、および炎症が含まれる。

【0148】

異常な分化状態には、限定されないが、神経変性性疾患、遅い創傷治癒速度、および遅い組織移植治癒速度が含まれる。

【0149】

異常な細胞生存状態は、プログラムされた細胞死（アポトーシス）経路が活性化されているかまたは排除されている状態に関連する。多くの蛋白質キナーゼがアポトーシス経路に関連している。蛋白質キナーゼのいずれかの機能の異常は、細胞の不死または未成熟細胞死につながりうる。

【0150】

シグナル伝達プロセスにおけるキナーゼポリペプチドの機能に関連して、"異常な"との用語は、生物において過剰発現または過小発現されているか、その触媒活性が野生型蛋白質キナーゼ活性より低いかまたは高いように変異しているか、天然の結合パートナーともはや相互作用できないように変異しているか、別の蛋白質キナーゼまたは蛋白質ホスファターゼによりもはや修飾されないか、または天然の結合パートナーともはや相互作用しない、キナーゼを表す。

【0151】

"投与する"との用語は、化合物を生物の細胞または組織内に取り込ませる方法に関連する。異常な状態は、生物の細胞または組織が生物中または生物外に存在する場合、予防または治療することができる。生物の外に存在する細胞は、細胞培養皿中で維持または成長させることができる。生物中に含まれる細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多くの手法が存在し、例えば、限定されないが、経口、非経口、経皮、注入およびエアロゾル外用が含まれる。生物外の細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多数の手法が存在し、例えば、限定されないが、細胞マイクロインジェクション手法、トランスフォーメーション手法、および担体手法が含まれる。

【0152】

異常な状態はまた、シグナル伝達経路に異常を有する一群の細胞を有する生物に化合物を投与することにより、予防または治療することができる。次に、化合物の投与が生物機能に及ぼす影響をモニターすることができる。生物は、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、モルモット、またはヤギであり、より好ましくは有尾サルまたは無尾サルであり、最も好ましくはヒトである。

【0153】

別の観点においては、本発明は、疾病または疾患の診断道具として、試料中でキナーゼポリペプチドを検出する方法を特徴とする。該方法は、(a)試料を、ハイブリダイゼーションアッセイ条件下で、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキナーゼポリペプチドの核酸標的領域にハイブリダイズする核酸プローブと接触させ、ここで、前記プローブは、ポリペプチド、そのフラグメントをコードする核酸配列、

および配列およびフラグメントの相補体を含み；そして（b）プローブ：標的領域ハイブリッドの存在または量を疾病の指標として検出する，
の各工程を含む。

【0154】

本発明の好ましい態様においては，疾病または疾患は，慢性関節リウマチ，動脈硬化症，自己免疫疾患，臓器移植，心筋梗塞，心筋症，発作，腎不全，酸化的ストレス関連神経変性性疾患，および癌からなる群より選択される。

【0155】

キナーゼ"標的領域"とは，配列番号1および配列番号2に記載される配列からなる群より選択されるヌクレオチド塩基配列，または対応する完全長配列，核酸プローブが特異的にハイブリダイズするであろうその機能的誘導体，またはそのフラグメントである。特異的なハイブリダイゼーションとは，他の核酸の存在下において，プローブが本発明のキナーゼの標的領域にのみ検出可能なようにハイブリダイズすることを示す。推定標的領域は，当該技術分野においてよく知られる，データベース中の最も近い関連配列のアラインメントおよび比較からなる方法により同定することができる。

【0156】

好ましい態様においては，核酸プローブは，配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列，または対応する完全長アミノ酸配列，本明細書に記載されるような機能的活性を保持するこれらの配列の任意のものの一部またはそれらの機能的誘導体からなる群より選択される配列の，少なくとも6，12，75，90，105，120，150，200，250，300または350個の連続するアミノ酸をコードするキナーゼ標的領域にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション条件は，他の核酸分子の存在下でキナーゼ遺伝子とのみハイブリダイゼーションが生ずるような条件であるべきである。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下では，高度に相補的な核酸配列のみがハイブリダイズする。好ましくは，そのような条件は，20個の連続するヌクレオチド中に1または2個より多いミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。そのような条件は上で定義される。

【0157】

試料中のキナーゼ遺伝子の検出により診断することができる疾病には、キナーゼ核酸（DNAおよび/またはRNA）が正常細胞と比較して増幅されている疾病が含まれる。"増幅"とは、正常細胞と比較して、細胞中でキナーゼDNAまたはRNAの数が増加していることを意味する。正常細胞においては、キナーゼは典型的には1コピーの遺伝子として見いだされる。選択された疾病においては、キナーゼ遺伝子の染色体位置が増幅されて、遺伝子の多数のコピーまたは増幅が生ずる。遺伝子増幅は、そのようなキナーゼRNAを増幅させることができ、またはキナーゼRNAはキナーゼDNAの増幅なしに増幅することができる。

【0158】

RNAに関する場合、"増幅"は、細胞においてキナーゼRNAが検出可能なように存在することでありうる。ある正常細胞においては、RNAの基底発現がないためである。他の正常細胞においては、キナーゼの発現の基底レベルが存在し、したがってこれらの場合には増幅は基底レベルと比較して少なくとも1 - 2倍、好ましくはそれより多い、検出可能な存在の増加を示すキナーゼRNAの増加である。

【0159】

試料中のキナーゼ核酸の検出により診断することができる疾病には、好ましくは癌が含まれる。本発明の核酸探索方法に適した試験試料には、例えば、細胞または細胞の核酸抽出物、または体液が含まれる。上述の方法において用いられる試料は、アッセイフォーマット、検出方法、およびアッセイする組織、細胞または抽出物の性質により様々でありうる。細胞の核酸抽出物を調製する方法は当該技術分野においてよく知られており、用いる方法に適合した試料を得るために容易に適合させることができる。

【0160】

本発明はまた、疾病または疾患の診断道具として、試料中のキナーゼポリペプチドを検出する方法を特徴とする。該方法は、(a) 試料中のキナーゼポリペプチドをコードする核酸標的領域を、キナーゼポリペプチド、またはその1またはそれ以上フラグメントをコードする対照核酸標的領域と比較し、ここで、キナー

ゼポリペプチドは、配列番号3および配列番号4に記載される配列、またはその1またはそれ以上フラグメントからなる群より選択されるアミノ酸配列を有しており；そして(b)標的領域と対照標的領域との間の配列または量の相違を疾病または疾患の指標として検出することを含む。好ましくは、疾病は、癌、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病、脳またはニューロン関連疾病、および代謝性疾患からなる群より選択される。より詳細には、これらの疾病には、組織、血液、または造血細胞起源の癌、特に乳、結腸、肺、前立腺、子宮頸部、脳、卵巣、膀胱、または腎臓が関与する癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態、例えば、片頭痛、痛み、性的機能不全、気分障害、注意障害、認識障害、低血圧症、および高血圧症；精神病性および神経学的疾患、例えば、不安、精神分裂病、躁うつ病、せん妄、痴呆、重症の精神遅滞および運動異常症、例えば、ハンチントン病またはツレット症候群；神経変性性疾患、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、および筋萎縮性側方硬化症；HIV-1、HIV-2または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患、例えば糖尿病および肥満、およびこれらに関連する症候群、特に、心臓血管疾患、例えば、再灌流再狭窄、冠状動脈血栓症、凝固疾患、制御されない細胞成長疾患、アテローム性動脈硬化症；眼性疾患、例えば、緑内障、網膜症、および黄斑変性；炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチ、慢性炎症性腸疾患、慢性炎症性骨盤疾患、多発性硬化症、ぜん息、変形性関節症、乾癬、アテローム性動脈硬化症、鼻炎、自己免疫、および臓器移植拒絶が含まれる。

【0161】

本明細書において用いる場合、"比較する"との用語は、試料から単離された核酸標的領域と対照核酸標的領域との間の不一致を同定することを表す。不一致は、ヌクレオチド配列における、例えば挿入、欠失、または点突然変異であってもよく、または所定のヌクレオチド配列の量におけるものであってもよい。配列におけるこれらの不一致を判定する方法は当業者にはよく知られている。"対照"核酸標的領域とは、正常細胞、例えば、先に記載したような疾病を有しない細胞において見いだされる配列または配列の量を表す。

【0162】

上述した本発明の概要は限定的なものではなく、本発明の他の特徴および利点は、以下の本発明の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであろう。

【0163】

図面の簡単な説明

図1AおよびBは、ヒト蛋白質キナーゼのヌクレオチド配列（配列番号1および配列番号2）を5'から3'の方向で示す。

【0164】

図2AおよびBは、配列番号1および2によりコードされるヒト蛋白質キナーゼのアミノ酸配列（配列番号3および配列番号4）を翻訳の方向で示す。コーディング領域中に推定終止コドンがある場合は、これは'x'で示される。

【0165】

発明の詳細な説明

本発明は、とりわけ、ゲノムデータベースにおいて同定された蛋白質キナーゼおよびキナーゼ様遺伝子、ならびにそれらのフラグメントを提供する。本発明は、部分的には、キナーゼまたはキナーゼ様活性を有するポリペプチドをコードすることができる核酸分子を提供する。以下の表1-8を参照すると、本発明の遺伝子をより理解することができる。本発明はさらに、多数の異なる態様、例えば以下に記載される態様を提供する。

【0166】

核酸

マップされた遺伝子の染色体の位置と癌における関与が示唆されているアンプリコンとの関連づけは、文献検索(PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), OMIM検索(Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html>)およびKnuutilaらにより維持されている癌アンプリコンの包括的データベース(Knuutila, et al., DNA copy number amplifications in

human neoplasms. Review of comparative genomic hybridization studies. Am. J. Pathol. 152: 1107-1123, 1998. (http://www.helsinki.fi/~lg1_www/CMG.html)に基づく。マップされた遺伝子の多くについて、Knuutilaからの細胞遺伝学的領域が示されており、続いて、増幅が報告されている事例の数および調べた事例の総数が示されている。

【0167】

一塩基多型については、NCBIで維持されているdbSNP（一塩基多型のデータベース）(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>)においてSNPが記録されている場合に、受託番号が与えられる。SNPについての受託番号を用いて、このサイトから完全SNP含有配列を引き出すことができる。

【0168】

核酸プローブ、キナーゼを検出するための方法およびキット

本発明はさらに、核酸プローブおよびその用途を提供する。本発明の核酸プローブを用いて、通常のハイブリダイゼーション方法により適当な染色体またはcDNAライブラリを探索して、本発明の他の核酸分子を得ることができる。染色体DNAまたはcDNAライブラリは、当該技術分野において認識されている方法にしたがって、適当な細胞から調製することができる("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 第2版. Cold Spring Harbor Laboratory, Sambrook, Fritsch, & Maniatis, eds., 1989を参照)。

【0169】

別の方法においては、目的とするポリペプチドのアミノ酸配列のN末端、およびC末端部分に対応するヌクレオチド配列を有する核酸プローブを得るために化学合成を行うことができる。合成した核酸プローブを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)においてプライマーとして使用して、認識されているPCR手法にしたがって、本質的にPCR Protocols, "A Guide to Me

thods and Applications", Academic Press, Michael, et al., eds., 1990にしたがって、適当な染色体またはcDNAライブラリを用いて、本発明のフラグメントを得ることができる。

【0170】

当業者は、本明細書に開示される配列に基づいて、当該技術分野において知られるコンピュータアラインメントおよび配列分析の方法を用いて、そのようなプローブを容易に設計することができる("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 上掲)。本発明のハイブリダイゼーションプローブは、標準的な標識技術、例えば放射性標識、酵素標識、蛍光標識、ビオチン-アビジン標識、化学発光等を用いる技術により、標識することができる。ハイブリダイゼーション後、プローブは既知の方法を用いて可視化することができる。

【0171】

本発明の核酸プローブはRNAならびにDNAプローブを含み、そのようなプローブは、例えば当該技術分野において知られる技術を用いて生成される。核酸プローブは、固体支持体上に固定化してもよい。そのような固体支持体の例としては、限定されないが、プラスチック、例えばポリカーボネート、複合炭水化物、例えばアガロースおよびセファロース、およびアクリル樹脂、例えばポリアクリルアミドおよびラテックスビーズが含まれる。核酸プローブをそのような固体支持体に結合させる技術は当該技術分野においてよく知られている。

【0172】

本発明の核酸探索方法に適した試験試料には、例えば、細胞または細胞の核酸抽出物、または体液が含まれる。上述の方法において用いられる試料は、アッセイフォーマット、検出方法、およびアッセイすべき組織、細胞、または抽出物の性質により様々であろう。細胞の核酸抽出物を調製する方法は当該技術分野においてよく知られており、用いる方法に適合する試料を得るために容易に適合させることができる。

【0173】

試料中で本発明の核酸の存在を検出する1つの方法は、(a)前記試料をハイブリダイゼーションが生ずるような条件下で上述の核酸プローブと接触させ、そして(b)前記核酸分子に結合した前記プローブの存在を検出する、ことを含む。当業者は、当該技術分野において知られる技術にしたがって、上述のように核酸プローブを選択するであろう。試験すべき試料には、限定されないが、ヒト組織のRNA試料が含まれる。

【0174】

試料中で本発明の核酸の存在を検出するためのキットは、その中に上述の核酸プローブが置かれている少なくとも1つの容器手段を含む。キットはさらに、以下の1またはそれ以上を含む他の容器を含んでいてもよい：洗浄試薬および結合した核酸プローブの存在を検出することができる試薬。検出試薬の例としては、限定されないが、放射性標識プローブ、酵素標識プローブ(西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、および親和性標識プローブ(ビオチン、アビジン、またはストレプトアビジン)が挙げられる。好ましくは、キットはさらに使用の指針を含む。

【0175】

詳細には、コンパートメント化されたキットには、試薬が別々の容器に入れている任意のキットが含まれる。そのような容器には、小ガラス容器、プラスチック容器またはプラスチックまたは紙のストリップが含まれる。そのような容器は、試料および試薬が互いに夾雑しないように、かつ各容器の薬剤または溶液を定量的様式で1つのコンパートメントから別のコンパートメントに加えることができるように、1つのコンパートメントから別のコンパートメントに試薬を効率よく移すことができるものである。そのような容器には、試験試料を入れる容器、アッセイにおいて用いるプローブまたはプライマーを含有する容器、洗浄試薬(例えばリン酸緩衝化食塩水、Tris緩衝液等)を含有する容器、およびハイブリダイズしたプローブ、結合した抗体、増幅産物等を検出するために用いられる試薬を含有する容器が含まれる。当業者は、本発明において記載される核酸プローブを、当該技術分野においてよく知られる確立されたキットフォーマットの1つに容易に組み込むことができることを容易に認識するであろう。

【0176】

本発明にしたがうポリペプチドの分類

本発明の多数の蛋白質キナーゼについて、これが属する蛋白質クラスおよびファミリーの分類、非触媒的蛋白質モチーフの概要、ならびに染色体位置が提供される。この情報は、各蛋白質についての機能、制御および/または治療的有用性を決定するのに有用である。染色体領域の増幅を種々の癌と関連づけることができる。本明細書において議論されるアンプリコンについては、情報源はKnuutila, et al (Knuutila S, Bjorkqvist A-M, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius V-M, Vidgren V & Zhu Y: DNA copy number amplifications in human neoplasms. Review of comparative genomic hybridization studies. Am J Pathol 152:1107-1123, 1998. http://www.helsinki.fi/~lgl_www/CMG.html)であった。

【0177】

キナーゼ分類および蛋白質ドメインは、しばしば、経路、細胞での役割、または上流または下流の制御のメカニズムを反映する。また、疾病関連性遺伝子は、しばしば関連する遺伝子のファミリーにおいて生ずる。例えば、キナーゼファミリーの1つのメンバーがオンコジンはまたは腫瘍抑制剤として機能する場合、または、免疫、神経、心臓血管、または代謝性疾患において破壊されていることが見いだされている場合、しばしば他のファミリーメンバーは関連する役割を果たすであろう。

【0178】

発現分析は、キナーゼを、腫瘍において転写的にアップレギュレートされているもののグループ、および特定の腫瘍タイプ(例えば黒色腫または前立腺)に限定されているもののグループに系統化する。この分析はまた、細胞サイクル依存

性様式で制御されており，したがって細胞サイクルチェックポイントの維持，進行，または有糸分裂に入り，進行し，出ること，および所管DNA修復に關与していると考えられる遺伝子，または細胞増殖およびゲノム安定性に關与している遺伝子を同定する。また，発現データにより，内皮起源または他の組織において発現しており，新脈管形成における役割が示唆され，したがって，脈管形成を構成要素とする疾病，例えば，癌，子宮内膜症，網膜症および変性，および種々の虚血性または血管性の病状の管理の標的としての意味を有する遺伝子を同定することができる。細胞生存における蛋白質の役割はまた，外部ストレス，例えば酸化的障害，低酸素症，シスプラチン等の薬剤，または放射線照射にさらされている細胞における限定された発現に基づいても示唆される。発現が腫瘍の侵入領域に限定されている場合，または発現が局所または原発性腫瘍と比較して遠位の転移においてのみ見られる場合，または遺伝子が侵入，移動または運動の培養細胞モデルの間にアップレギュレートされる場合，転移に付随する遺伝子が示唆される。

【0179】

染色体位置により，腫瘍アンプリコンまたは腫瘍サプレッサー遺伝子座についての候補標的を同定することができる。有力な腫瘍アンプリコンの概要は文献から入手可能であり，隣接する領域に位置するキナーゼ遺伝子の増幅されたコピーを含むことを実験的に確認すべき腫瘍タイプを同定することができる。

【0180】

本明細書に記載されるように，本発明のポリペプチドは，いくつかの異なるグループに分類することができる。これらの異なるグループの生物学的および化学的意味に關連する顕著な特徴は，以下により一般的に記載される。

【0181】

本発明のポリペプチドのより詳細な特性決定，例えば潜在的な生物学的および臨床的意味は，例えば実施例2 aおよび2 bに提供される。

【0182】

キナーゼ活性を示すポリペプチドの分類

以下の情報については，例えば表1および2も参照されたい。

【0183】

AGCグループ

ファミリーメンバーは、蛋白質キナーゼのAGCグループに属すると記述される。蛋白質キナーゼのAGCグループには、その主要なプロトタイプとして、蛋白質キナーゼC (PKC)、cAMP依存性蛋白質キナーゼ (PKA)、G蛋白質共役レセプターキナーゼ (ARKおよびロドプシンキナーゼ (GRK1)) ならびにp70S6KおよびAKTが含まれる。

【0184】

新規なAGCグループの蛋白質キナーゼの潜在的な生物学的および臨床的関連性は以下に記載される。新規なAGCグループのキナーゼには、配列番号4が含まれる。

【0185】

STEグループ

ファミリーメンバーは、蛋白質キナーゼのSTEグループに属すると記述される。蛋白質キナーゼのSTEグループには、その主要なプロトタイプとして、NEKキナーゼ、ならびにステライル蛋白質キナーゼのSTE11およびSTE20ファミリーが含まれる。

STEグループに属する新規な蛋白質キナーゼの潜在的な生物学的および臨床的関連性は以下に記載される。新規なSTE蛋白質キナーゼには、配列番号3が含まれる。

【0186】

本発明にしたがう治療方法診断：

本発明は、疾病または疾患の診断道具として、試料中のポリペプチドを検出する方法を提供する。該方法は、(a) 試料を、ハイブリダイゼーションアッセイ条件下で、配列番号3および配列番号4からなる群より選択されるポリペプチドの核酸標的領域にハイブリダイズする核酸プローブと接触させ、前記プローブは、ポリペプチド、そのフラグメント、および配列およびフラグメントの相補体をコードする核酸配列を含み；そして(b) プローブ：標的領域ハイブリッドの存

在または量を疾病の指標として検出する，の各工程を含む。

【0187】

本発明の好ましい態様においては，疾病または疾患は，慢性関節リウマチ，アテローム性動脈硬化症，自己免疫疾患，臓器移植，心筋梗塞，心筋症，発作，腎不全，酸化的ストレス関連神経変性性疾患，代謝性疾患，例えば糖尿病，生殖疾患，例えば不妊症，および癌からなる群より選択される。

【0188】

ハイブリダイゼーション条件は，他の核酸分子の存在下においてその遺伝子とのみハイブリダイゼーションが生ずるような条件であるべきである。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下では，高度に相補的な核酸配列のみがハイブリダイズする。好ましくは，そのような条件は，20個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。そのような条件は上で定義される。

【0189】

試料中の遺伝子の検出により診断することができる疾病には，核酸（DNAおよび/またはRNA）が正常細胞と比較して増幅されている疾病が含まれる。"増幅"とは，正常細胞と比較して，細胞中でDNAまたはRNAの数が増加していることを意味する。

【0190】

RNAに関する場合，"増幅"は，細胞においてRNAが検出可能なように存在することでありうる。ある正常細胞においては，RNAの基底発現がないためである。他の正常細胞においては，発現の基底レベルが存在し，したがってこれらの場合には増幅は基底レベルと比較して少なくとも1 - 2倍，好ましくはそれより多い検出である。

【0191】

試料中の核酸の検出により診断することができる疾病には，好ましくは，癌が含まれる。本発明の核酸探索方法に適した試験試料には，例えば，細胞または細胞の核酸抽出物，または体液が含まれる。上述の方法において用いられる試料は，アッセイフォーマット，検出方法，およびアッセイする組織，細胞または抽出

物の性質により様々でありうる。細胞の核酸抽出物を調製する方法は、当該技術分野においてよく知られており、用いる方法に適合した試料を得るために容易に適合させることができる。

【0192】

抗体、ハイブリドーマ、キナーゼの検出のための使用方法およびキット

本発明は、本発明のキナーゼに結合親和性を有する抗体に関する。ポリペプチドは、配列番号3および配列番号4に記載されるアミノ酸配列、またはその機能的誘導体、またはその少なくとも9個の連続するアミノ酸（好ましくは、その少なくとも20、30、35、または40個の連続するアミノ酸）からなる群より選択されるアミノ酸配列を有することができる。

【0193】

本発明はまた、本発明のキナーゼに対して特異的結合親和性を有する抗体に関する。そのような抗体は、本発明のキナーゼに対するその結合親和性を他のポリペプチドに対する結合親和性と比較することにより単離することができる。本発明のキナーゼに選択的に結合する抗体を、本発明のキナーゼと他のポリペプチドとを区別することを必要とする方法において用いるために選択することができる。そのような方法には、限定されないが、他のポリペプチドを含む組織におけるキナーゼ発現の変化の分析が含まれる。

【0194】

本発明のキナーゼは、種々の手順および方法、例えば抗体の生成、医薬組成物の同定、およびDNA/蛋白質相互作用の研究において用いることができる。

【0195】

本発明のキナーゼは、抗体またはハイブリドーマを生成するために用いることができる。当業者は、抗体が望まれる場合、そのようなペプチドを本明細書に記載されるように生成し、免疫原として用いることができることを認識するであろう。本発明の抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにこれらの抗体のフラグメント、およびヒト化型が含まれる。本発明の抗体のヒト化型は、キメラ化またはCDRグラフティング等の当該技術分野において知られる手法の1つを用いて生成することができる。

【0196】

本発明はまた、上述のモノクローナル抗体またはその結合フラグメントを産生するハイブリドーマに関する。ハイブリドーマは、特定のモノクローナル抗体を分泌することができる不死化細胞株である。

【0197】

一般に、モノクローナル抗体およびハイブリドーマを製造する手法は当該技術分野においてよく知られている(Campbell, "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1984; St. Groth et al., J. Immunol. Methods 35:1-21, 1980)。抗体を生成することが知られている任意の動物(マウス, ウサギ等)を、選択されたポリペプチドで免疫することができる。免疫の方法は当該技術分野においてよく知られている。そのような方法には、ポリペプチドの皮下または腹膜内注射が含まれる。当業者は、免疫に用いるポリペプチドの量は、免疫する動物、ポリペプチドの抗原性、および注入部位により様々であることを認識するであろう。

【0198】

ポリペプチドは、ペプチドの抗原性を増加させるために、修飾するかまたはアジュバント中で投与することができる。ポリペプチドの抗原性を増加させる方法は当該技術分野においてよく知られている。そのような方法には、抗原を異種蛋白質(例えばグロブリンまたは α -ガラクトシダーゼ)とカップリングさせるか、または免疫の間にアジュバントを含めることが含まれる。

【0199】

モノクローナル抗体については、免疫した動物から脾臓細胞を切除し、ミエロマ細胞、例えばSP2/0-Ag14ミエロマ細胞と融合させ、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞とさせる。当該技術分野においてよく知られる多数の方法の任意のものを用いて、所望の特性を有する抗体を産生するハイブリ

ドーマ細胞を同定することができる。これらには、ハイブリドーマをELISAアッセイ、ウエスタンブロット分析、またはラジオイムノアッセイを用いてスクリーニングすることが含まれる(Lutz et al., Exp. Cell Res. 175: 109-124, 1988)。所望の抗体を分泌するハイブリドーマをクローニングし、当該技術分野において知られる方法を用いてクラスおよびサブクラスを決定する(Campbell, "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", 上掲, 1984)。

【0200】

ポリクローナル抗体については、免疫した動物から抗体を含有する抗血清を単離し、上述の方法の1つを用いて所望の特異性を有する抗体の存在についてスクリーニングする。上述の抗体は、検出可能なように標識することができる。抗体は、放射性同位体、アフィニティー標識(例えばビオチン、アビジン等)、酵素標識(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等)、蛍光標識(例えばFITCまたはローダミン等)、常磁性原子等を用いて、検出可能なように標識することができる。そのような標識を行う方法は当該技術分野においてよく知られている。例えば、Stemberger et al., J. Histochem. Cytochem. 18: 315, 1970; Bayer et al. Meth. Enzym. 62: 308, 1979; Engval et al., Immunol. 109: 129, 1972; Goding, J. Immunol. Meth. 13: 215, 1976を参照。本発明の標識された抗体は、インビトロ、インビボ、およびインシトゥーアッセイに用いて、特定のペプチドを発現する細胞または組織を同定することができる。

【0201】

上述の抗体は、固体支持体上に固定化してもよい。そのような固体支持体の例には、プラスチック、例えばポリカーボネート、複合炭水化物、例えばアガロースおよびセファロース、アクリル樹脂、例えばポリアクリルアミドおよびラテックスビーズが含まれる。抗体をそのような固体支持体にカップリングさせる技術

は当該技術分野においてよく知られている(Weir et al., "Handbook of Experimental Immunology" 4th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Chapter 10, 1986; Jacoby et al., Meth. Enzym. 34, Academic Press, N.Y., 1974)。本発明の固定化された抗体は、インビトロ、インビボ、およびインシトゥーアッセイに、ならびに免疫クロマトグラフィーに用いることができる。

【0202】

さらに、当業者は、合理的に設計された抗ペプチドペプチドを生成するために、現在利用可能な方法、並びに抗体に関して本明細書に記載される技術、方法およびキットを容易に適合させて、特定のペプチド配列に結合しうるペプチドを容易に生成することができる(Hurby et al., "Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides", In Synthetic Peptides, A User's Guide, W.H. Freeman, NY, pp. 289-307, 1992; Kaspczak et al., Biochemistry 28: 9230-9238, 1989)。

【0203】

抗ペプチドペプチドは、本発明のキナーゼのペプチド配列中に見いだされる塩基性アミノ酸残基を、疎水性および非荷電極性基を維持しながら酸性残基で置き換えることにより生成することができる。例えば、リジン、アルギニン、および/またはヒスチジン残基をアスパラギン酸またはグルタミン酸で置き換え、およびグルタミン酸残基をリジン、アルギニンまたはヒスチジンで置き換える。

【0204】

本発明はまた、試料中においてキナーゼポリペプチドを検出する方法を包含する。該方法は、(a) 試料を、免疫複合体が形成するような条件下で上述の抗体と接触させ、そして(b) ポリペプチドに結合した前記抗体の存在を検出する、ことを含む。詳細には、該方法は、試験試料を1またはそれ以上の本発明の抗体

とインキュベートし、抗体が試験試料に結合するか否かをアッセイすることを含む。試料中で本発明のキナーゼのレベルが正常なレベルと比較して変化していることは疾病を示すかもしれない。

【0205】

抗体を試験試料とインキュベートする条件は様々である。インキュベーション条件は、アッセイにおいて用いられるフォーマット、用いられる検出方法、およびアッセイにおいて用いられる抗体のタイプおよび性質によって異なる。当業者は、慣用的に入手可能な免疫学的アッセイフォーマット（例えばラジオイムノアッセイ、酵素結合イムノソルベントアッセイ、拡散に基づくオクタロニー、またはロケット免疫蛍光アッセイ）の任意のものを、本発明の抗体を用いるために容易に適合させることができることを認識するであろう。そのようなアッセイの例は、Chard ("An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1986), Bullock et al. ("Techniques in Immunocytochemistry", Academic Press, Orlando, FL Vol. 1, 1982; Vol. 2, 1983; Vol. 3, 1985), Tijssen ("Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1985)に見いだすことができる。

【0206】

本発明の免疫学的アッセイ試験試料には、細胞、蛋白質または細胞の膜抽出物、または体液、例えば血液、血清、血漿または尿が含まれる。上述の方法において用いられる試験試料は、アッセイフォーマット、検出方法の性質およびアッセイすべき試料として用いられる組織、細胞または抽出物により様々であろう。蛋白質抽出物または細胞の膜抽出物を製造する方法は当該技術分野においてよく知

られており、用いるシステムにより試験しうる試料を得るために容易に適合させることができる。

【0207】

キットは、先に記載した検出方法を実施するために必要な全ての試薬を含む。キットは、(i) 上述の抗体を含む第1の容器手段、および(ii) 抗体の結合パートナーと標識を含むコンジュゲートを含む第2の容器手段を含むことができる。別の好ましい態様においては、キットは以下の1またはそれ以上を含む1またはそれ以上の他の容器をさらに含む：洗浄試薬および結合した抗体の存在を検出しうる試薬。

【0208】

検出試薬の例には、限定されないが、標識二次抗体が含まれ、あるいは、一次抗体が標識されている場合には、標識された抗体と反応しうる発色団、酵素、または抗体結合試薬が含まれる。コンパートメント化キットは核酸プローブキットについて上述したようなものでもよい。当業者は、本発明に記載される抗体を、当該技術分野においてよく知られる確立されたキットフォーマットの1つに容易に取り込ませることができることを容易に認識するであろう。

【0209】

キナーゼと相互作用することができる化合物の単離

本発明はまた、本発明の蛋白質キナーゼに結合しうる化合物を検出する方法に関する。該方法は、化合物を本発明のキナーゼとともにインキュベートし、キナーゼに結合した化合物の存在を検出することを含む。化合物は、複雑な混合物、例えば、血清、体液、または細胞抽出物中に存在していてもよい。

【0210】

本発明はまた、キナーゼの活性またはキナーゼの結合パートナーの活性のアゴニストまたはアンタゴニストを検出する方法に関する。該方法は、本発明のキナーゼを産生する細胞を化合物の存在下でインキュベートし、キナーゼ活性またはキナーゼ結合パートナーの活性のレベルの変化を検出することを含む。このようにして同定される化合物は、化合物の存在を示す活性の変化を生ずるであろう。化合物は、複雑な混合物、例えば、血清、体液、または細胞抽出物中に存在して

いてもよい。いったん化合物が同定されれば、当該技術分野においてよく知られる技術を用いてこれを単離することができる。

【0211】

ポリペプチド活性の調節：

本発明はさらに、治療を必要とする患者に、配列番号3および配列番号4からなる群より選択されるポリペプチドの活性を調節する物質を投与することにより、疾病または異常な状態を治療する方法を提供する。好ましくは、疾病は、慢性関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患、臓器移植、心筋梗塞、心筋症、発作、腎不全、酸化ストレス関連神経変性性疾患、代謝性および生殖疾患、および癌からなる群より選択される。

【0212】

疾患または疾病の治療に有用な物質は、好ましくは、問題とする疾病または疾患の治療に対応する活性についての1またはそれ以上のインビトロアッセイにおいて陽性の結果を示す。ポリペプチドの活性を調節する物質は、好ましくは、限定されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび蛋白質キナーゼの阻害剤を含む。

【0213】

"予防する"との用語は、生物が異常な状態に罹患するかこれを発達させる可能性を減少させることを表す。

【0214】

"治療する"との用語は、生物において治療効果を有し、異常な状態を少なくとも部分的に緩和するかまたは排除することを表す。

【0215】

"治療効果"との用語は、異常な状態を引き起こすかまたはこれに寄与する阻害または活性化率を表す。治療効果は、異常な状態の1またはそれ以上の症状をある程度緩和する。異常な状態の治療に関して、治療効果は、以下の1またはそれ以上を表すことができる：(a)細胞の増殖、成長、および/または分化の増加；(b)細胞死の阻害(すなわち、遅延または停止)；(c)変性の阻害；(d)異常な状態に伴う1またはそれ以上の症状のある程度の緩和；および(e)影

響を受けた細胞の集団の機能の増強。異常な状態に対して有効性を示す化合物は、本明細書に記載されるようにして同定することができる。

【0216】

"異常な状態"との用語は、生物の細胞または組織における、その生物における正常な機能からはずれた機能を表す。異常な状態は、細胞増殖、細胞分化、または細胞生存に関連する。異常な状態にはまた、変則的な細胞サイクル進行、すなわち有糸分裂および減数分裂を通る正常な細胞サイクル進行が変則的であることが含まれる。

【0217】

異常な細胞増殖状態には、癌、例えば繊維性およびメサンギウム疾患、異常な新脈管形成および脈管形成、創傷治癒、乾癬、真性糖尿病、および炎症が含まれる。

【0218】

異常な分化状態には、限定されないが、神経変性性疾患、遅い創傷治癒速度、および遅い組織移植治癒速度が含まれる。

【0219】

異常な細胞生存状態は、プログラムされた細胞死（アポトーシス）経路が活性化されているかまたは排除されている状態に関連する。多くの蛋白質キナーゼがアポトーシス経路に関連している。蛋白質キナーゼのいずれかの機能の異常は、細胞の不死または未成熟細胞死につながりうる。

【0220】

シグナル伝達プロセスにおけるキナーゼの機能に関連して、"異常な"との用語は、生物において過剰発現または過小発現されているか、その触媒活性が野生型蛋白質キナーゼ活性より低いかまたは高いように変異しているか、天然の結合パートナーともはや相互作用できないように変異しているか、別の蛋白質キナーゼまたは蛋白質ホスファターゼによりもはや修飾されないか、または天然の結合パートナーともはや相互作用しない、キナーゼを表す。

【0221】

"投与する"との用語は、化合物を生物の細胞または組織内に取り込ませる方法

に関連する。異常な状態は、生物の細胞または組織が生物中または生物外に存在する場合、予防または治療することができる。生物の外に存在する細胞は、細胞培養皿中で維持または成長させることができる。生物中に含まれる細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多くの手法が存在し、例えば、限定されないが、経口、非経口、経皮、注入およびエアロゾル外用が含まれる。生物外の細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多数の手法が存在し、例えば、限定されないが、細胞マイクロインジェクション手法、トランスフォーメーション手法、および担体手法が含まれる。

【0222】

異常な状態はまた、シグナル伝達経路に異常を有する一群の細胞を有する生物に化合物を投与することにより、予防または治療することができる。次に、化合物の投与が生物機能に及ぼす影響をモニターすることができる。生物は、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、モルモット、またはヤギであり、より好ましくは有尾サルまたは無尾サルであり、最も好ましくはヒトである。

【0223】

本発明はまた、哺乳動物においてキナーゼに関連する活性をアゴナイズ（促進）するかまたはアンタゴナイズする方法を含む。該方法は、前記哺乳動物に、本発明のキナーゼに対するアゴニストまたはアンタゴニストを前記アゴニズムまたはアンタゴニズムを生ずるのに十分な量で投与することを含む。キナーゼに関連する機能をアゴナイズまたはアンタゴナイズするのに十分な量のアゴニストまたはアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において、本発明のキナーゼの1つの活性のアゴニストまたはアンタゴニストを用いて疾病を治療する方法もまた本発明に含まれる。

【0224】

疾病の新規な治療を発見することをめざして、生物医学研究者および化学者は、蛋白質キナーゼの機能を阻害する分子を設計し、合成し、試験してきた。いくつかの小さい有機分子は蛋白質キナーゼの機能を調節する化合物の一群を形成する。蛋白質キナーゼの機能を阻害することが報告されている分子の例としては、限定されないが、ビス単環式、二環式または複素環式アリール化合物（PCT

WO92/20642, 1992年11月26日公開, Maguire et al.), ビニレン-アザインドール誘導体(PCT WO94/14808, 1994年7月7日公開, Ballinari et al.), 1-シクロプロピル-4-ピリジル-キノロン類(米国特許5,330,992), スチリル化合物(米国特許5,217,999), スチリル置換ピリジル化合物(米国特許5,302,606), ある種のキナゾリン誘導体(欧州特許出願0566266A1), セレオインドール類およびセレニド類(PCT WO94/03427, 1994年2月17日公開, Denny et al.), 三環式ポリヒドロキシ化合物(PCT WO92/21660, 1992年12月10日公開, Dow), およびベンジルホスホン酸化合物(PCT WO91/15495, 1991年10月17日公開, Dow et al.)が挙げられる。

【0225】

細胞膜を横切ることができ、酸加水分解に耐性の化合物は、患者に経口投与された後に高度に生物利用性となることができるため、治療剤として利点を有する可能性がある。しかし、これらの蛋白質キナーゼ阻害剤の多くは、蛋白質キナーゼの機能を弱くしか阻害しない。さらに、多くは種々の蛋白質キナーゼを阻害し、したがって、疾病の治療剤として多くの副作用を引き起こすであろう。

【0226】

しかし、ある種のインドリノン化合物は、酸耐性であり膜透過性である有機分子の一群を形成する。WO96/22976(1996年8月1日公開, Ballinari et al.)は、オキシインドール環に融合したテトラリン, ナフタレン, キノリン, およびインドール置換基を有する水溶性インドリノン化合物を記載する。これらの二環式置換基は、さらに、ヒドロキシル化アルキル, リン酸, およびエーテル成分等の極性成分で置換されている。"Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and Methods for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の米国特許出願08/702,232(1996年8月23日出願; Lyon&Lyon Docket No.221/187)および"Benzy lidene

- Z - Indoline Compounds for the Treatment of Diseases"と題するTang et alの米国特許出願08/485,323(1995年6月7日出願; Lyon&Lyon Docket No.223/298), 国際公開WO96/40116(1996年12月19日公開, Tang et al), および国際公開WO96/22976(1996年8月1日公開, Ballinari et al)(これらはすべて, 図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)は, オキシインドール環に融合した他の二環式成分ならびに単環式成分を有するインドリノン化合物のインドリノン化学ライブラリを記載する。"Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and Methods for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の出願08/702,232(1996年8月23日出願; Lyon&Lyon Docket No.221/187), "Benzylidene-Z-Indoline Compounds for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の08/485,323(1995年6月7日出願; Lyon&Lyon Docket No.223/298), およびWO96/22976(1996年8月1日公開, Ballinari et al.)は, インドリノンの合成方法, 細胞におけるインドリノン化合物の生物学的活性を試験する方法およびインドリノン誘導体の阻害パターンを教示する。

【0227】

キナーゼ活性を調節することができる物質の他の例には, 限定されないが, チロホスチン, キナゾリン, キノキソリン, およびキノリンが含まれる。上述のキナゾリン, チロホスチン, キノリン, およびキノキソリンには, よく知られる化合物, 例えば文献に記載される化合物が含まれる。例えば, キナゾリン類を記載する代表的刊行物には, Barker et al., 欧州特許公開0520722A1; Jones et al., 米国特許. 4,447,608; Kabbe et al., 米国特許. 4,757,072; Kaul and Vo

ugioukas, 米国特許5,316,553; Kreighbaum and Comer, 米国特許4,343,940; Pegg and Wardleworth, 欧州特許公開0562734A1; Barker et al., (1991) Proc. of Am. Assoc. for Cancer Research 32, 327; Bertino, J.R., (1979) Cancer Research 3, 293-304; Bertino, J.R., (1979) Cancer Research 9(2 part1), 293-304; Curtin et al., (1986) Br. J. Cancer 53, 361-368; Fernandes et al., (1983) Cancer Research 43, 1117-1123; Ferris et al. J. Org. Chem. 44(2), 173-178; Fry et al., (1994) Science 265, 1093-1095; Jackman et al., (1981) Cancer Research 51, 5579-5586; Jones et al. J. Med. Chem. 29(6), 1114-1118; Lee and Skibo, (1987) Biochemistry 26(23), 7355-7362; Lemus et al., (1989) J. Org. Chem. 54, 3511-3518; Ley and Seng, (1975) Synthesis 1975, 415-522; Maxwell et al., (1991) Magnetic Resonance in Medicine 17, 189-196; Mini et al., (1985) Cancer Research 45, 325-330; Phillips and Castle, J. (1980) Heterocyclic Chem. 17(19), 1489-1596; Reece et al., (1977) Cancer Research 47(11), 2996-2999; Sculler et al., (1986) Cancer Immunol. and Immunother. 23, A65; Sikora et al., (1984) Cancer Letters 23, 289-295; Sikora et al., (1988) Analytical Biochem. 172, 344-355 (これらすべては, 図面を含めその全

体を本明細書の一部としてここに引用する)が含まれる。

【0228】

キノキサリン類は, Kaul and Vougioukas, 米国特許5, 316, 553 (図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載される。

【0229】

キノリン類は, Dolle et al., (1994) J. Med. Chem. 37, 2627-2629; McGuire, J. (1994) Med. Chem. 37, 2129-2131; Burke et al., (1993) J. Med. Chem. 36, 425-432, および Burke et al. (1992) Bio Organic Med. Chem. Letters 2, 1771-1774 (これらすべては, 図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載される。

【0230】

チロホスチン類は, Alien et al., (1993) Clin. Exp. Immunol. 91, 141-156; Anafi et al.. (1993) Blood 82:12, 3524-3529; Baker et al., (1992) J. Cell. Sci. 102, 543-555; Bildler et al., (1991) Amer. Physiol. Soc. pp. 6363-6143: C721-C730; Brunton et al., (1992) Proceedings of Amer. Assoc. Cancer Rsch. 33, 558; Bryckaert et al., (1992) Exp. Cell Research 199, 255-261; Dong et al., (1993) J. Leukocyte Biology 53, 53-60; Dong et al., (1993) J. Immunol. 151 (5), 2717-2724; Gazit et al.. (1989) J. Med. Chem. 32, 2344-2352; Gazit et al., (1993) J. Med. Chem. 36, 3556-3564; Kaur et al., (1994) Anti-Cancer Drugs 5, 213-22

2; King et al., (1991) Biochem. J. 275, 413-418; Kuo et al., (1993) Cancer Letters 74, 197-202; Levitzki, A., (1992) The FASEB J. 6, 3275-3282; Lyall et al., (1989) J. Biol. Chem. 264, 14503-14509; Peterson et al., (1993) The Prostate 22, 335-345; Pillemer et al., (1992) Int. J. Cancer 50, 80-85; Posner et al., (1993) Molecular Pharmacology 45, 673-683; Rendu et al., (1992) Biol. Pharmacology 44(5), 881-888; Sauro and Thomas, (1993) Life Sciences 53, 371-376; Sauro and Thomas, (1993) J. Pharm. and Experimental Therapeutics 267(3), 119-1125; Wolbring et al., (1994) J. Biol. Chem. 269(36), 22470-22472; および Yoneda et al., (1991) Cancer Research 51, 4430-4435; (これらはすべて、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する) に記載される。

【0231】

調節剤として用いることができる他の化合物には、オキシンドリノン、例えば、米国特許出願08/702,232(1996年8月23日出願、図面を含め本明細書の一部としてここに引用する) に記載されるものが含まれる。

【0232】

組換えDNA技術

キナーゼ核酸分子を含むDNA構築物およびこれらの構築物を含む細胞：

本発明はまた、宿主細胞において転写を開始するのに有効なプロモーターおよび上述の核酸分子を5'から3'方向に含む組換えDNA分子に関する。さらに、本発明は、ベクターおよび上述の核酸分子を含む組換えDNA分子に関する。本発明はまた、細胞において機能的な転写領域、上述のポリペプチドに対応する

アミノ酸配列をコードするRNA配列に相補的な配列、および前記細胞において機能的な転写終止領域を含む核酸分子に関する。上述の分子は、単離されたおよび/または精製されたDNA分子でありうる。

【0233】

本発明はまた、上述の核酸分子を含み、したがってポリペプチドを発現しうる細胞または生物に関する。ポリペプチドは、そのポリペプチドを発現するよう変更されている細胞から精製することができる。細胞が、細胞が通常は産生しないかまたは細胞が通常はより低いレベルで産生する蛋白質を産生するように遺伝子操作により作成されている場合、細胞は"所望のポリペプチドを発現するよう変更されている"と言われる。当業者は、ゲノム、cDNA、または合成配列のいずれかを真核生物または原核生物細胞のいずれかに導入して発現させるための方法を容易に適用することができる。

【0234】

核酸分子、例えばDNAは、これが転写および翻訳制御情報を含むヌクレオチド配列を含み、かつそのような配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に"動作可能なように連結されている"場合、ポリペプチドを"発現しうる"と言われる。動作可能な連結とは、制御DNA配列および発現が求められているDNA配列が、遺伝子配列の発現を可能とするような様式で接続されているような連結である。遺伝子配列の発現に必要な制御領域の詳細な性質は生物によって異なるであろうが、これは一般にプロモーター領域を含む。原核生物においては、プロモーター領域は、プロモーター(RNA転写の開始を指示する)ならびにRNAに転写されたときに合成の開始を合図するであろうDNA配列の両方を含む。そのような領域は、通常は転写および翻訳の開始に関与する5'-非コーディング配列、例えばTATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列等を含むであろう。

【0235】

所望の場合には、本発明のキナーゼをコードする配列の3'側の非コーディング領域を上述の方法により得ることができる。この領域は、その転写終止制御配列、例えば終止およびポリアデニル化のために保持することができる。すなわち

、本発明のキナーゼをコードするDNA配列に天然に隣接している3'領域を保持することにより、転写終止シグナルを提供することができる。発現宿主細胞において転写終止シグナルが十分に機能性でない場合には、宿主細胞において機能的な3'領域で置き換えることができる。

【0236】

2つのDNA配列（例えば、プロモーター領域配列および本発明のキナーゼをコードする配列）は、2つのDNA配列の連結の性質が、（1）フレームシフト変異を導入しない、（2）プロモーター領域配列が本発明のキナーゼをコードする遺伝子配列の転写を指示する能力を妨害しない、または（3）本発明のキナーゼの遺伝子配列がプロモーター領域配列により転写されることを妨害しない場合、動作可能なように連結されていると言われる。すなわち、プロモーター領域は、プロモーターがそのDNA配列の転写を行うことができる場合、DNA配列に動作可能なように連結されているであろう。すなわち、本発明のキナーゼをコードする遺伝子を発現させるためには、適当な宿主により認識される転写および翻訳シグナルが必要である。

【0237】

本発明は、本発明のキナーゼ（またはその機能的誘導体）をコードする遺伝子を原核生物または真核生物細胞のいずれかにおいて発現させることを包含する。原核生物宿主は、一般に、組換え蛋白質の製造において非常に有効でありかつ便利であり、したがって、本発明のキナーゼのための1つの好ましい発現システムである。原核生物は、しばしば*E. coli*の種々の株により代表される。しかし、他の細菌株等の他の微生物株もまた用いることができる。

【0238】

原核生物系においては、宿主と適合性のある種に由来する複製部位および制御配列を含むプラスミドベクターを用いることができる。適当なプラスミドベクターの例には、pBR322、pUC118、pUC119等が含まれ、適当なファージまたはバクテリオファージベクターの例には、gt10、gt11等が含まれ、適当なウイルスベクターの例には、pMAM-neo、pKRC等が含まれる。好ましくは、本発明の選択されたベクターは、選択された宿主細胞に

において複製する能力を有する。

【0239】

認められている原核生物宿主には、細菌、例えば*E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*等が含まれる。しかし、そのような条件下においては、ポリペプチドはグリコシル化されない。原核生物宿主は発現プラスミド中のレプリコンおよび制御配列と適合性でなければならない。

【0240】

本発明のキナーゼ（またはその機能的誘導体）を原核生物細胞において発現させるためには、本発明のキナーゼをコードする配列が、機能的原核生物プロモーターと動作可能なように連結されていることが必要である。そのようなプロモーターは、構成的であってもよく、より好ましくは制御可能（すなわち、誘導可能または抑制解除可能）である。構成的プロモーターの例には、バクテリオファージの*int*プロモーター、pBR322の β -ラクタマーゼ遺伝子配列の*bla*プロモーター、およびpPR325のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子配列の*cat*プロモーター等が含まれる。誘導可能な原核生物プロモーターの例には、バクテリオファージの主要右および左プロモーター（ P_L および P_R ）、*E. coli*の*trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, および*gal*プロモーター、 β -アミラーゼ（Ulmanen et al., *J. Bacteriol.* 162:176-182, 1985）および*B. subtilis*の σ^{28} -特異的プロモーター（Gilman et al., *Gene Sequence* 32:11-20, 1984）、*Bacillus*のバクテリオファージのプロモーター（Gryczan, *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, Inc., NY, 1982）、および*Streptomyces*プロモーター（Ward et al., *Mol. Gen. Genet.* 203:468-478, 1986）が含まれる。原核生物プロモーターは、Glick（*Ind. Microbiot.* 1:277-282, 1987）、Cenatiempo（*Biochimie* 68:505-516, 1986）、およびG

ottesman (Ann. Rev. Genet. 18: 415 - 442, 1984) により概説されている。

【0241】

原核生物細胞における適切な発現には、遺伝子コーディング配列の上流にリボソーム結合部位の存在が必要である。そのようなリボソーム結合部位は、例えば、Gold et al. (Ann. Rev. Microbiol. 35: 365 - 404, 1981) に記載されている。制御配列、発現ベクター、トランスフォーメーション方法等の選択は、遺伝子を発現させるために用いられる宿主細胞のタイプに依存する。本明細書において用いる場合、"細胞"、"細胞株"および"細胞培養"は互換的に用いることができ、そのような名称はすべて子孫を含む。すなわち、"トランスフォーマント"または"トランスフォームした細胞"との語句は、継代の数にかかわらず、初代対象細胞およびここから誘導された培養物を含む。また、意図的なまたは偶然の変異のために、すべての子孫がDNA含有物において精密に同一ではないかもしれないことが理解される。しかし、定義されるように、変異体子孫は元々のトランスフォームした細胞と同じ機能性を有する。

【0242】

本発明の発現システムにおいて用いることができる宿主細胞は、目的とするキナーゼの発現において用いるのに適当である限り、特に限定されない。適当な宿主はしばしば真核生物細胞を含むことができる。好ましい真核生物宿主には、例えば、酵母、真菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞（インビボまたは組織培養のいずれか）が含まれる。宿主として有用でありうる哺乳動物細胞には、HeLa細胞、線維芽細胞由来の細胞、例えばVEROまたはCHO-K1、またはリンパ球由来の細胞、およびこれらの誘導体が含まれる。好ましい哺乳動物宿主細胞には、SP2/0およびJ558L、ならびに神経芽細胞腫細胞株、例えばIMR332が含まれ、これらは正しい翻訳後プロセシングのよりすぐれた能力を提供することができる。

【0243】

さらに、植物細胞もまた宿主として利用可能であり、植物細胞と適合しうる制御配列、例えばカリフラワーモザイクウイルス35Sおよび19S、およびノバ

リンシンターゼプロモーターおよびポリアデニル化シグナル配列が利用可能である。他の好ましい宿主は昆虫細胞，例えば，*Drosophila larva* eである。昆虫細胞を宿主として用いる場合，*Drosophila* アルコールデヒドロゲナーゼプロモーターを用いることができる (Rubin, *Science* 240:1453-1459, 1988)。あるいは，バキュロウイルスベクターを，昆虫細胞において本発明のキナーゼを大量に発現するよう遺伝子工学処理することができる (Jasny, *Science* 238:1653, 1987; Miller et al., *Genetic Engineering, Vol. 8, Plenum, Setlow et al., eds., pp. 277-297, 1986*)。

【0244】

酵母がグルコースの豊富な培地中で成長するときに大量に産生される解糖系酵素をコードする活発に発現されている配列からのプロモーターおよび終止要素を組み込んだ一連の酵母発現システムの任意のものを用いることができる。既知の解糖系遺伝子配列はまた，非常に効率的な転写制御シグナルを提供することができる。酵母は，翻訳後修飾を行うこともできる点において，実質的な利点を与える。強いプロモーター配列および高コピー数プラスミドを用いる多くの組換えDNA戦略が存在し，これを酵母において所望の蛋白質を製造するために用いることができる。酵母はクローン化された哺乳動物遺伝子のリーダー配列を認識して，リーダー配列を有するペプチド（すなわちプレペプチド）を分泌する。哺乳動物宿主における本発明のキナーゼの発現にはいくつかの可能なベクター系が利用可能である。

【0245】

宿主の性質に応じて，広範な種類の転写および翻訳制御配列を用いることができる。転写および翻訳制御シグナルは，制御シグナルが高レベルの発現を有する特定の遺伝子配列に関連しているウイルス起源，例えばアデノウイルス，ウシパピローマウイルス，サイトメガロウイルス，サルウイルス等から誘導することができる。あるいは，哺乳動物発現産物，例えばアクチン，コラーゲン，ミオシンなどからのプロモーターを用いることができる。転写開始制御シグナルは，遺伝

子配列の発現を調節することができるように、抑制または活性化を可能とするものを選択することができる。興味深いものは、温度を変化させることにより発現を抑制または開始することができるように温度感受性であるか、化学物質（例えば代謝産物）制御を行うことができる制御シグナルである。

【0246】

本発明のキナーゼの真核生物宿主における発現には、真核生物制御領域を使用することが必要である。そのような領域は、一般に、RNA合成の開始を指示するのに十分なプロモーター領域を含む。好ましい真核生物プロモーターには、例えば、マウスメタロチオネインI遺伝子配列のプロモーター（Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273-288, 1982）；ヘルペスウイルスのTKプロモーター（McKnight, Cell 31: 355-365, 1982）；SV40初期プロモーター（Benoit et al., Nature (London) 290: 304-31, 1981）；および酵母gal4遺伝子配列プロモーター（Johnston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 6971-6975, 1982；Silver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 5951-5955, 1984）が含まれる。

【0247】

真核生物mRNAの翻訳は、最初のメチオニンをコードするコドンから開始される。この理由のため、真核生物プロモーターと、本発明のキナーゼ（またはその機能的誘導体）をコードするDNA配列との間の連結には、メチオニンをコードする介在コドン（すなわちAUG）が含まれないことを確実にすることが好ましい。そのようなコドンの存在は、融合蛋白質（AUGコドンが本発明のキナーゼのコーディング配列と同じリーディングフレームにある場合）またはフレームシフト変異（AUGコドンが本発明のキナーゼのコーディング配列と同じリーディングフレームにない場合）の形成のいずれかをもたらす。

【0248】

本発明のキナーゼをコードする核酸分子および動作可能なように連結されたプロモーターは、レシピエントである原核生物または真核生物細胞中に、非複製D

NAまたはRNA分子のいずれかとして導入することができ、これは、直線状分子またはより好ましくは閉環状分子のいずれでもよい。そのような分子は自己複製することができないため、遺伝子の発現は導入された配列の過渡的発現により生ずる。あるいは、導入されたDNA配列が宿主染色体中にインテグレートされることにより永久発現が得られる。

【0249】

所望の遺伝子配列を宿主細胞染色体中にインテグレートしうるベクターを用いることができる。導入されたDNAをその染色体中に安定にインテグレートしている細胞は、発現ベクターを含有する宿主細胞の選択を可能とする1またはそれ以上のマーカーを導入することにより選択することができる。マーカーは、栄養要求性宿主に対する栄養、殺生物剤耐性（例えば抗生物質、または重金属、例えば銅）等を提供することができる。選択マーカー遺伝子配列は、発現させるべきDNA遺伝子配列に直接連結してもよく、または同じ細胞にコトランスフェクションにより導入してもよい。mRNAの最適な合成には追加の要素も必要であろう。これらの要素には、スプライシングシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終止シグナルが含まれる。そのような要素を組み込んだcDNA発現ベクターには、Okayama (Mol. Cell. Biol. 3: 280-289, 1983) により記載されるものが含まれる。

【0250】

導入された核酸分子は、レシピエント宿主中で自己複製可能なプラスミドまたはウイルスベクター中に取り込ませることができる。この目的のために広範な種類のベクターの任意のものを用いることができる。特定のプラスミドまたはウイルスベクターの選択において重要な因子には、ベクターを含むレシピエント細胞を認識しベクターを含まないレシピエント細胞から選択することの容易性；特定の宿主において所望されるベクターのコピー数；およびベクターを異なる種の宿主細胞間で"シャトル"しうることが望ましいか否かが含まれる。

【0251】

好ましい原核生物ベクターには、E. coli 中で複製しうるプラスミド（例えば、pBR322, ColE1, pSC101, pACYC184, VX;

"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 上掲)などのプラスミドが含まれる。Bacillus プラスミドには, pC194, pC221, pT127等が含まれる(Gryczan, The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, NY, pp. 307-329, 1982)。適当なStreptomyces プラスミドには, p1J101 (Kendall et al., J. Bacteriol. 169: 4177-4183, 1987), およびStreptomyces バクテリオファージ, 例えばC31 (Chater et al., Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, pp. 45-54, 1986)が含まれる。Pseudomonas プラスミドはJohn et al. (Rev. Infect. Dis. 8: 693-704, 1986), およびIzaki (Jpn. J. Bacteriol. 33: 729-742, 1978)により概説されている。

【0252】

好ましい真核生物プラスミドには, 例えば, BPV, ワクチニア, SV40, 2-ミクロンサークル等, またはそれらの誘導体が含まれる。そのようなプラスミドは当該技術分野においてよく知られている(Botstein et al., Miami Wnter. Symp. 19: 265-274, 1982; Broach, "The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 445-470, 1981; Broach, Cell 28: 203-204, 1982; Bollon et al., J. Clin. Hematol. Oncol. 10: 39-48, 1980; Maniatis, Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, p

p. 563 - 608, 1980)。

【0253】

構築物を含有するベクターまたは核酸分子を発現用に用意した後、DNA構築物は、種々の適当な手段、すなわち、トランスフォーメーション、トランスフェクション、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈澱、直接マイクロインジェクション等により、適当な宿主細胞中に導入することができる。ベクターを導入した後、レシピエント細胞を、ベクター含有細胞の成長を選択する選択培地中で成長させる。クローニングされた遺伝子の発現により、本発明のキナーゼまたはそのフラグメントが産生される。これは、トランスフォームした細胞中でそのまま起こるか、またはこれらの細胞を分化させるよう誘導した後に起こる（例えば、プロモデオキシウラシルを神経芽細胞腫等に投与することにより）。本発明のペプチドを形成するために、種々のインキュベーション条件を用いることができる。最も好ましい条件は、生理学的条件を模倣した条件である。

【0254】

トランスジェニック動物：

本発明に関連するトランスジェニック動物の製造には、種々の方法が利用可能である。DNAを受精可能卵の前核に注入した後、雄前核と雌前核を融合させるか、またはDNAを胚性細胞（例えば、2細胞胚の核）の核に注入した後、細胞分裂を開始させることができる（Brinster et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 4438 - 4442, 1985）。本発明の無機イオンレセプターヌクレオチド配列を有するよう改変したウイルス、特にレトロウイルスを胚に感染させることができる。

【0255】

胚の内部細胞塊から誘導され培養中で安定化させた多能性幹細胞を、培養中で操作して本発明のヌクレオチド配列を取り込ませることができる。トランスジェニック動物は、そのような細胞を胚盤胞中に移植し、これを仮母に移植し、分娩させることにより製造することができる。トランスジェニック実験に適当な動物は、標準的な商業的供給源、例えばCharles River (Wilmin

gton, MA), Taconic (Germantown, NY), Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN)等から入手することができる。

【0256】

齧歯類胚を操作する方法およびDNAを接合子の前核に注入する方法は、当業者によく知られている(Hogan et al., 上掲)。魚、両生類卵および鳥類のためのマイクロインジェクション法は、Houdebine and Chourrout (Experientia 47:897-905, 1991)に詳述されている。DNAを動物の組織中に導入する他の方法は、米国特許, 4,945,050 (Sandford et al., 1990年7月30日)に記載されている。

【0257】

一例にすぎないが、トランスジェニックマウスを製造するためには、雌マウスを過剰排卵誘発する。雌を雄といっしょに置き、交配した雌をCO₂室息または頸部脱臼により殺し、切除した卵管から胚を回収する。まわりの丘細胞を除去する。次に、前核胚を洗浄し、注入時まで保存する。ランダムな周期の成人雌を精管切除雄と対にする。レシピエント雌はドナー雌と同じ時に交配させる。次に胚を外科的に移す。トランスジェニックラットを製造する方法はマウスの場合と類似する方法である(Hammer et al., Cell 63:1099-1112, 1990)。

【0258】

胚性幹(ES)細胞を培養し、次にエレクトロポレーション、リン酸カルシウム/DNA沈澱および直接注入等の方法を用いてDNAをES細胞中に導入することによりトランスジェニック動物を製造する方法もまた当業者によく知られている(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cell, A Practical Approach, E.J. Robertson, ed., IRL Press, 1987)。

【0259】

ランダム遺伝子インテグレーションを含む場合には、本発明の配列を含むクロ

ーンを耐性をコードする遺伝子とともにコトランスフェクトすることができる。あるいは、ネオマイシン耐性をコードする遺伝子を、本発明の配列に物理的に連結させることができる。所望のクローンのトランスフェクションおよび単離は、当業者によく知られるいくつかの方法のいずれかを用いて実施することができる (E. J. Robertson, 上掲)。

【0260】

ES細胞中に導入されたDNA分子はまた、相同組換えのプロセスにより染色体中にインテグレートされることができる (Capecchi, Science 244: 1288 - 1292, 1989)。組換え事象のポジティブ選択 (すなわち, neo耐性) および二重ポジティブ - ネガティブ選択 (すなわち, neo耐性およびガンシクロビル耐性) の方法, および続くPCRによる所望のクローンの同定は, Capecchi, 上掲および Joyner et al. (Nature 338: 153 - 156, 1989) に記載されており, これらの教示は, 図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する。この方法の最後の段階は, 標的とするES細胞を胚盤胞中に注入し, 胚盤胞を擬妊娠雌に移すことである。得られるキメラ動物を繁殖させ, 子孫をサザンブロッティングにより分析して, トランスジンを有する個体を同定する。非齧歯類哺乳動物および他の動物の製造方法は別の者により議論されている (Houdebine and Chourrout, 上掲; Pursel et al., Science 244: 1281 - 1288, 1989; and Simms et al., Bio/Technology 6: 179 - 183, 1988)。

【0261】

すなわち, 本発明は, 本発明のキナーゼをコードするトランスジンをまたはキナーゼの発現に影響する遺伝子を含有するトランスジェニックの非ヒト哺乳動物を提供する。そのようなトランスジェニックの非ヒト哺乳動物は, キナーゼの導入の効果を研究するため, またはキナーゼの発現を制御 (すなわち, 追加の遺伝子, アンチセンス核酸, またはリボザイムの導入により) するためのインビボ試験系として特に有用である。

【0262】

"トランスジェニック動物"とは、細胞中に人工的に挿入されたDNAを含む細胞を有する動物である。該DNAは、その細胞から発生した動物のゲノムの一部となる。好ましいトランスジェニック動物は、霊長類、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、イヌおよびネコである。トランスジェニックDNAは、ヒトキナーゼをコードすることができる。動物における自然の発現は、レセプターの発現を減少させるのに有効な量のアンチセンスRNAまたはDNAを与えることにより減少させることができる。

【0263】

遺伝子治療：

本発明のキナーゼまたはその遺伝子配列は、遺伝子治療においても有用である（総説としてMiller, Nature 357:455-460, 1992）。Millerは、進歩により、ポジティブな初期の結果を示したヒト遺伝子治療に対する実用的なアプローチが得られたと述べている。遺伝子治療の基本的な科学はMulligan (Science 260:926-931, 1993) に記載されている。

【0264】

1つの好ましい態様においては、蛋白質キナーゼのコーディング配列を含む発現ベクターを細胞に挿入し、細胞をインビトロで成長させ、次にこれを大量に患者に注入する。別の好ましい態様においては、選択されたプロモーター（例えば、強いプロモーター）を含むDNAセグメントを、本発明のキナーゼをコードする内因性遺伝子を含む細胞中に、プロモーターセグメントが内因性キナーゼ遺伝子の発現を増強する様式で移送する（例えば、プロモーターセグメントをこれが内因性キナーゼ遺伝子に直接連結するように細胞内に移送する）。

【0265】

遺伝子治療は、腫瘍を標的とするキナーゼcDNAを含むアデノウイルスの使用を含むことができる。全身キナーゼは、遺伝子工学処理した細胞の移植、そのようなキナーゼをコードするウイルスの注入、または裸のキナーゼDNAの適当な組織への注入により増加する。

【0266】

そのような複合体の活性を調節するために、標的細胞集団を、蛋白質複合体の1またはそれ以上の変更された形の成分を導入することにより改変することができる。例えば、標的細胞中における複合体成分の活性を減少させるか阻害することにより、そのような状態につながる異常なシグナル伝達事象を減少させ、阻害し、または逆転させることができる。蛋白質複合体の他の成分と相互作用する能力を保持しているが、シグナル伝達において機能することができない成分の欠失またはミスセンス変異体を用いて、異常な、有害なシグナル伝達事象を阻害することができる。

【0267】

ウイルス、例えばレトロウイルス、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、いくつかのRNAウイルス、またはウシパピローマウイルスに由来する発現ベクターを用いて、本発明の組換えキナーゼをコードするヌクレオチド配列（例えばcDNA）を標的細胞集団（例えば腫瘍細胞）に輸送することができる。当業者によく知られる方法を用いて、コーディング配列を含む組換えウイルスベクターを構築することができる（Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989）。あるいは、蛋白質配列をコードする組換え核酸分子を裸のDNAとしてまたは再構築系、例えば標的細胞への輸送のためのリポソームまたは他の脂質系において用いることができる（例えば、Felgner et al., *Nature* 337:387-8, 1989）。ヒト遺伝子治療において用いるための、プラスミドDNAを細胞内に直接輸送するいくつかの他の方法が存在し、これはプラスミドDNAを蛋白質に複合体化させることによりDNAを細胞上のレセプターにターゲティングすることを含む（Miller, 上掲）。

【0268】

最も簡単な形においては、遺伝子輸送は、単にマイクロインジェクション工程により細胞の核内に最小量のDNAを注入することにより行うことができる(Capecci, Cell 22:479-88, 1980)。組換え遺伝子は、いったん細胞内に導入されると、転写および翻訳に関する細胞の正常なメカニズムにより認識されることができ、遺伝子産物が発現される。より多数の細胞にDNAを導入するための他の方法も試みられている。これらの方法には、DNAをリン酸カルシウムで沈澱させピノサイトーシスにより細胞中に取り込ませるトランスフェクション(Chen et al., Mol. Cell Biol. 7:2745-52, 1987);細胞を高圧パルスに暴露して膜に穴をあけるエレクトロポレーション(Chu et al., Nucleic Acids Res. 15:1311-26, 1987);DNAを親油性ベヒクル中に封入し、これを標的細胞と融合させるリポフェクチン/リポソーム融合(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413-7417, 1987);および小さい発射体に結合させたDNAを用いる粒子衝撃(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9568-9572, 1990)が含まれる。DNAを細胞内に導入する他の方法は、DNAを化学的に修飾した蛋白質にカップリングさせることである。

【0269】

また、アデノウイルス蛋白質がエンドソームを不安定化させ、DNAの細胞への取り込みを促進しうることが示されている。アデノウイルスをDNA複合体を含む溶液と混合するか、または蛋白質架橋試薬を用いてアデノウイルスに共有結合したポリリジンにDNAを結合させることにより、組換え遺伝子の取り込みおよび発現が実質的に改良される(Curiel et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 6:247-52, 1992)。

【0270】

本明細書において用いる場合、"遺伝子輸送"とは、外来核酸分子を細胞中に導入する工程を意味する。遺伝子輸送は、一般に、遺伝子によりコードされる特定の産物の発現を可能とするために行われる。産物には、蛋白質、ポリペプチド、

アンチセンスDNAまたはRNA，または酵素的に活性なRNAが含まれる。遺伝子輸送は，培養細胞中で，または動物への直接投与により行うことができる。一般に，遺伝子輸送には，核酸を非特異的レセプター媒介性相互作用により標的細胞と接触させ，核酸を膜を通してまたはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込ませ，核酸を原形質膜またはエンドソームから細胞質内に放出させる工程が含まれる。さらに，発現には，核酸が細胞の核に移動し，転写のための適当な核因子に結合することが必要である。

【0271】

本明細書において用いる場合，“遺伝子治療”とは，遺伝子輸送の1つの形であり，本明細書において用いられる遺伝子輸送の定義の中に含まれ，特にインビボでまたはインビトロで細胞から治療用産物を発現させるための遺伝子治療を表す。遺伝子輸送は，細胞でエクスピボで行い，次に患者に移植することにより，または，核酸または核酸蛋白質複合体を患者に直接投与することにより，行うことができる。

【0272】

別の好ましい態様においては，キナーゼポリペプチドをコードする核酸配列を有するベクターが提供され，ここで，核酸配列は特定の組織においてのみ発現される。組織特異的遺伝子発現を行う方法は，国際公開WO93/09236（1992年11月3日出願，1993年5月13日公開）に記載される。

【0273】

上述したすべてのベクターにおいて，本発明のさらに別の観点は，ベクターに含まれる核酸配列が，核酸の配列の一部または全てについて，上で定義したような付加，欠失または修飾を含んでいてもよいことである。

【0274】

別の好ましい態様においては，遺伝子置換の方法が記載される。本明細書において用いる場合，“遺伝子置換”とは，インビボで発現しうる核酸配列を動物に供給し，このことによりその動物に欠失しているかまたは不完全な内因性遺伝子の機能を提供することを意味する。

【0275】

医薬処方および投与経路

本明細書に記載される化合物は、それ自体で、または医薬組成物中でヒト患者に投与することができる。医薬組成物では、組み合わせ療法におけるように、化合物が他の活性成分と混合されているか、または適当な担体または賦形剤と混合されている。本発明の化合物の処方および投与の手法は"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PAの最新版に見いだすことができる。

【0276】

投与経路：

投与の適当な経路には、例えば、経口、直腸、経粘膜、または腸投与；非経口輸送、例えば筋肉内、皮下、静脈内、骨髄内注入、ならびに鞘内、直接心室内、腹膜内、鼻腔内、または眼内注射が含まれる。

【0277】

あるいは、化合物を全身ではなく局所的に投与してもよく、これには、例えば、化合物を、しばしばデポ製剤または徐放製剤として直接固体腫瘍に注射することが含まれる。

【0278】

さらに、薬物はターゲティングされたドラッグデリバリーシステムにおいて、例えば腫瘍特異的抗体により被覆されたりリポソーム中で投与してもよい。リポソームは腫瘍にターゲティングされ、選択的に取り込まれるであろう。

【0279】

組成物/処方：

本発明の医薬組成物は、当該技術分野においてよく知られる方法、例えば、限定されないが、慣用の混合、溶解、顆粒化、糖衣作成、研和、乳化、カプセル封入、捕捉、または凍結乾燥により製造することができる。

【0280】

すなわち、本発明にしたがって使用するための医薬組成物は、活性化合物を薬剤として使用することができる製品に加工することを容易にする賦形剤および補助剤を含む、1またはそれ以上の生理学的に許容しうる担体を用いて、慣用の方

法で製剤することができる。適切な処方は、選択される投与経路に依存する。

【0281】

注射用には、本発明の薬剤を水性溶液、好ましくはハックス溶液、リンゲル溶液、または生理的食塩緩衝液等の生理学的に適合性の緩衝液中で処方することができる。経粘膜投与用には、浸透すべき障壁に適した浸透剤が処方に用いられる。そのような浸透剤は当該技術分野において一般に知られている。

【0282】

経口投与のためには、化合物を当該技術分野においてよく知られる薬学的に許容しうる担体と混合することにより化合物を容易に処方することができる。そのような担体は、本発明の化合物を、治療すべき患者による経口摂取のための錠剤、丸薬、糖衣剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等として処方することを可能とする。適当な担体には、特に、ラクトース、ショ糖、マンニトール、またはソルビトール等の糖類；トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、およびジャガイモデンプン等のセルロース製品、ゼラチン、トラガントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン（PVP）等の増量剤などの賦形剤が含まれる。所望の場合には、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウム等の崩壊剤を加えてもよい。

【0283】

糖衣剤のコアは、適当なコーティングとともに供給される。この目的のためには、濃縮された糖溶液を用いることができる。これは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を任意に含むことができる。識別のため、あるいは活性化合物の用量の異なる組合せを特徴づけるため、染料または色素を錠剤または糖衣剤コーティングに添加してもよい。

【0284】

経口で使用することができる医薬製剤は、ゼラチンから作成されるプッシュフ

ットカプセル，ならびにゼラチンおよびグリセロール，ソルビトール等の可塑性から作成される密封軟カプセルを含む。プッシュフィットカプセルは，活性成分を，ラクトース等の増量剤，デンプン等の結合剤，および/またはタルクおよびステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤，さらに任意に安定剤との混合物中に含むことができる。軟カプセルにおいては，活性化合物は脂肪油，流動パラフィン，または液体ポリエチレングリコール等の適当な液体中に溶解または懸濁することができる。さらに安定剤を添加してもよい。経口投与用のすべての処方は，そのような投与に適当な用量で調製すべきである。

【0285】

口内投与のためには，組成物は，慣用的な方法で錠剤またはトローチ剤の形にすることができる。

【0286】

吸入による投与用には，本発明に従って用いられる化合物は，噴射剤，例えば，ジクロロジフルオロメタン，トリクロロフルオロメタン，ジクロロテトラフルオロエタン，二酸化炭素または他の適当な気体を用いて，加圧されたパックまたはネブライザーからエアゾルスプレイの形状で便利に輸送される。加圧されたエアゾルの場合，用量単位は計量された量を送達するべく備えられたバルブにより調節することができる。例えば吸入器または注入器において使用するためのゼラチン製のカプセルおよびカートリッジは，化合物の粉末混合物と，ラクトースまたはデンプン等の適当な粉末基剤とを含むよう処方することができる。

【0287】

化合物は，例えばボラス注射または連続注入による非経口投与用に処方することができる。注射用の処方は，単位用量にて，例えばアンプルにて，あるいは添加された保存料と共に多用量容器中で提供することができる。組成物は油性または水性のベヒクル中で，懸濁液，溶液，または乳濁液等の形状をとることができる。懸濁剤，安定剤および/または分散剤等の製剤物質を含んでいてもよい。

【0288】

非経口投与用の薬剤処方法は，水溶性の形態の活性化合物の水溶液を含む。さらに，活性化合物の懸濁液は，適当な油性の注入用懸濁液として調製することが

できる。適切な親油性溶媒またはベヒクルには、ゴマ油等の脂肪油、オレイン酸エチルまたはトリグリセリド等の合成脂肪酸エステル、またはリポソーム等を含む。水性の注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン等の、懸濁液の粘度を増加させる物質を含んでいてもよい。任意に、懸濁液はまた、高度に濃縮された溶液の調製を可能にする、当該化合物の溶解性を増加させる適当な安定剤または薬剤を含んでいてもよい。

【0289】

あるいは、活性成分は粉体の形態であって、使用前に適当なベヒクル、例えば発熱物質を含まない滅菌水を用いて構成することができる。

【0290】

化合物はまた、例えばカカオバターまたは他のグリセリド等の慣用の坐剤基剤を用いて、坐剤または停留浣腸等の直腸用組成物に処方することができる。

【0291】

上述した処方に加えて、化合物はまたデポ製剤として処方することができる。そのような長時間作用性の処方は、埋込み（例えば皮下または筋肉内への）によるか、または筋肉内注射により投与することができる。すなわち、例えば、化合物は、適当な高分子性または疎水性物質と共に（例えば許容される油剤中の乳濁液として）、イオン交換樹脂と共に、溶けにくい塩等の溶けにくい誘導体として、処方することができる。

【0292】

本発明の疎水性化合物のための薬学的担体は、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機ポリマーおよび水性相を含む共溶媒系であってもよい。共溶媒系はVPD共溶媒系であってもよい。VPDは、3%（w/v）ベンジルアルコール、8%（w/v）非極性界面活性剤ポリソルベート80、および65%（w/v）ポリエチレングリコール300を純粋エタノール中に作成した溶液である。VPD共溶媒系（VPD：D5W）は、VPDを5%デキストロースの水溶液中に1：1で希釈したものである。この共溶媒系は疎水性化合物をよく溶解し、それ自体、全身投与に際して低い毒性を示す。本来、共溶媒系の比率は、その溶解性および毒性特性を破壊することなく相当変化させることができる。さ

らに、共溶媒成分の同一性も変化させることができる。例えば、他の低毒性非極性界面活性剤をポリソルベート80の代わりに用いることができ、ポリエチレングリコールの分画サイズは様々でありうる。他の生体適合性ポリマー、例えばポリビニルピロリドンをポリエチレングリコールの代わりに用いることができ、他の糖または多糖類をデキストロースの代わりに用いることができる。

【0293】

あるいは、疎水的医薬化合物のための他の輸送系を用いてもよい。リポソームおよび乳剤は、疎水的薬剤のための輸送用ベヒクルまたは担体の例としてよく知られている。さらに、ある種の有機溶媒、例えばジメチルスルホキシドもまた用いることができるが、しばしば毒性がより高くなる。さらに、化合物は、持続放出系、例えば治療薬剤を含む固体疎水性ポリマーの準透過性マトリックスを用いて輸送することができる。種々の持続放出材料が当業者にはよく知られている。持続放出カプセルはその化学的性質に応じて、数週間から100日を越える期間、化合物を放出する。治療薬剤の化学的性質および生物学的安定性に応じて、さらに別の蛋白質安定化戦略を用いてもよい。

【0294】

医薬組成物はまた、適当な固体またはゲル相の担体または賦形剤を含んでいてもよい。そのような担体または賦形剤の例には、限定されないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、澱粉、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコール等の高分子が含まれる。

【0295】

本発明のチロシンまたはセリン/トレオニンキナーゼ調節化合物の多くは、薬学的に適合性のカウンターイオンとの塩として提供される。薬学的に適合性の塩は、多くの酸、例えば、限定されないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸等を用いて形成することができる。塩は、水性または他のプロトン性溶媒において、対応する遊離塩基の形よりもより溶解性である傾向にある。

【0296】

適切な投与計画：

本発明において使用するのに適した医薬組成物には、活性成分がその意図される目的を達成するのに有効な量で含まれている組成物が含まれる。より詳細には、治療上有効量とは、疾病の症状を予防、緩和または改善するのに、または治療している被験者の生存を長くするのに有効な化合物の量を意味する。本発明の化合物の治療上有効量の決定は、特に本明細書に提供される詳細な開示に鑑みて、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0297】

患者に投与すべき化合物の投与量および生物に化合物を投与するモードを決定する方法は、米国特許出願08/702,282(1996年8月23日出願)および国際出願WO96/22976(1996年8月1日公開)(この両方について、図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に開示されている。当業者は、そのような記載が本発明に適用可能であり、容易に適合させることができることを理解するであろう。

【0298】

適切な投与量は、種々の因子、例えば、治療する疾病のタイプ、用いられる特定の組成物および患者のサイズおよび生理学的状態に依存する。本明細書に記載される化合物についての治療上有効量は、最初は培養細胞および動物モデルから見積もることができる。例えば、容量は、動物モデルにおいて、培養細胞アッセイにおいて決定された IC_{50} を最初に考慮した循環濃度範囲を達成する用量を処方することができる。動物モデルのデータを用いて、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。

【0299】

本発明の方法において用いられる任意の化合物について、治療上有効な用量は、最初は細胞培養アッセイから見積もることができる。例えば、動物モデルにおいて、培養細胞において決定された IC_{50} (すなわちチロシンまたはセリン/トレオニンキナーゼ活性の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度)を含む循環濃度範囲を達成するような用量を処方することができる。そのような情報は、ヒトまたは他の被験体における有用な用量のさらに正確な決定のために用いることができる。

【0300】

本明細書に記載される化合物の毒性および治療有効性は、培養細胞または実験動物における標準的な薬理学的方法、例えばLD₅₀（集団の50%に致死的な用量）およびED₅₀（集団の50%に治療上有効な用量）を決定することにより、決定することができる。毒性と治療上有効性の用量の比は治療指数であり、LD₅₀とED₅₀の比率として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。これらの培養細胞アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおいて用いるための範囲の投与量を処方するために用いることができる。このような化合物の投与量は、好ましくは、ED₅₀を含み毒性がほとんどまたは全くない循環濃度の範囲内にある。投与量は、用いる投与形態および用いる投与経路により、この範囲内で様々でありうる。正確な処方、投与経路、および投与量は、個々の医師が、患者の状態を考慮して選択することができる（例えば、Finglet et al. 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1, p. 1を参照）。

【0301】

別の例においては、毒性研究は、血液細胞組成を測定することにより実施することもできる。例えば、以下のようにして、適当な動物モデルにおいて毒性研究を行うことができる1) 化合物をマウスに投与し（未処置対照マウスも用いなければならない）；2) 各処置群の1匹のマウスの尾部静脈から定期的に血液試料を採取し；そして3) 試料を、赤血球および白血球数、血液細胞組成物、およびリンパ球対多形核細胞のパーセントについて分析する。各用量計画および対照からの結果の比較は、毒性が存在するか否かを示す。

【0302】

各毒性研究の終わりに動物を犠牲にすることにより（好ましくは、the American Veterinary Medical Association guidelines Report of the American Veterinary Medical Assoc. Panel on Euthanasia, Journal of American Veterinary Medical Assoc. / 202:229-249, 1993

にしたがって)、さらなる研究を実施することができる。次に、各処置群の代表的動物を、肉眼剖検により転移の直接証拠、異常な不健康、または毒性について調べることができる。組織の肉眼異常を記録し、組織を組織学的に調べる。体重または血液成分の減少を引き起こす化合物、および主要な臓器に有害な影響を有する化合物はあまり好ましくない。一般に、有害な影響が大きければ大きいほど、化合物はより好ましくない。

【0303】

癌の治療においては、疎水性薬剤の予測される1日用量は1 - 500 mg / 日、好ましくは、1 - 250 mg / 日、最も好ましくは、1 - 50 mg / 日の範囲である。薬剤は、活性成分の血漿レベルが治療の有効性を維持するのに十分であるかぎり、より少ない頻度で投与することができる。

【0304】

血漿レベルは薬剤の有効性を反映するはずである。一般に、化合物が強力であればあるほど、有効性を達成するのに必要な血漿レベルは低い。

【0305】

薬剤および代謝産物の血漿半減期および血漿、腫瘍、および主要な臓器における生物学的分布を決定して、疾患を阻害するのに最も適当な薬剤の選択を容易にすることができる。そのような測定を実施することができる。例えば、薬剤で処置した動物の血漿についてHPLC分析を行い、X線、CATスキャン、およびMRI等の検出方法を用いて放射性標識した化合物の位置を決定することができる。スクリーニングアッセイにおいて強力な阻害活性を示すが、不十分な薬物動力学的特性を有する化合物は、化学構造の変更および再試験により最適化することができる。この点に関しては、優れた薬物動力学的特性を示す化合物をモデルとして用いることができる。

【0306】

投与量および間隔は、個々に、活性成分がキナーゼ調節効果を維持するのに十分な血漿レベル、すなわち最小有効濃度(MEC)を与えるよう調節することができる。MECは、各化合物について異なるが、インビトロのデータ、例えば、限定されないが、本明細書に記載されるアッセイを用いて、キナーゼの50 - 9

0%の阻害を達成するのに必要な濃度から見積もることができる。MECを達成するのに必要な投与量は、個々の特性および投与経路に依存するであろう。しかし、血漿濃度はHPLCアッセイまたはバイオアッセイを用いて決定することができる。

【0307】

投与間隔もまた、MEC値を用いて決定することができる。化合物は、10 - 90%の時間、好ましくは30 - 90%の時間、最も好ましくは50 - 90%の時間、MECより高い血漿レベルを維持する投与計画を用いて投与すべきである。

【0308】

局所投与または選択的取り込みの場合には、薬剤の有効な局所濃度は血漿濃度とは関係ないであろう。

【0309】

投与される特定の組成物の量は、もちろん、治療中の患者、患者の体重、苦痛の激しさ、投与方法、および担当医師の判断に依存するであろう。

【0310】

包装：

組成物は、所望の場合には、活性成分を含む1またはそれ以上の単位用量形を含んでいてもよいパックまたはディスペンサー装置中で提供することができる。パックは、例えば、ブリスターパックなどの金属またはプラスチック箔を含むことができる。パックまたはディスペンサー装置には、投与の指示が添付されていてもよい。パックまたはディスペンサー装置はまた、薬剤の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定された形式の、容器に付随した注意書が添付されていてもよく、その注意書はヒトまたは獣医学的投与用のポリヌクレオチドの形状の当該機関による承認を反映するものである。そのような注意書は、例えば米国食品医薬品局により処方箋調剤薬として承認されたラベルによるものか、または承認された製品に差込まれたものでもよい。適合した薬学的担体中に処方された、本発明の化合物を含む組成物もまた製造され、適当な容器内に配置され、さらに指示された条件による処置のためにラベルを付すことができる。ラベ

ル上に示される適切な状態としては、腫瘍の治療、新脈管形成の阻害、線維症、糖尿病等の治療が挙げられる。

【0311】

機能的誘導体

本発明はまた、本発明のポリペプチドまたは核酸の機能的誘導体を提供する。"機能的誘導体"は、本発明のポリペプチドまたは核酸の"化学的誘導体"、"フラグメント"または"変種"を意味し、これらの用語は以下に定義される。機能的誘導体は、蛋白質の機能の少なくとも一部、例えば蛋白質に特異的な抗体との反応性、非触媒ドメインにより媒介される酵素活性または結合活性を保持しており、これにより本発明にしたがう有用性を有する。遺伝コードの縮重のため、多くの異なる核酸配列が同じアミノ酸配列をコードすることができることは当該技術分野においてよく知られている。同じく、アミノ酸を保存的に変更して、元の機能的性を保持する蛋白質またはポリペプチドを得ることができることも当該技術分野においてよく知られている。いずれの場合においても、すべての順列が本明細書の開示によりカバーされることが意図される。

【0312】

本明細書に記載される単離された核酸分子の機能的等価物も本発明の範囲内に含まれる。遺伝コードの縮重のため、あるコドンと同じアミノ酸を規定する他のコドンで置き換え、同じ蛋白質を生じさせることができる。既知のアミノ酸は、メチオニンおよびトリプトファンを除き、2以上のコドンによりコードすることができるため、核酸配列は実質的に様々でありうる。すなわち、本発明の遺伝子の一部または全部を合成して、配列番号1および配列番号2に記載される配列からなる群より選択される核酸配列と有意に異なる核酸配列を得ることができる。しかし、これによりコードされるアミノ酸配列は保存される。

【0313】

さらに、核酸配列は、配列番号1および配列番号2に記載される配列、またはその誘導体からなる群より選択される核酸の式またはその誘導体の5'-末端および/または3'-末端で少なくとも1つのヌクレオチドを付加、欠失または置換することにより得られるヌクレオチド配列を含んでいてもよい。その付加、欠

失または置換が、ヌクレオチド配列によりコードされる、配列番号1および配列番号2に記載される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を変更しない限り、任意のヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをこのように用いることができる。例えば、本発明は、本発明の核酸配列またはその誘導体の5'-末端に開始コドンとしてATGを付加することにより、または本発明のヌクレオチド配列またはその誘導体の3'-末端に終止コドンとしてTTA、TAGまたはTGAを付加することにより得られる任意の核酸配列を含むことを意図する。さらに、本発明の核酸分子は、必要に応じて、これらの5'-末端および/または3'-末端に付加された制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有することができる。

【0314】

所定の核酸配列のそのような機能的変更により、これに融合した外来核酸配列によりコードされる異種蛋白質の分泌および/またはプロセッシングが促進される機会が与えられる。したがって、遺伝コードにより許容される本発明のキナーゼ遺伝子およびそのフラグメントのヌクレオチド配列のすべての変種は本発明に含まれる。

【0315】

さらに、コドンを削除するかまたは1またはそれ以上のコドンを縮重コドン以外のコドンと置換して、構造的に改変されているが、未改変核酸分子により産生されるポリペプチドと実質的に同じ有用性または活性を有するポリペプチドを製造することが可能である。当該技術分野において認識されているように、2つのポリペプチドは機能的に同等であり、これらの核酸分子の間の相違が遺伝コードの縮重に関連しない場合であっても、これらの製造を生じさせる2つの核酸分子も機能的に同等である。

【0316】

複合体の"化学的誘導体"は、通常は蛋白質の一部ではない追加の化学的成分を含む。蛋白質またはペプチドの共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれる。そのような修飾は、以下に記載するように、ペプチドの標的アミノ酸残基を選択された側鎖または末端残基と反応しうる有機誘導化剤と反応させることにより、分子中に導入することができる。

【0317】

システイン残基は、最も一般的にはアルファ - ハロアセテート（および対応するアミン）、例えばクロロ酢酸またはクロロアセトアミドと反応させて、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得る。システイン残基は、ブromotriphloroacetone, クロロアセチルホスフェート, N - アルキルマレイミド, 3 - ニトロ - 2 - ピリジルジスルフィド, メチル2 - ピリジルジスルフィド, p - クロロ水銀ベンゾエート, 2 - クロロ水銀 - 4 - ニトロフェノール, またはクロロ7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾールと反応させることにより誘導化する。

【0318】

ヒスチジン残基は、pH 5.5 - 7.0 でジエチルプロカーボネートと反応させることにより誘導化することができる。これは、この薬剤がヒスチジンの側鎖に比較的特異的であるためである。臭化パラブromoフェナシルもまた有用である。反応は、好ましくは、0.1 M カコジル酸ナトリウム中でpH 6.0で行う。

【0319】

リジンおよびアミノ末端残基はコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤による誘導化は、リジン残基の電荷を逆転させる効果を有する。1級アミン含有残基を誘導化するための他の適当な試薬には、イミドエステル、例えば、メチルピコリンイミデート；ピリドキサルホスフェート；ピリドキサル；クロロホウ化水素；トリニトロベンゼンスルホン酸；O - メチルイソウレア；2, 4 - ペンタンジオン；およびトランスアミナーゼに触媒されるグリオキシレートとの反応が含まれる。

【0320】

アルギニン残基は慣用的な試薬の1つまたはいくつかと反応させることにより修飾する。これには、例えば、フェニルグリオキサル, 2, 3 - ブタンジオン, 1, 2 - シクロヘキサンジオン, およびニンヒドリンがある。アルギニン残基の誘導化には、グアニジン官能基の高いpKaのため、反応をアルカリ条件中で行うことが必要である。さらに、これらの試薬はリジンの基ならびにアルギニンアルファアミノ基とも反応することができる。

【0321】

チロシン残基は、芳香族性ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンと反応させることにより光学的標識を導入するための修飾のよく知られる標的である。最も一般的には、N - アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを用いて、それぞれO - アセチルチロシル種および3 - ニトロ誘導体を生成する。

【0322】

カルボキシル側鎖（アスパラギン酸およびグルタミン酸）は、カルボジイミド（ $R' - N - C - N - R'$ ），例えば1 - シクロヘキシル - 3 - （2 - モルホリニル（4 - エチル）カルボジイミドまたは1 - エチル - 3 - （4 - アゾニア - 4 , 4 - ジメチルペンチル）カルボジイミドと反応させることにより、選択的に修飾する。さらに、アスパラギン酸およびグルタミン酸残基は、アンモニウムイオンと反応させることにより、アスパラギンおよびグルタミン残基に変換する。

【0323】

グルタミンおよびアスパラギン残基は、しばしば脱アミド化して、対応するグルタミン酸およびアスパラギン酸残基に変換する。あるいは、これらの残基をより穏和な酸性条件下で脱アミド化する。これらの残基のいずれの形も本発明の範囲内である。

【0324】

二官能性薬剤による誘導化は、例えば、蛋白質の成分ペプチドを互いに、または複合体中の他の蛋白質と、または水不溶性支持体マトリクスと、または他の高分子担体と架橋するのに有用である。一般に用いられる架橋薬剤としては、例えば、1, 1 - ビス（ジアゾアセチル） - 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4 - アジドサリチル酸のエステル、ホモ二官能性イミドエステル（3, 3' - ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）等のジスクシンイミジルエステルを含む）、および二官能性マレイミド、例えばビス - N - マレイミド - 1, 8 - オクタンが挙げられる。メチル - 3 - [p - アジドフェニル]ジチオールプロピオイミデート等の誘導化薬剤により、光の存在下で架橋を形成しうる光活性化可能な中間体を得られる。あるいは、反応性の水不溶性マトリクス、例えば臭化シアン活性化炭水化物およ

び米国特許3,969,287;3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,229,537;および4,330,440に記載される反応性基質を蛋白質固定化のために用いることができる。

【0325】

他の修飾としては、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリンまたはトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のアルファアミノ基のメチル化(Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79 - 86 (1983)), N末端アミンのアセチル化、および場合によりC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0326】

そのような誘導化された成分は、安定性、溶解性、吸収、生物学的半減期等を改良することができる。あるいは、これらの成分は、蛋白質複合体の望ましくない副作用を排除するかまたは緩和することができる。そのような効果を媒介する成分は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)に開示されている。

【0327】

"フラグメント"との用語は、これが由来する全長ポリペプチドより短い長さを有する蛋白質または複合体のアミノ酸配列に由来するポリペプチドを示すものとして用いられる。そのようなフラグメントは、例えば、全長蛋白質の蛋白質分解性切断により製造することができる。好ましくは、フラグメントは、蛋白質をコードするDNA配列を適当に改変して、C末端、N末端、および/または天然配列中の1またはそれ以上の部位において1またはそれ以上のアミノ酸を除去することにより、組換えにより得る。蛋白質のフラグメントは、本明細書に記載されるように、シグナル伝達を調節するように作用する物質のスクリーニングに有用である。そのようなフラグメントは、天然の複合体の1またはそれ以上の特徴的部分を保持しているであろうことが理解される。そのような保持される特徴の例

としては、触媒的活性；基質特異性；無傷の細胞中における他の分子との相互作用；制御機能；または天然の複合体またはそのエピトープに対する抗体との結合が挙げられる。

【0328】

本発明の範囲内に入ることが意図される別の機能的誘導体は、天然のポリペプチドに対して、1またはそれ以上のアミノ酸を欠失しているか、追加のまたは置換されたアミノ酸を含む"変種"ポリペプチドである。変種は、蛋白質のDNAコーディング配列を適当に改変して、C末端、N末端、および/または天然配列中の1またはそれ以上の部位において1またはそれ以上のアミノ酸のためのコドンが付加、除去、および/または改変することにより、天然に生ずる複合体成分から誘導することができる。追加、置換および/または追加アミノ酸を有するそのような変種は、上述するように、天然の蛋白質の1またはそれ以上の特徴的部分を保持していることが理解される。

【0329】

アミノ酸残基が除去、挿入および/または置換されている蛋白質の機能的誘導体は、当業者によく知られる標準的な手法を用いて製造することができる。例えば、機能的誘導体の改変された成分は、改変されたコード配列を生成するように、DNAコード配列中のヌクレオチドを修飾する部位特異的突然変異手法（Adelman et al., 1983, DNA 2:183に例示されている）を用いて、その後上述したような手法を用いてこの組換えDNAを原核生物または真核生物宿主細胞中で発現させることにより、製造することができる。あるいは、アミノ酸が削除、挿入および/または置換されている蛋白質は、当該技術分野においてよく知られる方法を用いて、直接化学合成により便利に製造することができる。蛋白質の機能的誘導体は、典型的には天然の蛋白質と同じ質の生物学的活性を示す。

【0330】

表およびその記載

本出願は、ゲノム配列データベースから同定された2つの蛋白質キナーゼポリペプチドを記載する。結果は以下の5つの表にまとめられている。表1は、各遺

伝子の名前，各遺伝子の分類，配列中のオープンリーディングフレームの位置，および対応するペプチドの長さを表す。データは，左から右に，以下のものを表す："遺伝子名"，"ID#na"，"ID#aa"，"FL/Cat"，"スーパーファミリー"，"グループ"，"ファミリー"，"NA長さ"，"ORF開始"，"ORF終了"，"ORF長さ"，および"AA長さ"。"遺伝子名"は，キナーゼまたはキナーゼ様酵素をコードする配列に与えられた名前を表す。各遺伝子は，"SGK"名称およびその後の番号により表される。SGK名は，通常は，1つの連続配列("コンティグ")に構築された多数の重複配列を表す。"ID#na"および"ID#aa"は，本明細書において各核酸およびアミノ酸配列に与えられた同定番号を表す。"FL/Cat"は，遺伝子の長さを表し，FLは全長を，"Cat"は触媒ドメインのみが示されていることを表す。このカラム中の"Partial"とは，配列が部分的蛋白質キナーゼ触媒ドメインをコードすることを示す。"スーパーファミリー"とは，遺伝子が蛋白質キナーゼまたは蛋白質-キナーゼ様であるか否かを識別する。"グループ"および"ファミリー"は，配列ホモロジーにより定義され，先に確立されている系統発生分析に基づく蛋白質キナーゼの分類を表す [Hardie, G. and Hanks S. The Protein Kinase Book, Academic Press (1995) および Hunter T. and Plowman, G. Trends in Biochemical Sciences (1977) 22:18-22 および Plowman G. D. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96:13603-13610]。"NA長さ"は，対応する核酸配列の長さをヌクレオチドで表す。"ORF開始"は，オープンリーディングフレームの開始ヌクレオチドを表す。"ORF終了"は，オープンリーディングフレームの終止コドンを除く最後のヌクレオチドを表す。"ORF長さ"は，オープンリーディングフレームの長さ(終止コドンを除く)をヌクレオチドで表す。"AA長さ"は，対応するヌクレオチド配列においてコードされるペプチドの長さをアミノ酸で表す。

【0331】

表1 - オープンリーディングフレーム

【表1】

遺伝子名	ID#:na	ID#:aa	FL/Cat	スーパーファミリー	グループ	ファミリー	NA長さ	ORF開始	ORF終了	ORF長さ	AA長さ
SGK341	1	3	FLV	蛋白質キナーゼ	STE	STE11	4480	1	4080	4080	1360
SGK351	2	4	no	蛋白質キナーゼ	AGC	S6K	594	1	594	594	198

【0332】

表2は、本明細書に記載される遺伝子の以下の特徴を示す：染色体位置、一塩基多型（SNPs）、dbESTにおける表示、および反復領域。示されるデー

タは、左から右に、以下のとおりである："遺伝子名"、"ID#na"、"ID#a a"、"FL/Cat"、"スーパーファミリー"、"グループ"、"ファミリー"、"染色体"、"SNPs"、"dbEST_ヒット"、および"反復"。最初の7つのカラム(すなわち、"遺伝子名"、"ID#na"、"ID#a a"、"FL/Cat"、"スーパーファミリー"、"グループ"、"ファミリー")の内容は、表1について上述したとおりである。"染色体"は、遺伝子の細胞遺伝学的位置を表す。"SNPs"カラムの情報は、候補一塩基多型(SNPs)の核酸位置および縮重性を示す。例えば、SGK386については、"SNPs"のカラムは"835=M"を含み、これは、位置835においてCおよびAの両方の事例があることを示す(M=CまたはA)。"dbESTヒット"は、対応する遺伝子に対して少なくとも100bpの100%同一性を含む、ESTの公共のデータベース(dbEST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>)中のエントリーの受託番号を示す。これらのESTはdbESTのblastnにより同定した。"反復"は、複雑性が低く、いくつかの別々の遺伝子中に存在する約20bpの長さの短い配列の位置に関する情報を含む。これらの反復は、NCBI(nrna)の非重複核酸データベースに対するDNA配列のblastnにより同定した。この反復カラムに含まれるためには、配列は典型的にはその長さにわたり100%同一性を有し、典型的には少なくとも5つの異なる遺伝子中に存在する。

【0333】

表2 - CHR, SNPs, dbEST, 反復

【表2】

遺伝子名	ID#:na	ID#:aa	FL/Cat	スーパーファミリー	グループ	ファミリー	染色体	SNPs	dbEST ヒット	反復
SGK341	1	3	FLV	蛋白質キナーゼ	STE	STE11	Xp22.1	20 = Y (tgccaccaY) ss18233; 4166=K (cacgaaattccK), ss1509704; 4335=Y (ggaaattcacY) ss15096	AV710158, AA410835, BF132430	none
SGK351	2	4	no	蛋白質キナーゼ	AGC	S6K	17q23	none	none	100-131

【0334】

表3は、キナーゼ触媒ドメインの程度および境界を示す。カラムの標題は以下のとおりである："遺伝子名", "ID#na", "ID#aa", "FL/Cat", "プロファイル開始", "プロファイル終了", "キナーゼ開始", "キナーゼ終了",

および"プロファイル"。最初の7つのカラム(すなわち,"遺伝子名","ID#na","ID#aa","FL/Cat","スーパーファミリー","グループ","ファミリー")の内容は表1について上述したとおりである。"プロファイル開始","プロファイル終了","キナーゼ開始"および"キナーゼ終了"は、隠れマルコフモデルを用いて得た触媒的範囲の境界を規定するデータを表す。プロファイルは完全蛋白質キナーゼ触媒ドメインに対応する261アミノ酸の長さを有する。プロファイルが全長触媒ドメインを認識する蛋白質は,"プロファイル開始"が1であり,"プロファイル終了"が261である。部分的触媒ドメインを有する遺伝子は,"プロファイル開始"が1より大きく(キナーゼドメインの最初が欠失していることを示す),および/または"プロファイル終了"が261より小さい(キナーゼドメインのC末端が欠失していることを示す)。全体の蛋白質中の触媒ドメインの境界は,"キナーゼ開始"および"キナーゼ終了"のカラムで示される。"プロファイル"は、完全であるかまたは"スミス・ウォーターマン"(部分的)であることを示す。キナーゼ触媒ドメインの多重配列アラインメントから出発して、2つの隠れマルコフモデルを構築した。その一方は、触媒ドメインに対する部分的マッチを可能とする;これは"ローカル"HMMであり、配列マッチングにおけるスミス・ウォーターマンアラインメントと類似する。他方の"完全"モデルは、完全触媒ドメインに対するマッチのみを可能とする;これは"グローバル"HMMであり、配列マッチングにおけるNeedleman-Wunschアラインメントと類似する。スミス・ウォーターマンのローカルモデルはより特異的であり、キナーゼ触媒ドメインに対するフラグメント的なマッチを可能とする。一方、グローバルな"完全"モデルはより感度が高く、遠隔のホモログ同定を可能とする。

【0335】

表3 - 蛋白質キナーゼドメイン, 他のドメイン

【表3】

遺伝子名	ID#:na	ID#:aa	FUCat	PKプロファ イル開始	PKプロファ イル終了	蛋白質キナ ーゼ開始	蛋白質キナ ーゼ終了	プロファイル	他のドメイン
SGK341	1	3	FLV	3	261	701	955	グローバル	none
SGK351	2	4	no	24	261	1	175	グローバル	蛋白質キナーゼ C 末端 領域, アミノ酸 176-196, P スコア=5.9e-014

【0336】

表4は、非重複蛋白質配列のNCBIデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/protein.html>)に対するアミノ酸配列のスミス・ウォーターマン類似性検索(マトリックス:

Pam100;ギャップオープン/イクステンションペナルティー12/2)の結果を示す。カラム標題は以下のとおりである："遺伝子名", "ID#na", "ID#aa", "FL/Cat", "スーパーファミリー", "グループ", "ファミリー", "Pスコア", "aa長さ", "aaIDマッチ", "%同一性", "%類似性", "ACC#nr aaマッチ", および"説明"。最初の8つのカラム(すなわち, "遺伝子名", "ID#na", "ID#aa", "FL/Cat", "一連番号", "スーパーファミリー", "グループ", および"ファミリー")の内容は表1について上述したとおりである。"Pスコア"はスミス・ウォーターマン確率スコアを表す。この数値はアラインメントが偶然により生ずるおよその確率を表す。すなわち, 非常に低い数値, 例えば $2.10E-64$ は, クエリーとデータベース標的との間に非常に顕著なマッチがあることを示す。"aa長さ"は, 蛋白質の長さをアミノ酸で表す。"aaIDマッチ"は, アラインメント中で同一であるアミノ酸の数を示す。"%同一性"は, アラインメントした領域にわたって同一であるヌクレオチドのパーセントを示す。"%類似性"は, アラインメント全体にわたって類似するアミノ酸のパーセントを示す。"ACC#nr aaマッチ"は, 非重複蛋白質のNCBIデータベース中で最も類似する蛋白質の受託番号を示す。"説明"は, 非重複蛋白質NCBIデータベース中で最も類似する蛋白質の名前を含む。

【0337】

表4 - スミス・ウォーターマン

【表4】

遺伝子名	ID #;na	ID #;aa	FL/Cat	スーパーファミリー	グループ	ファミリー	Pスコア	aa長さ	aa~IDマッチ	%同一性	%類似性	ACC #;_nraa_マッチ	説明
SGK341	1	3	FLV	蛋白質キナーゼ	STE	STE11	1.2 e-315	1360	783	58	74	NP_005914	M3K5(MEKK 5, ASK1) [Homo sapiens]
SGK351	2	4	no	蛋白質キナーゼ	AGC	S6K	1.30 E-82	188	192	97	98	P23443	リボソーム蛋白質 S6 キナーゼ [Homo sapiens]

【0338】

表5は、本明細書に例示される2つのキナーゼについての96個のヒトcDNA起源のPCRスクリーニングの結果を示す。プラスの記号(+)は、アガロースゲル上に標的キナーゼについて予測されるサイズのバンドが存在することを示

す。表5のカラムは次のとおりである："組織名"，"RNA起源" ("Clontech": Clontech, Inc (<http://www.clontech.com>) より；"Sugen" (社内の起源より)；"NCI": ヒト腫瘍細胞株から社内で誘導)，"組織" (RNAが由来する組織)，およびPCRスクリーニング結果 (SGK341およびSGK351)，次に"コメント"。

【0339】

表5 - PCR発現分析

【表5】

組織名	RNA起源	組織	SGK341	SGK351	コメント
胎児肝臓	Clontech				
胸腺	Clontech				
脾臓	Clontech				
下垂体	Clontech				
胎盤	Clontech				
前立腺	Clontech				
唾液腺	Clontech				
骨格筋	Clontech				
小腸	Clontech				
脊髄	Clontech				
脾臓	Clontech				
胃	Clontech			+	
甲状腺	Clontech			+	
気管	Clontech			+	
子宮	Clontech		+	+	
副腎	Clontech			+	
胎児脳	Clontech		+	+	
胎児腎臓	Clontech				
胎児肺	Clontech				
心臓	Clontech		+		
腎臓	Clontech				
肝臓	Clontech				
肺	Clontech			+	
リンパ球	Clontech			+	
心臓	Sugen				h 絨毛癌
HPAEC	Sugen				直腸近位管上皮細胞
RPTEC	Sugen				乳上皮細胞
HMEC	Sugen				心臓動脈内皮細胞
HCAEC	Sugen			+	
458 medullo RNA	Sugen				
A549/ATC C	細胞株	LUNG			肺癌腫
MDA-MB-2 31	細胞株	BRE		+	乳腺癌, 胸水
Hs 578T	細胞株	BRE		+	腺管癌
MCF-7/AD R-RES	細胞株	BRE		+	
Malme-3M	細胞株	MEL		+	悪性黒色腫, 肺に転 移
A498	細胞株	REN			腎臓癌腫
COLO 205	細胞株	COL		+	結腸腺癌
CCRF-CE M	細胞株	LEU		+	ALL 急性リンパ芽球 白血病

【0340】

【表6】

SF-539	細胞株	CNS		+	神経膠芽細胞腫
SF-295	細胞株	CNS		+	
U251	細胞株	CNS			神経膠芽細胞腫
SNB-19	細胞株	CNS			神経膠芽細胞腫
OVCAR-4	細胞株	OV			
OVCAR-3	細胞株	OV		+	卵巢腺癌
TCGP	Sugen			+	
HMEC	Sugen				心臓動脈内皮細胞
HOP-62	細胞株	LUNG			肺腺癌
NCI-H522	細胞株	LUNG		+	肺腺癌
HOP-92	細胞株	LUNG		+	肺大細胞癌腫
EKVX	細胞株	LUNG		+	肺腺癌
NCI-H23	細胞株	LUNG		+	肺腺癌
NCI-H226	細胞株	LUNG			肺扁平上皮癌
NCI-H322 M	細胞株	LUNG			肺 Br. A./ 肺細気管 支肺胞上皮癌
NCI-H460	細胞株	LUNG		+	肺大細胞癌腫
OVCAR-5	細胞株	OV			
OVCAR-8	細胞株	OV		+	
IGROV1	細胞株	OV		+	
SK-OV-3	細胞株	OV			卵巢腺癌, 悪性腹水
SNB-75	細胞株	CNS			星状細胞腫
SF-268	細胞株	CNS		+	神経膠芽細胞腫
CCRF-CE M	細胞株	LEU		+	ALL 急性リンパ芽球 白血病
K-562	細胞株	LEU		+	CML 慢性骨髄性白 血病
MOLT-4	細胞株	LEU		+	ALL 末梢血, 急性リ ンパ芽球白血病
HL-60	細胞株	LEU		+	PML 末梢血, 前骨髄 球白血病
RPMI 8226	細胞株	LEU		+	多発性骨髄腫
DU-145	細胞株	PRO		+	前立腺癌腫
PC-3	細胞株	PRO			前立腺腺癌
HCC-2998	細胞株	COL			
HCT 116	細胞株	COL		+	結腸癌腫
SW-620	細胞株	COL		+	結腸腺癌, リンパ球転 移
HCT-15	細胞株	COL		+	結腸腺癌
KM-12	細胞株	COL		+	
UO-31	細胞株	REN		+	
Caki-1	細胞株	REN		+	明細胞癌腫, 直腸原 発性, 皮膚に転移
RXF 393	細胞株	REN		+	
ACHN	細胞株	REN		+	直腸腺癌

【 0 3 4 1 】

【表 7】

786-0	細胞株	REN		+	原発性直腸細胞腺癌
TK-10	細胞株	REN			
LOX IMVI	細胞株	MEL			メラニン欠乏性黒色腫
SK-MEL-2	細胞株	MEL			悪性黒色腫、大腿の皮膚に転移
SK-MEL-5	細胞株	MEL			悪性黒色腫、腋窩節に転移
SK-MEL-28	細胞株	MEL			悪性黒色腫
UACC-62	細胞株	MEL			
UACC-257	細胞株	MEL			悪性黒色腫
M14	細胞株	MEL			悪性黒色腫
MCF7	細胞株	BRE			乳癌、胸水
MDA-MB-231	細胞株	BRE			乳癌、胸水
MDA-MB-435	細胞株	BRE			
MDA-N	細胞株	BRE			
T-47D	細胞株	BRE			
精巣	組織	正常			
骨髄	組織	正常			
乳腺	組織	正常			
リンパ球	組織	正常			
十二指腸	組織	正常			
SR	細胞株	LEU			大細胞白血病 (#;501832-16 より)

【0342】

実施例

以下の実施例は限定ではなく、本発明の種々の観点および特徴の代表的なものにすぎない。以下の実施例は、本発明にしたがう核酸分子、ならびにこれによりコードされるポリペプチドの単離および特徴付けを示す。

【0343】

実施例1：蛋白質キナーゼをコードするゲノムフラグメントの同定および特徴づけ

材料および方法

新規キナーゼは、Celeraヒトゲノム配列データベースから、および公共のHuman Genome Sequencing project (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から、70の哺乳動物および酵母キナーゼ触媒ドメイン配列で構築した隠れマルコフモデル(HMMR

)を用いて同定した。これらの配列は、2つの配列が50%以上の配列同一性を有しないようにキナーゼの広範な収集物から選択した。ゲノムデータベースエントリーは、6つのオープンリーディングフレームに翻訳し、HMMR 2.1のFieldプログラム可能アレイ(FPGA)加速版を有するTimelogic Decypherボックスを用いて、モデルに対してこれらを検索した。HMMRプロファイルに対してアラインメントした、予測された蛋白質配列をコードするDNA配列を、元のゲノムデータベースから抽出した。次に、核酸配列をPangea Clusteringツールを用いてクラスター化し、反復エントリーを排除した。次に推定蛋白質キナーゼ配列を一連のクエリーおよびフィルターを通して順番に走らせて、新規蛋白質キナーゼ配列を同定した。特に、HMMRで同定された配列は、BLASTNおよびBLASTXを用いて、既知のヒト蛋白質キナーゼおよびすべてのその後の新規蛋白質キナーゼ配列をそれが同定されるにつれて含有するヌクレオチドおよびアミノ酸レポジトリに対して検索した。出力はスプレッドシートで表示して、手動検査で既知の遺伝子を排除することを容易にした。2つのモデル、すなわち、"完全"モデルおよび"部分"またはスミス・ウォーターマンモデルを開発した。部分モデルを用いて準触媒的キナーゼドメインを同定し、完全モデルを用いて完全触媒ドメインを同定した。次に選択したヒットをBLASTNを用いて公共nrnaおよびESTデータベースに対してクエリーを行い、これらが実際にユニークであることを確認した。場合によっては、新規遺伝子は、先に同定されている齧歯類または脊椎動物蛋白質キナーゼのオルトログであると判定された。

【0344】

部分DNA配列の延長による全長オープンリーディングフレームの包含は、いくつかの方法により行った。表9に示されるcDNAデータベースを繰り返しblastn検索して、ゲノム配列を延長したcDNAを見いだした。"LifeSeqGold"データベースはIncyte Genomics, Inc (<http://www.incyte.com/>)から入手した。NCBIデータベースはNational Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から入手した。

h.gov/)から入手した。すべてのblastn検索は、ヌクレオチドミスマッチについてのペナルティ-3、およびヌクレオチドマッチのリワード1を用いて行った。ギャップ付きblastアルゴリズムは以下に記載されている(Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402)。

【0345】

部分DNA配列の伸長による全長オープンリーディングフレームの包含はまた、ゲノムデータベースの検索の繰り返しにより行った。第1の方法は、スミス-ウォーターマンアルゴリズムを用いて、最も近いホモログまたはオルトログを部分配列に対して蛋白質-蛋白質検索を行った。標的データベースは、Genescanおよびヒトゲノムプロジェクト(HGP)ならびにCeleraから得られた全ヒトゲノム配列のオープンリーディングフレーム(ORF)予測からなる。検索したゲノムデータベースの完全なセットは以下の表7に示される。潜在的な伸長をコードするゲノム配列は、NCBI非重複データベースに対するblastp分析を行ってヒットの新規性を確認することによりさらに評価した。伸長するゲノム配列は、DNASTARのSeqmanプログラムを用いて潜在的イントロンを削除した後にcDNA配列中に組み込んだ。スミス-ウォーターマン検索について用いたデフォルトのパラメータは以下のとおりである。マトリクス:PAM100;ギャップオープニングペナルティ:12;ギャップ伸長ペナルティ:2。Genescan予測は、Genescanプログラムを、Chris Burge and Sam Karlin("Prediction of Complete Gene Structures in Human Genomic DNA", *JMB* (1997) 268(1): 78-94)に詳細が記載されるように用いて行った。ゲノムDNAからのORFの予測は

、標準的な6フレーム翻訳を用いて行った。

【0346】

ゲノム配列からDNA伸長を規定する別の方法は、Genescanプログラムを用いてゲノムデータベースを繰り返し検索してエクソンスプライシングを予測した。次にこれらの予測された遺伝子を、関連するキナーゼに対するホモロジーに基づいてこれらが部分遺伝子の"本物の"伸長であるかを見ることにより評価した。

【0347】

別の方法は、Genewiseプログラム(<http://www.sanger.ac.uk/Software/Wise2/>)を使用して、最も近いオルトログ/ホモログに対するホモロジーに基づいて潜在的ORFを予測することを含む。Genewiseは、2つの入力、すなわち相同の蛋白質と目的とする遺伝子を含むゲノムDNAを必要とする。ゲノムDNAはCeleraおよびヒトゲノムプロジェクトのデータベースのblastn検索により同定した。オルトログは、NCBI非重複蛋白質データベース(NRAA)のblastp検索により同定した。Genewiseは、蛋白質配列をゲノムDNA配列と比較し、イントロンおよびフレームシフトエラーを得ることができる。

【0348】

表6 - cDNAに基づく配列延長に用いたデータベース

【表8】

データベース	データベース日付
LifeGold templates	2001年2月
LifeGold compseqs	2001年2月
LifeGold compseqs	2001年2月
LifeGold compseqs	2001年2月
LifeGold fl	2001年2月
LifeGold flft	2001年2月
NCBI ヒト Ests	2001年2月
NCBI ネズミ Ests	2001年2月
NCBI 非重複	2001年2月

【0349】

表7 - ゲノムに基づく配列延長に用いたデータベース

【表9】

データベース	登録物の数	データベース日付
Celerav. 1-5	5,306,158	2000年1月
Celera v. 6-10	4,209,980	2000年3月
Celera v. 11-14	7,22,425	2000年4月
Celera v. 15	243,044	2000年4月
Celera v. 16-17	25,885	2000年4月
Celera Assembly 5 (release 25h)	479,986	2001年3月
HGP Phase 0	3,189	2000年11月1日
HGP Phase 1	20,447	2001年1月1日
HGP Phase 2	1,619	2001年1月1日
HGP Phase 3	9,224	2001年3月
HGP Chromosomal assemblies	2759	2001年3月

【0350】

結果

仮出願において遺伝子を延長するのに用いた配列情報源を以下に示す。Genewiseを用いて延長した遺伝子については、蛋白質オルトログおよびゲノムDNAの受託番号が記載されている(Genewiseはゲノム配列から標的遺伝子のコーディング配列を組み立てるためにオルトログを用いる)。オルトログのアミノ酸配列は、蛋白質のNCBI非重複データベースから得た(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/protein.html>)。ゲノムDNAは2つの起源、すなわち、CeleraおよびNCBI-NRNAからのものであり、これは以下に示される。cDNA起源もまた以下に示される。Genscan予測の入力としてすべてのゲノム配列を用いてスプライシング部位を予測した[Burge and Karlin, JMB (1997) 268(1):78-94]。略号:HGP:ヒトゲノムプロジェクト;NCBI,National Center for Biotechnology Information.

【0351】

SGK341, 配列番号1および3

Genewiseホモログ：NP_005914 M3K5 (MEKK5, ASK1) [Homo sapiens]

ゲノムコンティグ：Celeraconティグ90000627861182
SGK341のNCBI非重複に対するBlastxから，MAP/ERKキナーゼキナーゼ5 (Homo sapiens) が最も近いホモログとしてヒットした。200kbのCelerasm5hコンティグ90000627861182を用いてgenewise/genscan/sym4予測を行った。モデルとしてMAP/ERKキナーゼキナーゼ5についてGenewiseを走らせて，最終配列を得た。

SGK351，配列番号2および4

Genewiseホモログ：ヒトリボソームS6キナーゼP23443

ゲノムコンティグ：8099920

【0352】

SGK341 (配列番号1および3) は，4480ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置1で開始し，位置4080で終了し，4080ヌクレオチドの長さのORFを与える。停止コドンは4081から4083である。3'非翻訳領域はヌクレオチド4081から4480である。予測蛋白質は1360アミノ酸の長さである。この配列は全長キナーゼ遺伝子である。これは，STE11ファミリーの蛋白質キナーゼであると分類される。この遺伝子は染色体位置Xp22.1にマップされる。この領域(Xp)における遺伝子の増幅は，結腸直腸癌のリスクの増加と関連づけられている(Knuutila, et al.)。この遺伝子はヌクレオチド4120，4166，および4335に3つの一塩基多型を含む。多型の性質およびdbSNP受託番号は以下のとおりである：4120=Y(tgtcccaccaY)ss18233；4166=K(cacgaattccK)，ss1509704；4335=Y(gaaattcacY)ss1509699(多型の位置のあいまいさを低下させるために多型の上流10ヌクレオチドが示されている)。すべてのSNPsは3'非コーディング領域中に存在する。この遺伝子のヌクレオチド配列は発現配列タグの公共データベース中に以下のESTとして示されている：AV7101

58, AA410835, およびBF132430。この遺伝子中には小さい反復領域は存在しない。

【0353】

SGK351 (配列番号2および4) は594ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置1で開始し, 位置594で終了し, 594ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は198アミノ酸の長さである。この配列は部分キナーゼ触媒ドメインを含む。これはAGCグループおよびS6Kファミリーの蛋白質キナーゼとして分類される。この遺伝子は細胞遺伝学的領域17q23にマップされる。この染色体位置(17q22 - q25)の増幅は, 乳癌腫および膀胱癌の発症率の増加と関連づけられている(Knuttila, et al.)。この遺伝子はマップされた一塩基多型の候補を含まない。この遺伝子を表すESTはdbESTには見いだされない。この遺伝子はヌクレオチド位置109 - 131に反復配列を有する。

【0354】

実施例2a: 本発明のポリペプチドの発現分析

発現分析

選択された遺伝子についての遺伝子発現パターンを, 96のヒト組織のPCRスクリーニングを用いて調べた。この手法では組織間の定量的発現レベルは得られないが, PCRにより検出可能なレベルで遺伝子を発現する組織とそうではない組織を同定することができる。

【0355】

実施例2b: 予測蛋白質

SGK341 (配列番号1および3) は, 1360アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはSTE11ファミリーの蛋白質キナーゼであると分類される。この蛋白質中のキナーゼドメインは, プロファイル位置3からプロファイル位置261について, 261アミノ酸の全長キナーゼドメインの隠れマルコフプロファイルとマッチする。コードされる蛋白質中のキナーゼ触媒領域の位置はアミノ酸701からアミノ酸955である。この蛋白質配列を用いるアミノ酸配列の公共データベース(NRAA)のスミス・ウォーターマン検索の結果は以下のと

おりである：Pスコア = 1.2×10^{-315} ；同一アミノ酸の数 = 783；%同一性 = 58%；%類似性 = 74%；NRAA中の最も類似するエントリーの受託番号はNP__005914である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前，説明および種は以下のとおりである：M3K5 (MEKK5, ASK1) [Homo sapiens]。

【0356】

SGK351 (配列番号2および4)は，198アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これは以下のように分類される (スーパーファミリー/グループ/ファミリー)：蛋白質キナーゼ，AGC，S6K。この蛋白質中のキナーゼドメインは，プロファイル位置24からプロファイル位置261について，261アミノ酸の全長キナーゼドメインの隠れマルコフプロファイルとマッチする。コードされる蛋白質中の部分キナーゼ触媒領域の位置はアミノ酸1からアミノ酸175である。この蛋白質配列を用いるアミノ酸配列の公共データベース (NRAA) のスミス・ウォーターマン検索の結果は以下のとおりである：Pスコア = 1.3×10^{-82} ；同一アミノ酸の数 = 192；%同一性 = 97%；%類似性 = 98%；NRAA中の最も類似するエントリーの受託番号はP23443である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前，説明および種は以下のとおりである：リボソーム蛋白質S6キナーゼ [Homo sapiens]。この蛋白質中で同定されたキナーゼ触媒ドメイン以外のドメインは以下のとおりである：蛋白質キナーゼC末端ドメイン，アミノ酸176 - 196，Pスコア = 5.9×10^{-14} 。

【0357】

PCRスクリーニング：

PCRによるdscDNAテンプレートからの発現源についてのスクリーニング
dscDNAテンプレートの調製

dscDNAテンプレートは，組織アレイ遺伝子発現プロトコルの材料および方法に詳細に記載されるように作成した対称タグ付けリバーストランスクリプターゼのsscDNA産物のPCR増幅により調製した。増幅した組織起源は，例えば表7に示される。増幅条件は以下のとおりであった：200 μ lのPCR反応につき，100 μ lのPremixTakaraExTaq，20.0 μ lの

pwoDNAポリメラーゼ(1/10希釈, 以下のように作成: 1 μ l pwo (5ユニット/ μ l), 1 μ l 10 \times PCR緩衝液(20mM MgSO₄, 8 μ l水), 4.0 μ lのsscDNAテンプレート(リバーストランスクリプターゼ生成物), 8.0 μ lの10 pmol/ μ l (10 μ M)プライマー(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT) (1.0 μ M最終濃度)および68.0 μ lのH₂Oを加えた。反応は以下の方法にしたがって増幅した: 高温で開始(95 $^{\circ}$ C, 1分間), 95 $^{\circ}$ Cで1分間, 24サイクル, 95 $^{\circ}$ Cで20秒間, 65 $^{\circ}$ Cで30秒間, 68 $^{\circ}$ Cで6分間, 68 $^{\circ}$ Cで10分間, 1サイクルおよび以後4 $^{\circ}$ C。PCR反応の後, 5-10 μ lの生成物を1 kbラダーサイズ標準とともにアガロースゲルに負荷して, 生成物の収率と均一性を評価した。表5中のプラスの記号(+)は, 予測サイズにPCR産物が存在することを示す。産物は切り出して配列を確認した。cDNA起源をスクリーニングするために用いたオリゴヌクレオチドおよびPCR産物のサイズは以下のとおりである:

配列番号1, SGK341 (Ste/Ste11)

5'プライマー CAGCAGGCAGTACGGTGGAGC

3'プライマー GTTTGGTGTAAACTTGATTGTCGG

バンドの予測サイズ 336 bp

バンドの実測サイズ 約350

配列番号2, SGK351 (AGC/S6K)

5'プライマー GAGAACTATTTATGCAGTTAGAAAG

3'プライマー CCAGAAGTTCTTCCCAGTTAATGTG

バンドの予測サイズ 519 bp

バンドの実測サイズ 約550 bp

発現パターン 胃, 胸腺, 気管, 子宮, 副腎, 胎児脳および他の正常組織, 多くの癌細胞株も正しいサイズのバンドを示す。

【0358】

結果

配列番号1, SGK341は, PCRにより以下のヒト組織/細胞株から同定された: 子宮, 胎児脳および心臓。この遺伝子はその発現が限定されている。

配列番号2, SGK351は, PCRにより以下のヒト組織/細胞株から同定された: 胎児肝臓, 胸腺, 膵臓, 下垂体, 胎盤, 前立腺, 唾液腺, 骨格筋, 小腸, 脊髄, 脾臓, 胃, 甲状腺, 気管, 子宮, 副腎, 胎児脳, 胎児腎臓, 胎児肺, 心臓, 腎臓, 肝臓, 肺, リンパ節, 心臓, HPAEC, RPTEC, HMEC, HCAEC, 458medullorRNA, A549/ATCC, MDA-MB-231, Hs578T, MCF-7/ADR-RES, Malme-3M, A498, COLO205, CCRF-CEM, SF-539, SF-295, U251, およびSNB-19。この遺伝子は広い発現パターンを示す。

【0359】

実施例2c: キナーゼ活性を示すポリペプチドの規定されたグループへの分類 STEグループ

配列番号1, SGK341は, キナーゼのSTEファミリーの新規メンバーである。蛋白質キナーゼのSTEファミリーは, 細胞増殖, 生存, 分化および細胞ストレスに対する応答において重要な多くのシグナル伝達経路の鍵となるレギュレーターである。蛋白質キナーゼのSTEグループには, その主要なプロトタイプとしてNEKキナーゼ, ならびにステライル蛋白質キナーゼのSTE7, STE11およびSTE20ファミリーが含まれる。SGK341(配列番号1)は, STEグループのSTE11ファミリーの新規なメンバーである。コードされる蛋白質は, 細胞生存の制御に關与するキナーゼであるASK1と58%の同一性を有する(Hatai, et al. J Biol Chem 2000 Aug 25; 275(34): 26576-81)。SGK341(配列番号1)は, 細胞生存, ならびにSTEファミリーメンバーにより制御される他の重要なシグナリング経路において役割を果たすかもしれない。

【0360】

AGCグループ

配列番号2, SGK351は, 蛋白質キナーゼのAGCグループのメンバーである。蛋白質キナーゼのAGCグループには, その主要なプロトタイプとして, 蛋白質キナーゼC(PKC), cAMP依存性蛋白質キナーゼ(PKA), G蛋白質共役レセプターキナーゼ[(ARKおよびロドプシンキナーゼ(GRK1))

], ならびに p70S6K および AKT が含まれる。配列番号 2, SGK351 は, AGC グループキナーゼの特に S6K ファミリーに属する。これは, 198 アミノ酸の領域にわたりヒトリボソーム蛋白質 S6 キナーゼ (P23443) に対して 97% 同一である。ヒトリボソーム S6 蛋白質キナーゼのファミリーは, 少なくとも 8 個のメンバーから構成される (RSK1, RSK2, RSK3, RSK4, MSK1, MSK2, p70S6K および p70S6Kb)。リボソーム蛋白質 S6 蛋白質キナーゼは, 重要な多面発現性の機能を果たし, その中でも特に, 蛋白質生合成の間の mRNA 翻訳の制御において鍵となる役割を果たす (Eur J. Biochem 2000 Nov; 267(21): 6321-30, Exp Cell Res. 1999 Nov 25; 253(1): 100-9, Mol Cell Endocrinol 1999 May 25; 151(1-2): 65-77)。p70S6 による S6 リボソーム蛋白質のリン酸化はまた, 細胞運動性 (Immunol Cell Biol 2000 Aug; 78(4): 447-51), および細胞成長 (Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2000; 65: 101-27) の制御における関与も示唆されており, したがって, 腫瘍転移, 免疫応答および組織修復においても重要であろう。配列番号 2, SGK351 は, S6 キナーゼのファミリーの追加のメンバーであり, 癌, 炎症, ならびに他の疾病状態における潜在的役割を有するかもしれない。

【0361】

実施例 3: 哺乳動物蛋白質キナーゼをコードする cDNA の単離

材料および方法

新規クローンの同定

総 RNA は, 原発性腫瘍, 正常および腫瘍細胞株, 正常ヒト組織, およびソートしたヒト造血細胞細胞から Chomczynski および Sacchi (P. Chomczynski and N. Sacchi, Anal. Biochem. 162, 156 (1987)) のグアニジン塩/フェノール抽出プロトコルを用いて単離する。これらの RNA を用いて, Superscript Pre Amplification System (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) を用いて cDNA を合成する。

h e r s b u r g , M D ; G e r a r d , G F e t a l . (1 9 8 9) , F O C U S 1 1 , 6 6) を用いて、製造元により推奨される条件で一本鎖 c D N A を生成する。典型的な反応においては、60 μ l の反応容量中で10 μ g の総 R N A および1.5 μ g のオリゴ (d T)₁₂₋₁₈ を用いる。生成物を R N a s e H で処理し、H₂O で100 μ l に希釈する。続く P C R 増幅のためには、1 - 4 μ l のこの s s c D N A を各反応において用いる。

【0362】

縮重オリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems 3948 DNA 合成機で確立されたホスホルアミダイト化学を用いて合成し、エタノールで沈澱させ、精製せずに P C R 用に用いる。これらのプライマーは、いくつかの蛋白質キナーゼの触媒ドメイン中の保存モチーフのセンスおよびアンチセンス鎖に由来する。縮重ヌクレオチド残基の表示は以下のとおりである：N = A , C , G , または T ; R = A または G ; Y = C または T ; H = A , C または T , G ではない ; D = A , G または T , C ではない ; S = C または G ; および W = A または T。

【0363】

P C R 反応は、多数の一本鎖 c D N A に適用される縮重プライマーを用いて行う。プライマーをそれぞれ最終濃度5 μ M で、10 mM T r i s H C l , p H 8 . 3 , 50 mM K C l , 1 . 5 mM M g C l₂ , 各200 μ M デオキシヌクレオシド三リン酸、0.001%ゼラチン、1.5 U A m p l i T a q D N A ポリメラーゼ (P e r k i n - E l m e r / C e t u s) , および1 - 4 μ g の c D N A を含む混合物に加える。95 ° で3分間変性させた後、サイクルの条件は、94 ° で30秒間、50 ° で1分間、および72 ° で1分45秒間を35サイクルである。300 - 350 b p の間に移動した P C R フラグメントを G e n e C l e a n キット (B i o 1 0 1) を用いて2%アガロースゲルから単離し、製造元のプロトコルにしたがって p C R I I ベクター (I n v i t r o g e n C o r p . U . S . A .) 中に T - A クローニングする。

【0364】

Q i a g e n カラムを用いるミニプラスミド D N A 調製用にコロニーを選択し

、サイクルシーケンシング染料ターミネータキットおよびAmpli Taq DNAポリメラーゼ、FS (ABI, Foster City, CA)を用いてプラスミドDNAを配列決定する。配列決定反応生成物はABI Prism 377 DNAシーケンサーにかけ、BLASTアラインメントアルゴリズム (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10)を用いて分析する。

【0365】

追加のPCR戦略を用いて、正確なまたはほぼ正確なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて種々のPCRフラグメントまたはESTを接続する。PCR条件は上述したとおりであるが、ただし、アニーリング温度は、式： $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ を用いて各オリゴ対について計算する。

【0366】

cDNAクローンの単離：

ヒトcDNAライブラリをキナーゼ関連遺伝子に対応するPCRまたはESTフラグメントで探索する。プローブをランダムプライミングにより ^{32}P で標識し、ライブラリスクリーニングの標準的手法にしたがって、 2×10^6 cpm/mLで用いる。プレハイブリダイゼーション(3時間)およびハイブリダイゼーション(一夜)は、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液、 2.5% 硫酸デキストラン、 $50 \text{ mM Na}_2\text{PO}_4 / \text{NaHPO}_4$ 、 $\text{pH } 7.0$ 、 50% ホルムアミド、 100 mg/mL 変性サケ精子DNA中で 42°C で行う。ストリンジェントな洗浄は、 65°C で、 $0.1 \times \text{SSC}$ および 0.1% SDS中で行う。DNA配列決定は、サイクルシーケンシング染料ターミネータキットを用い、Ampli Taq DNAポリメラーゼFS (ABI, Foster City, CA)を用いて両方の鎖について行う。配列決定反応生成物をABI Prism 377 DNAシーケンサーにかける。

【0367】

実施例4：哺乳動物蛋白質キナーゼの発現分析

材料および方法

ノザンプロット分析

ノザンプロットは、ヒト成人組織（例えば、胸腺、肺、十二指腸、結腸、精巣、脳、小脳、皮質、唾液腺、肝臓、膵臓、腎臓、脾臓、胃、子宮、前立腺、骨格筋、胎盤、乳腺、膀胱、リンパ節、脂肪組織）、および2つのヒト胎児正常組織（胎児肝臓、胎児脳）からの60種類のヒト腫瘍細胞株（例えば、HOP-92、EKVX、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H322M、NCI-H460、NCI-H522、A549、HOP-62、OVCAR-3、OVCAR-4、OVCAR-5、OVCAR-8、IGROV1、SK-OV-3、SNB-19、SNB-75、U251、SF-268、SF-295、SF-539、CCRF-CEM、K-562、MOLT-4、HL-60、RPMI8226、SR、DU-145、PC-3、HT-29、HCC-2998、HCT-116、SW620、Colo205、HTC15、KM-12、UO-31、SN12C、A498、CaKi1、RXF-393、ACHN、786-0、TK-10、LOXIMVI、Malme-3M、SK-MEL-2、SK-MEL-5、SK-MEL-28、UACC-62、UACC-257、M14、MCF-7、MCF-7/ADRRES、Hs578T、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-N、BT-549、T47D）から単離した10 µgの総RNAを変性ホルムアルデヒド1.2%アガロースゲルに流し、ナイロン膜に移すことにより調製する。

【0368】

フィルターを、キナーゼ遺伝子のいくつかの挿入物から合成したランダムプライミング [^{32}P] dCTP 標識プローブでハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションは、6XSSC、0.1%SDS、1Xデンハルト溶液、100 µg/mLの変性ニシン精子DNA中で、 $1-2 \times 10^6$ cpm/mLの ^{32}P 標識DNAプローブで42℃で一夜行う。フィルターを0.1XSSC/0.1%SDS中で65℃で洗浄し、Molecular Dynamicsホスファーマージャーで露光する。

【0369】

定量的PCR分析

種々の正常ヒト組織および細胞株からRNAを単離する。一本鎖cDNAは、

10 μ gの上述した各RNAからSuperscript Preamplification System (Gibco BRL)を用いて合成する。次に、これら的一本鎖テンプレートを各クローンに特異的なプライマーとともに25サイクルのPCR反応において用いる。反応生成物を2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドにより染色し、UV光ボックスで写真を撮る。各試料についてSTK特異的バンドの相対的強度を評価する。

【0370】

DNAアレイに基づく発現分析

プラスミドDNAアレイプロットは、0.5 μ gの各キナーゼの変性プラスミドをナイロン膜に付加することにより調製する。[³²P]dCTP標識一本鎖DNAプローブは、いくつかのヒト免疫組織起源または腫瘍細胞（例えば、胸腺、樹状細胞、肥満細胞、単球、B細胞（初代、Jurkat, RPMI 8226, SR）、T細胞（CD8/CD4+, TH1, TH2, CEM, MOLT4）、K562（巨核球）から単離された総RNAから合成する。ハイブリダイゼーションは、42℃で16時間、6XSSC、0.1%SDS、1Xデンハルト溶液、100 μ g/mL変性ニシン精子DNA中で、10⁶cpm/mLの[³²P]dCTP標識一本鎖プローブを用いて行う。フィルターを0.1XSSC/0.1%SDSで65℃で洗浄し、Molecular Dynamicsホスファイメージャーで定量的分析を行う。

【0371】

実施例5：蛋白質キナーゼ遺伝子発現

ベクターの構築

材料および方法

発現ベクターの構築

ヒトcDNAのいくつかから発現構築物を作成する：a) pCDNA発現ベクター中の完全長クローン；b) GST発現カセットのC末端に融合させた新規キナーゼの触媒ドメインを含むGST融合構築物；およびc) pCDNAベクター中に挿入されたキナーゼドメイン中の予測ATP結合部位にLysからAla（KからA）変異を含む完全長クローン。

【0372】

キナーゼの"KからA"変異体は優性負の構築物として機能するかもしれず、これらの新規STKの機能を解明するために用いられる。

【0373】

実施例6：蛋白質キナーゼに対する特異的免疫試薬の作成材料および方法

単離されたキナーゼポリペプチドに対応するKLH-またはMAP-コンジュゲート化合物ペプチドに対する特異的免疫試薬をウサギで生成させる。C末端ペプチドをグルタルアルデヒドでKLHとコンジュゲートさせ、遊離C末端を残した。内部ペプチドは、ブロックされたN末端を用いてMAP-コンジュゲートさせた。追加の免疫試薬はまた、細菌で発現させた各新規PTKまたはSTKの細胞質ドメインを含むGST融合蛋白質でウサギを免疫することにより生成することができる。内因性起源について試験する前に、最初に、種々の免疫血清を、組換え蛋白質に対する反応性および選択性について試験する。

【0374】

ウエスタンブロット

SDS PAGE上の蛋白質をイモビロン膜に移す。洗浄緩衝液はPBST(標準的リン酸緩衝化食塩水, pH7.4+0.1% Triton X-100)である。ブロッキングおよび抗体インキュベーション緩衝液はPBST+5%ミルクである。抗体希釈は1:1000から1:2000の範囲である。

【0375】

実施例7：蛋白質キナーゼの組換え発現および生物学的アッセイ材料および方法哺乳動物細胞におけるキナーゼの過渡的発現

キナーゼ構築物を含むpcDNA発現プラスミド(10µgDNA/100mmプレート)をリポフェクタミン(GibcoBRL)とともに293細胞中に導入する。72時間後、細胞を0.5mLの可溶化緩衝液(20mMHEPES, pH7.35, 150mM NaCl, 10%グリセロール, 1% Triton X-100, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 2mMフッ化フェ

ニルメチルスルホニル, 1 μ g/mL アプロチニン) 中に回収する。試料アリオートを6%アクリルアミド/0.5%ビスアクリルアミドゲルのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で分離し, 電気泳動的にニトロセルロースに移す。非特異的結合は, プロットをBlotto(5%w/v無脂乾燥ミルクおよび0.2%v/v Nonidet P-40(Sigma)を含有するリン酸緩衝化食塩水)中でブレインキュベートすることによりブロックし, 種々の抗ペプチドまたは抗GST融合蛋白質特異的抗血清を用いて組換え蛋白質を検出する。

【0376】

インビトロキナーゼアッセイ

キナーゼ発現構築物でトランスフェクトした3日後, 10cmプレートの293細胞をPBSで洗浄し, 氷上でホスファターゼ阻害剤を含む2mLのPBSTDsで溶解する(10mM NaHPO₄, pH7.25, 150mM NaCl, 1%TritonX-100, 0.5%デオキシコール酸, 0.1%SDS, 0.2%アジ化ナトリウム, 1mM NaF, 1mM EGTA, 4mMオルトバナジン酸ナトリウム, 1%アプロチニン, 5 μ g/mLロイペプチン)。細胞断片を遠心分離(12000 \times g, 15分間, 4 $^{\circ}$ C)により除去し, 溶解物をプロテインAセファロースの1:1スラリー50 μ lとともにそれぞれ1時間2回インキュベートすることにより前精製する。0.5mLの精製上清を, 10 μ lのプロテインA精製キナーゼ特異的抗血清(GST融合蛋白質または抗ペプチド抗血清から生成)プラス50 μ lのプロテインA-セファロースの1:1スラリーで, 4 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートする。次にビーズをPBSTDs中で2回, HNTG(20mMHEPES, pH7.5/150mM NaCl, 0.1%TritonX-100, 10%グリセロール)中で2回洗浄する。

【0377】

セファロースビーズ上の免疫精製キナーゼを20 μ lのHNTG+30mM MgCl₂, 10mM MnCl₂, および20 μ Ci [³²P]ATP(3000Ci/mmol)中に再懸濁する。キナーゼ反応は室温で30分間実施し, 50mM EDTAを補充したHNTGを加えることにより停止させる。試料をH

NTG中で6回洗浄し、SDS試料緩衝液中で5分間煮沸し、6%SDS-PAGEおよび続くオートラジオグラフィーにより分析する。リン酸化アミノ酸の分析は、SDS-PAGEゲルから切り出した³²P-標識バンドの標準的2D法により行う。細菌で発現させたキナーゼのGST融合構築物についても同様のアッセイを行う。

【0378】

実施例8a：蛋白質キナーゼの染色体位置

材料および方法

いくつかの情報源を用いて、本明細書に記載される遺伝子のそれぞれの染色体上の位置に関する情報を得た。最初に、これらのコンティグの細胞遺伝学マップ位置をそのGenbankの記録の表題またはテキストから見いだすか、またはNCBIヒトゲノムマップビューワーにより調査した(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/hum_srch?)。

【0379】

あるいは、ゲノムコンティグ(NRNAに対するBLASTにより同定)の受託番号を用いて、Entrez Genome Browser(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/MapViewHelp.html>)をクエリーし、NCBIデータから細胞遺伝学的位置を読んだ。また、細胞遺伝学的領域についての入手可能な文献の徹底的な検索は、Medline(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>)を用いて行う。マップされた部位とヒト癌において見いだされる染色体異常との関連についての参考文献は、Knuutila, et al., Am J Pathol, 1998, 152: 1107-1123に見いだすことができる。

【0380】

あるいは、核酸配列の受託番号を用いてUnigeneデータベースをクエリー検索する。Unigene検索エンジンを含むサイトは次のとおりである：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/H>

s.Home.html。Unigeneデータベース中のマップ位置の情報は、いくつかの起源から取り込むことができる；例えば、Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html>), The Genome Database (<http://gdb.infobiogen.fr/gdb/simpleSearch.html>), およびWhitehead Instituteヒト物理マップ (http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/sts_info?database=release)。

【0381】

これらの方法のいずれかによりいったん細胞遺伝学的領域が同定されれば、細胞遺伝学的位置でOMIMを検索することにより疾病との関連性を確立することができる。OMIMは、疾病により系統づけられた細胞遺伝学的マップ位置の検索可能なカタログを維持する。また、細胞遺伝学的領域についての入手可能な文献の徹底的な検索は、Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>) を用いて行う。上述したように、マップされた部位とヒト癌において見いだされる染色体異常との関連についての参考文献は、Knuutila, et al., Am J Pathol, 1998, 152: 1107-1123に見いだすことができる。

結果

マップされた遺伝子の染色体領域は表2に示される。染色体位置は、多くのヒト疾病、例えば癌の遺伝的情報を追跡するthe Online Mendelian Inheritance in Manデータベース(OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim>)を用いてクロスチェックした。マップされた部位とヒト癌に見いだされる染色体異常との関連についての参考文献は、Knuutila, et al., Am J Pathol, 1998, 152: 1107-1123に見いだすことができる。マップされた位置についての第3の情報源は、マップされた位

置とヒト疾病との関連性を記載する，公表された文献（NCBI，<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>）の検索であった。

【0382】

実施例8b：一塩基多型（SNPs）候補

材料および方法

ヒトDNAにおける最も一般的な変種は一塩基多型（SNPs）であり，これは，約100 - 300塩基に1回生ずる。SNPsは大規模の関連遺伝学研究を容易にすると予測されているため，最近，SNPの発見および検出に多大な興味をもたられている。本明細書に記載される遺伝子の候補SNPsは，核酸配列を公共のデータベースに登録されているSNPsを含む配列に対してblastn検索することにより同定した（dbSNP：配列ファイルは<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/SNP/human/ss-fasta>および<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/SNP/human/ss-fasta>からダウンロードし，これを用いてblastデータベースを構築した）。SNP含有配列についてdbSNP受託番号が与えられている。SNPsはまた，発現遺伝子（dbEST，NRNA）およびゲノム配列（すなわちNRNA）のいくつかのデータベースを一塩基対ミスマッチについて比較することにより同定した。結果は，表2の"SNPs"のカラムに示される。これらは候補SNPsである。ヒト集団におけるこれらの実際の頻度は決定していない。以下のコードはそれぞれのDNA配列を表す標準である：

【0383】

G = グアノシン

A = アデノシン

T = チミジン

C = シチジン

R = GまたはA，（プリン）

Y = CまたはT，（ピリミジン）

K = GまたはT，（ケト）

W = AまたはT, (弱) (2つの水素結合)

S = CまたはG, (強) (3つの水素結合)

M = AまたはC, (アミノ)

B = C, GまたはT (すなわち, A以外)

D = A, GまたはT (すなわち, C以外)

H = A, CまたはT (すなわち, G以外)

V = A, CまたはG (すなわち, T以外)

N = A, C, GまたはT, (任意)

X = A, C, GまたはT

相補的DNA鎖

G A T C R Y W S K M B V D H N X

+ + + + + + + + + + + + + + + + + + +

C T A G Y R S W M K V B H D N X

【0384】

例えば, 2つのバージョンの遺伝子が存在し, 一方は所定の位置に"C"を有し, 他方は同じ位置に"T"を有する場合, その位置はYと表され, これはCまたはTを意味する。表2においては, SGK002について, SNPカラムには"1165 = R"と記載されており, これは, 位置1165において多型が存在し, その位置はある場合にはGでありある場合にはAであることを意味する (RはAまたはGを表す)。SNPsは, 遺伝子に付随する遺伝性の特徴を同定するために重要であろう。

【0385】

結果

SGK341 (配列番号1および3)は, 染色体位置Xp22.1にマップされる。この領域(Xp)の遺伝子の増幅は結腸直腸癌のリスクの増加と関連づけられている(Knuutila, et al.)。この遺伝子はヌクレオチド4120, 4166, および4335に3つの一塩基多型を含む。多型の性質およびdbSNP受託番号は以下のとおりである: 4120 = Y (tg t c c c a c c a Y) s s 1 8 2 3 3 ; 4166 = K (c a c g a a t t c c K) , s s 1 5

09704 ; 4335 = Y (g g a a a t t c a c Y) s s 1509699 (多型の位置についての曖昧さを低下させるために多型の上流10ヌクレオチドが示されている)。すべてのSNPsは3'非コーディング領域中に存在する。この遺伝子のヌクレオチド配列は発現配列タグの公共データベース中に次のESTsとして表されている: AV710158, AA410835, およびBF132430。この遺伝子中には小反復領域は存在しない。

【0386】

SGK351 (配列番号2および4)は, 細胞遺伝学的領域17q23にマップされる。この染色体位置(17q22 - q25)の増幅は, 乳癌腫および膀胱癌の発症率の増加と関連づけられている(Knuutila, et al.)。この遺伝子はマップされた候補一塩基多型を含まない。この遺伝子を表すESTはdbESTには見いだされなかった。この遺伝子はヌクレオチド位置109 - 131に反復配列を有する。

【0387】

実施例9: サザンブロッティングによる遺伝子増幅の証明

材料および方法

ナイロン膜はBoehringer Mannheimから購入する。変性溶液は, 0.4M NaOHおよび0.6M NaClを含む。中和溶液は, 0.5M Tris-HCl, pH7.5および1.5M NaClを含む。ハイブリダイゼーション溶液は, 50%ホルムアミド, 6XSSPE, 2.5Xデンハルト溶液, 0.2mg/mL変性サケDNA, 0.1mg/mL酵母tRNA, および0.2%ドデシル硫酸ナトリウムを含む。制限酵素はBoehringer Mannheimから購入する。放射性標識プローブは, StratageneのPrime-it IIキットを用いて調製する。プローブテンプレートに用いるベータアクチンDNAフラグメントはClontechから購入する。

【0388】

種々の腫瘍細胞株(例えば, MCF-7, MDA-MB231, Calu-6, A549, HCT-15, HT-29, Colo205, LS-180, DLD-1, HCT-116, PC3, CAPAN-2, MIA-PaCa-2, P

ANC - 1 , A s P c - 1 , B x P C - 3 , O V C A R - 3 , S K O V 3 , S W 6 2 6 および P A - 1) , および2つの正常細胞株から , ゲノムDNAを単離する。

【0389】

各ゲノムDNA試料の10 μ gのアリコートでE c o R I制限酵素で消化し , 別の10 μ gの試料をH i n d I I I制限酵素で消化する。制限酵素消化したDNA試料を0.7%アガロースゲルに負荷し , 電気泳動分離した後 , 標準的方法によりDNAをナイロン膜にキャピラリー移動させる (S a m b r o o k , J . e t a l (1 9 8 9) M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y) 。

【0390】

実施例10：ファージディスプレイによる蛋白質-蛋白質相互作用の検出

材料および方法

ファージディスプレイは , 所望のおとりに対する親和性に基づいて分子相互作用を単離する方法を提供する。ファージ被覆蛋白質への融合としてクローニングされたcDNAフラグメントは , ファージの表面にディスプレイされる。おとりと相互作用するファージをアフィニティー精製により濃縮し , 個々のクローンからの挿入DNAを分析する。

【0391】

T7ファージディスプレイライブラリ

すべてのライブラリは , T 7 S e l e c t 1 - 1 bベクター (N o v a g e n) 中で , 製造元の指針にしたがって構築した。

【0392】

おとりの提示

おとりとして用いるべき蛋白質ドメインは , G S TへのC末端融合体として作成し , E . c o l iで発現させる。ペプチドは化学的に合成し , 長鎖スパーサービオチン試薬を用いてN末端でビオチン化する。

【0393】

選択

PanMixおよびE.coli阻害剤カクテル(Sigma P-8465)を補充した、新たに調製したライブラリ(10^{10} - 10^{12} pfu)のアリコートをし、固定化したおとりとともに室温で1 - 2時間インキュベートする。未結合ファージを洗浄緩衝液でよく洗浄する(少なくとも4回)。3 - 4ラウンドの選択の後、結合したファージを100 μ lの1% SDS中に溶出し、アガロースプレートに播種して、単一プラークを得る。

【0394】

挿入DNAの同定

個別のプラークを25 μ lの10 mM EDTA中に取り出し、70 °Cで10分間加熱することによりファージを破壊する。2 μ lの破壊ファージを50 μ lのPCR反応混合物に加える。35ラウンドの熱サイクル(94 °C, 50秒間; 50 °C, 1分間; 72 °C, 1分間)により挿入DNAを増幅する。

【0395】

緩衝液の組成

10 x PanMix

5% Triton X-100

10% 無脂乾燥乳 (Carnation)

10 mM EGTA

250 mM NaF

250 μ g / mL ヘパリン (Sigma)

250 μ g / mL, 切断し, 沸騰させたサケ精子DNA (Sigma)

0.05% アジ化ナトリウム

PBS中で調製する。

【0396】

洗浄緩衝液

PBS, 以下のもので補充:

0.5% NP-40

25 μ g / mL ヘパリン

PCR反応混合物

1.0 mL 10xPCR緩衝液(Perkin-Elmer, 15mMMgを含む)

各0.2 mLのdNTPs(10mM保存液)

0.1 mL T7UPプライマー(15 pmol/L) GGAGCTGTCTCGT
ATTCCAGTC

0.1 mL T7DNプライマー(15 pmol/L) AACCCCTCAAG
ACCCGTTTAG

0.2 mL 25mMMgCl₂またはMgSO₄, EDTA補償用
蒸留水で1.0 mLとする

反応液50 µlあたり1ユニットのTaqポリメラーゼを加える

ライブラリ: T7Select1-H441

【0397】

実施例11: FLK-1

ELISAアッセイを実施して、FLK-1レセプターのキナーゼ活性、より詳細にはFLK-1レセプター上のTK活性の阻害または活性化を測定した。詳細には、以下のアッセイを実施して、Flk-1を発現するように遺伝子工学処理された細胞において、FLK-1レセプターのキナーゼ活性を測定した。

【0398】

材料および方法

以下の試薬および供給物を用いた。

1. Corning 96ウエルELISAプレート(CorningカタログNo. 25805-96);
2. Cappel ヤギ抗ウサギIgG(カタログNo. 55641);
3. PBS(GibcoカタログNo. 450-1300EB);
4. TBSW緩衝液(50mM Tris(pH7.2), 150mM NaCl および0.1% Tween-20);
5. エタノールアミン保存液(10%エタノールアミン(pH7.0), 4で保存);

6. HNTG緩衝液(20mMHEPES緩衝液(pH7.5), 150mM NaCl, 0.2% Triton X-100, および10%グリセロール);
7. EDTA(0.5M(pH7.0)100X保存液として);
8. オルトバナジウム酸ナトリウム(0.5M, 100X保存液として);
9. ピロリン酸ナトリウム(0.2M, 100X保存液として);
10. NUNC96ウエルV底ポリプロピレンプレート(Applied ScientificカタログNo. AS-72092);
11. NIH3T3 C7#3細胞(FLK-1発現細胞);
12. DMEM, 1X高グルコースL-グルタミン含有(カタログNo. 11965-050);
13. FBS, Gibco(カタログNo. 16000-028);
14. L-グルタミン, Gibco(カタログNo. 25030-016);
15. VEGF, PeproTech, Inc. (カタログNo. 100-20) Milli-QdH₂O中1µg/100µl保存液として保持し, -20で保存;
16. アフィニティー精製抗FLK-1抗血清;
17. ホスホチロシン特異的UB40モノクローナル抗体(Fendley, et al., 1990, Cancer Research 50:1550-1558を参照);
18. EIA等級ヤギ抗マウスIgG-POD(BioRadカタログNo. 172-1011);
19. 2,2-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-硫酸(ABTS)溶液(100mMクエン酸(無水), 250mMNa₂HPO₄(pH4.0), 0.5mg/mlABTS(SigmaカタログNo. A-1888)), 溶液は, 使用まで暗所で4で保存しなければならない;
20. H₂O₂(30%溶液)(FisherカタログNo. H325);
21. ABTS/H₂O₂(15mlABTS溶液, 2µlH₂O₂)使用の5分間に調製, 室温に保持;
22. 0.2MHCl保存液, H₂O中;

23. ジメチルスルホキシド(100%) (SigmaカタログNo. D-8418); および

24. トリプシン-EDTA (Gibco BRLカタログNo. 25200-049)

【0399】

プロトコル

以下のプロトコルを用いてアッセイを実施した:

1. Corning 96 ウェル ELISA プレート を, ウェルあたり $1.0 \mu\text{g}$ の, $0.1 \text{M Na}_2\text{CO}_3$ (pH 9.6) 中 Cappel 抗ウサギ IgG 抗体, でコーティングする。最終容量をウェルあたり $150 \mu\text{l}$ とする。プレートを4で一夜コーティングする。プレートは, 4で保存したとき, 2週間まで保存することができる。

2. 細胞を適当な培養皿中で成長培地 (DMEM, 2.0mM L -グルタミン, $10\% \text{FBS}$ を補充) 中で, コンフルエントとなるまで 37°C , $5\% \text{CO}_2$ で成長させる。

3. トリプシン処理により細胞を回収し, Corning 25850 ポリスチレン 96 ウェル丸底細胞プレートに, $200 \mu\text{l}$ の成長培地中 $25,000$ 細胞/ウェルで播種する。

4. 細胞を 37°C , $5\% \text{CO}_2$ で少なくとも1日成長させる。

5. 細胞を D-PBS 1X で洗浄する。

6. $200 \mu\text{l}$ /ウェルの飢餓培地 (DMEM, 2.0mM L -グルタミン, $0.1\% \text{FBS}$) を加える。 37°C , $5\% \text{CO}_2$ で一夜インキュベートする。

7. 化合物をポリプロピレン 96 ウェルプレート中で飢餓培地を用いて 1:20 に希釈する。対照ウェルで使用するために, ジメチルスルホキシドを 1:20 に希釈する。

8. 96 ウェル細胞培養プレートから飢餓培地を除去し, $162 \mu\text{l}$ の新たに調製した飢餓培地を各ウェルに加える。

9. 1:20 に希釈された化合物希釈物 $18 \mu\text{l}$ (工程7より) を各ウェルに加え, 1:20 ジメチルスルホキシド希釈物を対照ウェルに加え (+/- VEG

F) , 細胞刺激の後 , 1 : 200 の最終希釈とする。最終ジメチルスルホキシドは 0 . 5 % である。プレートを 37 °C , 5 % CO₂ で 2 時間インキュベートする。

。

10 . プレートを逆さにして液体を除去することにより , 未結合抗体を E L I S A プレートから除去する。T B S W + 0 . 5 % エタノールアミン , p H 7 . 0 で 3 回洗浄する。プレートをペーパータオル上で軽くたたいて , 過剰の液体および気泡を除去する。

11 . ウエルあたり 150 μ l の T B S W + 0 . 5 % エタノールアミン , p H 7 . 0 でプレートをブロッキングする。プレートをマイクロタイタープレート振盪器で振盪しながら , 30 分間インキュベートする。

12 . プレートを工程 10 で記載したように 3 回洗浄する。

13 . 0 . 5 μ g / ウエルのアフィニティー精製抗 F L U - 1 ポリクローナルウサギ抗血清を加える。T B S W + 0 . 5 % エタノールアミン p H 7 . 0 で最終容量を 150 μ l / ウエルとする。プレートを振盪しながら 30 分間インキュベートする。

14 . 細胞に 180 μ l の飢餓培地を加え , 20 μ l / ウエルの 10 . 0 m M オルトバナジウム酸ナトリウムおよび 500 n g / m l V E G F (最終濃度 ; ウエルあたり 1 . 0 m M オルトバナジウム酸ナトリウムおよび 50 n g / m l V E G F) で 37 °C , 5 % CO₂ で 8 分間細胞を刺激する。陰性対照ウエルには飢餓培地のみを加える。

15 . 8 分後 , 培地を細胞から除去し , 200 μ l / ウエルの P B S で 1 回洗浄しなければならない。

16 . 150 μ l / ウエルの H N T G 中で室温で 5 分間振盪しながら細胞を溶解させる。H N T G 配合物はオルトバナジウム酸ナトリウム , ピロリン酸ナトリウムおよび E D T A を含む。

17 . E L I S A プレートを工程 10 に記載したように 3 回洗浄する。

18 . 細胞溶解物を細胞プレートから E L I S A プレートに移し , 振盪しながら 2 時間インキュベートする。細胞溶解物を移すには , ウエルを掻きながらピペットアップおよびダウンを行う。

19. プレートを工程10に記載したように3回洗浄する。
20. ELISAプレートを0.02 µg / ウエルのTBSW + 0.5%エタノールアミン中のUB40とともにインキュベートする。最終容量を150 µl / ウエルとする。振盪しながら30分間インキュベートする。
21. プレートを工程10に記載したように3回洗浄する。
22. ELISAプレートを, TBSW + 0.5%エタノールアミン, pH 7.0中で1:10,000に希釈したEIA等級ヤギ抗マウスIgGコンジュゲート西洋ワサビペルオキシダーゼとともにインキュベートする。最終容量を150 µl / ウエルとする。振盪しながら30分間インキュベートする。
23. 工程10で記載したようにプレートを洗浄する。
24. 100 µlのABTS / H₂O₂溶液をウエルに加える。振盪しながら10分間インキュベートする。
25. 100 µlの0.2 M HClを0.1 M HCl最終濃度となるように加えて, 発色反応を停止する。室温で1分間振盪する。ゆっくりした空気の流れて気泡を除去し, ELISAプレートをELISAプレートリーダーで410 nmで読む。

【0400】

実施例12: HER-2 ELISA

アッセイ1: 全細胞におけるEGFレセプター - HER2キメラレセプターアッセイ

EGFR - NIH3T3全細胞中のHER2キナーゼ活性を以下に記載するようにして測定した。

【0401】

材料および試薬

以下の材料および試薬を用いてアッセイを実施した:

1. EGF: 保存液濃度: 16.5 ILM; EGF201, TOYOBO, Co., Ltd. Japan
2. 05-101 (UBI) (EGFR細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体)

3. 抗ホスホチロシン抗体 (抗Ptyr) (ポリクローナル) (Fendley, et al., (上掲)を参照)

4. 検出抗体: ヤギ抗ウサギIgG西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート, TAGO, Inc., Burlingame, CA

5. TBST緩衝液:

| | |
|-----------------|-------|
| Tris-HCl, pH7.2 | 50mM |
| NaCl | 150mM |
| TritonX-100 | 0.1 |

6. HNTG 5X保存液:

| | |
|-------------|-------|
| HEPES | 0.1M |
| NaCl | 0.75M |
| グリセロール | 50% |
| TritonX-100 | 1.0% |

7. ABTS保存液:

| | |
|----------------------------------|----------|
| クエン酸 | 100mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 250mM |
| HCl (濃) | 0.5mM |
| ABTS* | 0.5mg/ml |

* (2, 2'-アジノビス(3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸))

溶液は使用するまで暗所で4℃で保存する。

8. 試薬保存液:

| | | |
|--|-------|-------|
| EDTA | 100mM | pH7.0 |
| Na ₃ VO ₄ | 0.5M | |
| Na ₄ (P ₂ O ₇) | 0.2M | |

【0402】

プロトコル

以下のプロトコルを用いた:

A. ELISAプレートのプレコート

1. ELISAプレート (Corning, 96ウエル, Cat.#2580

5 - 96) をウエルあたりPBS中0.5 μ gの05 - 101抗体で100 μ lの最終容量/ウエルでコーティングし, 4 で一夜保存する。コーティングしたプレートは4 で保存した場合, 10日間まで良好である。

2. 使用の日, コーティング緩衝液を除去し, 100 μ lのプロッキング緩衝液(PBS中5% Carnationインスタント脱脂乾燥ミルク)で置き換える。プレートを室温で(約23 から25) 振盪しながら30分間インキュベートする。使用の直前に, プロッキング緩衝液を除去し, プレートをTBST緩衝液で4回洗浄する。

【0403】

B. 細胞播種

1. このアッセイには, EGF R細胞外ドメインおよび細胞内HER2キナーゼドメインを含有するキメラレセプターを過剰発現するNIH3T3細胞株を用いることができる。

2. 80 - 90%コンフルエントの培養皿を実験用を選択する。細胞をトリプシン処理し, 10%ウシ胎児血清を加えることにより反応を停止させる。細胞をDMEM培地(10%CS DMEM培地)中に懸濁し, 1500 rpmで室温で5分間1回遠心分離する。

3. 細胞を播種培地(DMEM, 0.5%ウシ血清)に再懸濁し, トリパンブルーを用いて細胞を計数する。90%より高い生存性が許容される。細胞をDMEM培地(0.5%ウシ血清)中で, ウエルあたり10,000細胞の密度で, ウエルあたり100 μ lで, 96ウエルマイクロタイタープレートに播種する。播種した細胞を5%CO₂中で37 で約40時間インキュベートする。

【0404】

C. アッセイ方法

1. 播種した細胞を, 倒立顕微鏡を用いてコンタミネーションについて検査する。薬剤保存液(DMSO中10mg/ml)をDMEM培地で1:10に希釈し, 次に5 μ lを, 最終薬剤希釈1:200および最終DMSO濃度1%となるように, TBSTウエルに移す。対照ウエルにはDMSOのみを加える。5%CO₂中で37 で2時間インキュベートする。

2. EGFリガンドの調製：保存液EGFを、10 μ l希釈EGF(1:12希釈)を移したときに100nMの最終濃度が得られるように、DMEM中で希釈する。

3. ウエルあたり100 μ lに十分なように新たにHNTG^{*}を調製し、氷上に置く。

HNTG^{*}(10ml)：

| | |
|--|-------|
| HNTG保存液 | 2.0ml |
| milli-QH ₂ O | 7.3ml |
| EDTA, 100mM, pH7.0 | 0.5ml |
| Na ₃ VO ₄ , 0.5M | 0.1ml |
| Na ₄ (P ₂ O ₇), 0.2M | 0.1ml |

4. 薬剤とともに120分間インキュベーションした後、調製したSGFリガンドを、ウエルあたり10 μ l、最終濃度100nMとなるように細胞に加える。対照ウエルにはDMEMのみを加える。室温で5分間振盪しながらインキュベートする。

5. 薬剤、EGF、およびDMEMを除去する。細胞をPBSで2回洗浄する。ウエルあたり100 μ lのHNTG^{*}を細胞に移す。氷上に5分間放置する。この間に、ブロッキング緩衝液を他のELISAプレートから除去し、上述したようにTBSTで洗浄する。

6. マイクロピペッターにぴったりと固定したピペットチップを用いて、細胞をプレートからはがし、HNTG^{*}溶解緩衝液を繰り返し吸引および分配することにより、細胞物質をホモジナイズする。コーティングし、ブロッキングし、洗浄したELISAプレートに溶解物を移す。振盪しながら室温で1時間インキュベートする。

7. 溶解物を除去し、TBSTで4回洗浄する。新たに希釈した抗Ptyr抗体をウエルあたり100 μ lでELISAプレートに移す。抗Ptyr抗血清(TBST中1:3000希釈)の存在下で、振盪しながら室温で30分間インキュベートする。

8. 抗Ptyr抗体を除去し、TBSTで4回洗浄する。新たに希釈したTA

GO抗ウサギIgG抗体をELISAプレートにウエルあたり100 μ lで移す。振盪しながら室温で30分間インキュベートする(抗ウサギIgG抗体:TBST中1:3000希釈)。

9. TAGO検出抗体を除去し, TBSTで4回洗浄する。新たに調製したABTS/H₂O₂溶液をウエルあたり100 μ lでELISAプレートに移す。振盪しながら室温で20分間インキュベートする(ABTS/H₂O₂溶液:10ml ABTS保存液中1.0 μ lの30% H₂O₂)。

10. 50 μ lの5N H₂SO₄を加えることにより反応を停止し(任意), 410nmでO.D.を測定する。

11. 最大ホスホチロシンシグナルは, 陰性対照の値を陽性対照の値から差し引くことにより決定する。次に, 抽出物含有ウエルについて, 陰性対照を差し引いた後にホスホチロシン含有量のパーセント阻害を計算する。

【0405】

実施例13: PDGF-R ELISA

すべての細胞培養培地, グルタミンおよびウシ胎児血清は, 特に記載しないかぎり, Gibco Life Technologies (Grand Island, NY) から購入した。すべての細胞は, 90-95%空気および5-10%CO₂の湿潤雰囲気下で37 $^{\circ}$ Cで成長させた。すべての細胞株は, 日常的に1週間に2回サブカルチャーし, Mycotect法(Gibco)によりマイコプラズマがないことを確認した。

ELISAアッセイのためには, 細胞(U1242, Joseph Schlessinger, NYUから入手)を成長培地(MEM, 10%FBS, NEAA, 1mM NaPyrおよび2mMGLN含有)で80-90%コンフルエントまで成長させ, 96ウエル組織培養プレートに0.5%血清中で, ウエルあたり25,000-30,000細胞を播種した。0.5%血清含有培地で一夜インキュベーションした後, 細胞を無血清培地に移し, 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ Cインキュベーター中で試験化合物で2時間処理した。次に細胞をリガンドで5-10分間刺激し, HNTG(20mMHepes, 150mMNaCl, 10%グリセロール, 5mMEDTA, 5mMNa₃VO₄, 0.2%TritonX-10

0, および2 mM Na Pyr) で溶解した。細胞溶解物 (PBS 中 0.5 mg / ウエル) をレセプター特異的抗体であらかじめ被覆し, TBST (50 mM Tris - HCl pH 7.2, 150 mM NaCl および 0.1% Triton X-100) 中 5% ミルクで室温で 30 分間ブロッキングした ELISA プレートに移した。溶解物を振盪しながら室温で 1 時間インキュベートした。プレートを TBST で 4 回洗浄し, 次にポリクローナル抗ホスホチロシン抗体とともに室温で 30 分間インキュベートした。プレートを TBST で 4 回すすぐことにより過剰の抗ホスホチロシン抗体を除去した。ELISA プレートにヤギ抗ウサギ IgG 抗体を室温で 30 分間加え, 次に TBST でさらに 4 回すすいだ。ABTS (100 mM クエン酸, 250 mM Na₂HPO₄ および 0.5 mg / mL 2, 2'-アジノ - ビス (3 - エチルベンズチアゾリン - 6 - 硫酸)), および H₂O₂ (1.2 mL 30% H₂O₂ を 10 mL ABTS に加える) を ELISA プレートに加えて発色を開始させた。ABTS 添加の約 15 から 30 分後, 410 nm および 630 nm の参照波長における吸光度を記録した。

【0406】

実施例 14 : IGF - I レセプター ELISA

以下のプロトコルを用いて, IGF - I レセプター上のホスホチロシンレベルを測定することができ, これは IGF - I レセプターチロシンキナーゼ活性を示す。

【0407】

材料および試薬

以下の材料および試薬を用いた :

1. このアッセイにおいて用いる細胞株は, IGF - 1 レセプターを過剰発現するように遺伝子工学処理された細胞株 3T3 / IGF - 1R である。
2. NIH3T3 / IGF - 1R を, 5% CO₂, 37 °C のインキュベーターで成長させる。成長培地は DMEM + 10% FBS (熱不活性化) + 2 mM L - グルタミンである。
3. アフィニティー精製抗 IGF - 1R 抗体 17 - 69
4. D - PBS :

| | |
|--------------------------|--------------------|
| KH_2PO_4 | 0.20 g / l |
| K_2HPO_4 | 2.16 g / l |
| KCl | 0.20 g / l |
| NaCl | 8.00 g / l (pH7.2) |

5. ブロッキング緩衝液: TBSTプラス5%ミルク(Carnationインスタント脱脂乾燥ミルク)

6. TBST緩衝液:

| | |
|-------------|--------------------------|
| Tris-HCl | 50 mM |
| NaCl | 150 mM (pH7.2 / HCl 10N) |
| TritonX-100 | 0.1% |

TBS(10X)の保存溶液を調製し、希釈の間に緩衝液にTritonX-100を加える。

7. HNTG緩衝液:

| | |
|-------------|-------------------------|
| HEPES | 20 mM |
| NaCl | 150 mM (pH7.2 / HCl 1N) |
| グリセロール | 10% |
| TritonX-100 | 0.2% |

保存溶液(5X)を調製し、4 で保存する。

8. EDTA/HCl: 0.5 M pH7.0 (NaOH), 100X保存液として

9. Na_3VO_4 : 100X保存液として0.5 M, アリコートは-80 で保存する。

10. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: 100X保存液として0.2 M

11. インスリン様成長因子-1, Promega (Cat#G5111)

12. ウサギポリクローナル抗ホスホチロシン抗血清

13. ヤギ抗ウサギIgG, PODコンジュゲート(検出抗体), Tago (Cat.No.4520, LotNo.1802): Tago, Inc., Burlingame, CA

14. ABTS(2,2'-アジノビス(3-エチルベンズチアゾリン硫酸))

) 溶液：

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| クエン酸 | 100mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 250mM (pH4.0 / 1NHCl) |
| ABTS | 0.5mg/ml |

ABTS溶液は暗所で4℃で保存しなければならない。溶液は緑色に変色したときは廃棄しなければならない。

15. 過酸化水素：30%溶液を暗所で4℃で保存する。

【0408】

プロトコル

以下のすべての工程は、特に記載しないかぎり、室温で実施する。すべてのELISAプレート洗浄は、プレートを水道水で3回すすぎ、TBSTで1回すすぐことにより実施する。プレートを軽くたたいてペーパータオルで乾燥させる。

A. 細胞播種：

1. 組織培養皿 (Corning 25020-100) で80-90%コンフルエントまで成長させた細胞を、トリプシン-EDTA (0.25%, 0.5ml/D-100, GIBCO) で回収する。
2. 細胞を新鮮なDMEM+10%FBS+2mM L-グルタミン中に再懸濁し、96ウエル組織培養プレート (Corning, 25806-96) に20,000細胞/ウエル (100μl/ウエル) で移す。1日インキュベートし、次に培地を無血清培地 (90μl) で置き換え、5%CO₂, 37℃で一夜インキュベートする。

【0409】

B. ELISAプレートコーティングおよびブロッキング：

1. ELISAプレート (Corning 25805-96) を、100μl PBS中の抗IGF-1R抗体で0.5μg/ウエルで少なくとも2時間コーティングする。
2. コーティング溶液を除去し、100μlのブロッキング緩衝液で置き換え、30分間振盪する。ブロッキング緩衝液を除去し、溶解物を加える直前にプレートを洗浄する。

【0410】

C. アッセイ方法：

1. 薬剤は、無血清条件で試験する。

2. 薬剤保存液（100% DMSO中）を96ウエルポリプロピレンプレート中でDMEMで1：10に希釈し、10 μ l / ウエルのこの溶液を細胞に移して、最終薬剤希釈1：100、最終DMSO濃度1.0%とする。細胞を5% CO₂中で37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートする。

3. 新鮮な細胞溶解緩衝液（HNTG*）を調製する。

| | |
|--|--------|
| HNTG | 2 ml |
| EDTA | 0.1 ml |
| Na ₃ VO ₄ | 0.1 ml |
| Na ₄ (P ₂ O ₇) | 0.1 ml |
| H ₂ O | 7.3 ml |

4. 薬剤を2時間インキュベートした後、10 μ l / ウエルのPBS中200 nM IGF-1リガンドを細胞に移し（最終濃度20 nM）、5% CO₂で37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートする。

5. 培地を除去し、100 μ l / ウエルのHNTG*を加え、10分間振盪する。細胞を顕微鏡下で観察して、これらが適切に溶解したか否かを見る。

6. 12チャンネルピペットを用いて細胞をプレートから掻き取り、吸引と分配を繰り返すことにより溶解物をホモジナイズする。すべての溶解物を抗体コーティングELISAプレートに移し、1時間振盪する。

7. 溶解物を除去し、プレートを洗浄し、抗pTyr（TBST中1：3,000）を100 μ l / ウエルで移し、30分間振盪する。

8. 抗pTyrを除去し、プレートを洗浄し、TAGO（TBST中1：3,000）を100 μ l / ウエルで移し、30分間振盪する。

9. 検出抗体を除去し、プレートを洗浄し、新鮮なABTS / H₂O₂（1.2 μ l H₂O₂を10 ml ABTSに加える）を100 μ l / ウエルでプレートに移して、発色を開始させる。

10. Dynatec MR5000で参照波長630 nmで410 nmのOD

を測定する。

【0411】

実施例15：EGFレセプターELISA

ヒトEGF-Rを発現するよう遺伝子工学処理された細胞中のEGFレセプターキナーゼ活性を以下に記載するように測定した。

材料および試薬

以下の材料および試薬を用いた：

1. EGFリガンド：保存液濃度 = 16.5 μ M ; EGF201, TOYOB
O, Co., Ltd. Japan
2. 05-101 (UBI) (EGFR細胞外ドメインを認識するモノクロー
ナル抗体)
3. 抗ホスホチロシン抗体 (抗Ptyr) (ポリクローナル)
4. 検出抗体：ヤギ抗ウサギIgG西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲー
ト, TAGO, Inc., Burlingame, CA
5. TBST緩衝液：

| | |
|---------------|-------|
| Tris-HCl, pH7 | 50mM |
| NaCl | 150mM |
| TritonX-100 | 0.1 |
6. HNTG 5X保存液：

| | |
|-------------|-------|
| HEPES | 0.1M |
| NaCl | 0.75M |
| グリセロール | 50 |
| TritonX-100 | 1.0% |
7. ABTS保存液：

| | |
|-------------------|----------|
| クエン酸 | 100mM |
| NaVO ₄ | 250mM |
| HCl (濃) | 4.0pH |
| ABTS* | 0.5mg/ml |

溶液は使用するまで暗所で4で保存する。

8. 試薬保存液:

EDTA 100mM pH7.0

 Na_3VO_4 0.5M $\text{Na}_4(\text{P}_2\text{O}_7)$ 0.2M

【0412】

プロトコル

以下のプロトコルを用いた:

A. ELISAプレートのプレコート

1. ELISAプレート(Corning, 96ウエル, Cat.#25805-96)をウエルあたりPBS中0.5 μg , 150 μl 最終容量/ウエルの0.5-1.0 μl 抗体でコーティングし, 4 $^{\circ}\text{C}$ で一夜保存する。コーティングしたプレートは4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した場合10日間まで良好に使用しうる。

2. 使用の日, コーティング緩衝液を除去し, ブロッキング緩衝液(PBS中5% Carnationインスタント脱脂乾燥ミルク)で置き換える。プレートを振盪しながら室温(約23 - 25 $^{\circ}\text{C}$)で30分間インキュベートする。使用の直前に, ブロッキング緩衝液を除去し, プレートをTBST緩衝液で4回洗浄する。

【0413】

B. 細胞播種

1. このアッセイにはNIH3T3/C7細胞株(Honegger, et al., Cell 51:199-209, 1987)を用いることができる。

2. 80-90%コンフルエントの皿を実験用を選択する。細胞をトリプシン処理し, 10%CS DMEM培地を加えることにより反応を停止させる。細胞をDMEM培地(10%CS DMEM培地)中に懸濁し, 1000rpmで室温で5分間, 1回遠心分離する。

3. 細胞を播種培地(DMEM, 0.5%ウシ血清)に再懸濁し, トリパンブルーを用いて細胞を計数する。90%を越える生存率が許容範囲である。細胞を96ウエルマイクロタイタープレート上で, DMEM培地(0.5%ウシ血清)中に, ウエルあたり10,000細胞の密度でウエルあたり100 μl で播種す

る。播種した細胞を5%CO₂, 37℃で約40時間インキュベートする。

【0414】

C. アッセイ方法

1. 倒立顕微鏡を用いて、播種した細胞のコンタミネーションを調べる。試験化合物保存液(DMSO中10mg/ml)をDMEM培地中で1:10に希釈し、次に5μlを試験ウエルに移して、1:200の最終薬剤希釈および1%の最終DMSO濃度とする。対照ウエルにはDMSOのみを加える。5%CO₂, 37℃で1時間インキュベートする。
2. EGFリガンドの調製: 保存液EGFを、10μlの希釈EGF(1:12希釈)を移したときに25nMの最終濃度が得られるように、DMEM中で希釈する。
3. ウエルあたり100μlに十分なように新鮮なHNTG* 10mlを調製する。HNTG*は以下のものを含む: HNTG保存液(2.0ml), milli-QH₂O(7.3ml), EDTA, 100mM, pH7.0(0.5ml), Na₃VO₄ 0.5M(0.1ml)およびNa₄(P₂O₇), 0.2M(0.1ml)
4. 氷上に置く。
5. 薬剤とともに2時間インキュベーションした後、調製したEGFリガンドを、ウエルあたり10μlで、25nMの最終濃度となるように細胞に加える。対照ウエルにはDMEMのみを加える。振盪しながら室温で5分間インキュベートする。
6. 試験化合物, EGFおよびDMEMを除去する。細胞をPBSで2回洗浄する。HNTG*をウエルあたり100μlで細胞に移す。氷上に5分間置く。その間に、他のELISAプレートからブロッキング緩衝液を除去し、上述したようにTBSTで洗浄する。
7. マイクロピペッターにぴったりと固定したピペットチップを用いて、細胞をプレートからはがし、HNTG*溶解緩衝液を繰り返し吸引および分配することにより、細胞物質をホモジナイズする。コーティングし、ブロッキングし、洗浄したELISAプレートに溶解物を移す。振盪しながら室温で1時間インキュ

ベートする。

8. 溶解物を除去し、TBS Tで4回洗浄する。新たに希釈した抗P t y r抗体をウエルあたり100 μ lでELISAプレートに移す。抗P t y r抗血清(TBS T中1:3000希釈)の存在下で、振盪しながら室温で30分間インキュベートする。

9. 抗P t y r抗体を除去し、TBS Tで4回洗浄する。新たに希釈したTAGO30抗ウサギI g G抗体をELISAプレートにウエルあたり100 μ lで移す。振盪しながら室温で30分間インキュベートする(抗ウサギI g G抗体:TBS T中1:3000希釈)。

10. 検出抗体を除去し、TBS Tで4回洗浄する。新たに調製したABTS/H₂O₂溶液をウエルあたり100 μ lでELISAプレートに移す。室温で20分間インキュベートする(ABTS/H₂O₂溶液:10 ml ABTS保存液中1.2 μ lの30% H₂O₂)。

11. 50 μ lの5 NH₂SO₄を加えることにより反応を停止し(任意), 410 nmでO.D.を測定する。

12. 最大ホスホチロシンシグナルは、陰性対照の値を陽性対照の値から差し引くことにより決定する。次に、陰性対照を差し引いた後、抽出物含有ウエルについてのホスホチロシン含有量のパーセント阻害を計算する。

【0415】

実施例16: Met自己リン酸化アッセイ - ELISA

このアッセイは、Metレセプター上のMet蛋白質チロシンキナーゼレベルを分析することにより、Metチロシンキナーゼ活性を決定する

材料および試薬

以下の材料および試薬を用いた:

1. HNTG(5X保存溶液): 23.83 g HEPESおよび43.83 g NaClを約350 ml dH₂Oに溶解する。HClまたはNaOHでpHを7.2に調節し、500 mlグリセロールおよび10 ml Triton X-100を加え、混合し、dH₂Oを加えて総容量を1 Lとする。1X作業溶液1 Lを作成するためには、200 mlの5X保存溶液を800 ml dH₂Oに加え、必要

に応じてpHを調べて調節し、4 で保存する。

2. PBS (ダルベッコリン酸緩衝化食塩水), Gibco Cat. # 450-1300EB (1X溶液)

3. ブロッキング緩衝液: 500ml dH₂O中に, 100g BSA, 12.1g Tris - pH7.5, 58.44g NaClおよび10ml Tween-20を加え, 希釈して総容量1Lとする。

4. キナーゼ緩衝液: 500ml dH₂Oに, 12.1g TRIS (pH7.2), 58.4g NaCl, 40.7g MgCl₂および1.9g EGTAを加え, dH₂Oで総容量1Lとする。

5. PMSF (フッ化フェニルメチルスルホニル), Sigma Cat. # P-7626, 435.5mgに100%エタノールを総容量25mlとなるように加え, ボルテックスする。

6. ATP (細菌起源), Sigma Cat. # A-7699, 粉末を-20 で保存する; 作業溶液を作成するためには, 3.31mgを1ml dH₂O中に溶解する。

7. RC-20H HRPOコンジュゲート化抗ホスホチロシン, Transduction Laboratories Cat. # E120H

8. Pierce 1-Step (商標) Turbo-TMB-ELISA (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン), Pierce Cat. # 34022

9. H₂SO₄, 濃硫酸1ml (18N)を35ml dH₂Oに加える。

10. TRIS HCL, Fischer Cat. # BP152-5; 材料121.14gに600mlのMilliQ H₂Oを加え, HClでpHを7.5 (または7.2)に調節し, MilliQ H₂Oで容量を1Lとする。

11. NaCl, Fischer Cat. # S271-10, 5M溶液を作成する。

12. Tween-20, Fischer Cat. # S337-500

13. Na₃VO₄, Fischer Cat. # S454-50, 材料1.8gに80mlのMilliQ H₂Oを加え, HClまたはNaOHでpHを1

0.0に調節し、電子レンジで沸騰させ、冷却し、pHを調べ、pHが10.0で安定となるまでこの工程を繰り返し、MilliQ H₂Oを加えて総容量100mlとし、1mlアリコートを作成し、-80 で保存する。

14. MgCl₂, Fischer Cat. #M33-500, 1M溶液を作成する。

15. HEPES, Fischer Cat. #BP310-500, 200ml MilliQ H₂Oに、材料59.6gを加え、pHを7.5に調節し、総容量250mlとし、濾過滅菌する。

16. アルブミン, ウシ (BSA), Sigma Cat. #A-4503, 材料30gに滅菌蒸留水を加えて総容量300mlとし、4 で保存する。

17. TBST緩衝液: 1Lの目盛り付きシリンダー中の約900mlのdH₂Oに6.057g TRISおよび8.766g NaClを加え、溶解したとき、HClでpHを7.2に調節し、1.0ml Triton X-100を加え、dH₂Oで総容量1Lとする。

18. ヤギアフィニティー精製抗体ウサギIgG (全分子), Cappel Cat. #55641

19. 抗h-Met (C-28)ウサギポリクローナルIgG抗体, Santa Cruz Chemical Cat. #SC-161

20. 過渡的にトランスフェクションされたEGFR/Metキメラ細胞 (EMR) (Komada, et al., Oncogene, 8:2381-2390 (1993))

21. 炭酸ナトリウム緩衝液, (Na₂CO₃, Fischer Cat. #S495): 材料10.6gに800mlのMilliQ H₂Oを加え、溶解したとき、NaOHでpHを9.6に調節し、MilliQ H₂Oで総容量1Lとし、濾過し、4 で保存する。

【0416】

方法

以下の工程は、特に記載のない限り、全て室温で実施する。ELISAプレート洗浄は全てTBSTで4回すすぐことにより行う。

A. EMR溶解

この方法は、レセプター捕捉の開始の前夜または直前に実施することができる。

1. 溶解物を37℃の水浴中で渦巻き動作により最後の結晶が消失するまで急速に溶解する。
2. 細胞ペレットを1mMPMSFを含有する1X HNTG中で溶解する。15cm皿の細胞あたり3mlのHNTGを用いる。計算したHNTG容量の1/2を加え、管を1分間ボルテックスし、残量のHNTGを加え、さらに1分間ボルテックスする。
3. 管の釣り合いをとり、10,000×g, 10分間, 4℃で遠心分離する。
4. 上清をプールし、アリコート除去して蛋白質測定を行う。
5. プールしたサンプルをドライアイス/エタノール浴中で急速凍結する。この工程は、溶解物を一夜保存するか蛋白質測定後に直ちに使用するかにかかわらず実施する。
6. 標準的ビシンコニン酸(BCA)法を用いて蛋白質測定を実施する(BCAアッセイ試薬キット, Pierce Chemical Cat.#23225)。

【0417】

B. ELISA法

1. Corning 96ウエルELISAプレートを、総ウエル容量50μl, ウエルあたり5μgの炭酸塩緩衝液中のヤギ抗ウサギ抗体でコーティングする。4℃で一夜保存する。
2. プレートを逆さにして液体を除去することにより、未結合ヤギ抗ウサギ抗体を除去する。
3. 150μlのブロッキング緩衝液を各ウエルに加える。振盪しながら30分間インキュベートする。
4. TBSTで4回洗浄する。プレートをペーパータオル上で軽くたたいて過剰の液体および気泡を除去する。

5. ウエル総容量100 μ lに対して, TBS T中で希釈したウサギ抗Met抗体をウエルあたり1 μ g加える。
6. 溶解物をHNTGで希釈する(90 μ g溶解物/100 μ l)。
7. 希釈した溶解物100 μ lを各ウエルに加える。60分間振盪する。
8. TBS Tで4回洗浄する。ペーパータオル上で軽くたたいて過剰の液体および気泡を除去する。
9. ウエルあたり50 μ lの1X溶解物緩衝液を加える。
10. 化合物/抽出物をポリプロピレン96ウエルプレート中で1Xキナーゼ緩衝液中で1:10に希釈する。
11. 希釈した化合物5.5 μ lをELISAプレートウエルに移す。振盪しながら室温で20分間インキュベートする。
12. ウエルあたり5.5 μ lの60 μ M ATP溶液を加える。陰性対照にはATPを加えない。振盪しながら90分間インキュベートする。
13. TBS Tで4回洗浄する。プレートをペーパータオル上で軽くたたいて過剰の液体および気泡を除去する。
14. ウエルあたり100 μ lのRC20(ブロッキング緩衝液中1:3000希釈)を加える。振盪しながら30分間インキュベートする。
15. TBS Tで4回洗浄する。プレートをペーパータオル上で軽くたたいて過剰の液体および気泡を除去する。
16. ウエルあたり100 μ lのTurbo-TMBを加える。振盪しながら30-60分間インキュベートする。
17. ウエルあたり100 μ lの1M H_2SO_4 を加えて反応を停止させる。
18. Dynatech MR7000 ELISAリーダーでアッセイを読む。試験フィルター=450 nm, 参照フィルター=410 nm。

【0418】

実施例17: 生化学的srcアッセイ - ELISA

このアッセイを用いて, ビオチニル化ペプチドのリン酸化を讀出しとして測定することにより, src蛋白質キナーゼ活性を決定する。

材料および試薬:

以下の材料および試薬を用いた：

1. srcでトランスフォームした酵母
2. 細胞溶解物：srcを発現する酵母細胞をペレット化し，水で1回洗浄し，再びペレット化して，使用するまで-80 で保存する。
3. N末端ピオチニル化EEEEYEEYEEEEYEEEEYEEEEYは，当業者に周知の標準的な方法により調製する。
4. DMSO：Sigma，St. Louis，MO
5. 96ウエルELISAプレート：Corning 96ウエルEasy Wash，改変平底プレート，Corning Cat. #25805-96
6. NUNC 96ウエルV-底ポリプロピレンプレート，化合物の希釈用：Applied Scientific Cat. #A-72092
7. Vecastain ELITE ABC試薬：Vector，Burlingame，CA
8. 抗src(327)mab：Schizosaccharomyces Pombeを用いて組換えSrcを発現させる(Supertifurga，et al.，EMBO J.，12：2625-2634；Supertifurga，et al.，Nature Biochem.，14：600-605)。S. Pombe SP200株(h-s leul.32 ura4 ade210)を記載されたように増殖させ，酢酸リチウム法(Supertifurga，(上掲))によりpRSP発現プラスミドでトランスフォームする。細胞は1 μMチアミンの存在下で増殖させてnmt1プロモーターの発現を抑制するか，またはチアミンの非存在下で増殖させて発現を誘導する。
9. モノクローナル抗ホスホチロシン，UBI05-321(代わりにUB40を用いることができる)
10. Turbo TMB-ELISAペルオキシダーゼ基質：Pierce Chemical

【0419】

緩衝溶液：

1. PBS(ダルベッコリン酸緩衝化食塩水)：GIBCO PBS，GIB

CO Cat. # 450-1300EB

2. ブロッキング緩衝液: 5%無脂乳(Carnation), PBS中
3. 炭酸塩緩衝液: Na_2CO_4 , Fischer, Cat. # S495, 100mM保存溶液を作成する。
4. キナーゼ緩衝液: 1.0ml(1M保存溶液から) MgCl_2 ; 0.2ml(1M保存溶液から) MnCl_2 ; 0.2ml(1M保存溶液から) DTT; 5.0ml(1M保存溶液から) HEPES; 0.1ml TX-100; MilliQ H_2O で総容量10mlとする。
5. 溶解緩衝液: 5.0 HEPES(1M保存溶液から); 2.74ml NaCl(5M保存溶液から); 10mlグリセロール; 1.0ml TX-100; 0.4ml EDTA(100mM保存溶液から); 1.0ml PMSF(100mM保存溶液から); 0.1ml Na_3VO_4 (0.1M保存溶液から); MilliQ H_2O で総容量100mlとする。
6. ATP: Sigma Cat. # A-7699, 10mM保存溶液(5.51mg/ml)を作成する。
7. TRIS-HCl: Fischer Cat. # BP152-5, 600mlのMilliQ H_2O に121.14gの物質を加え, HClでpHを7.5に調節し, MilliQ H_2O で総容量1Lとする。
8. NaCl: Fischer Cat. # S271-10, MilliQ H_2O で5M保存溶液を作成する。
9. Na_3VO_4 : Fischer Cat. # S454-50; 80mlのMilliQ H_2O に, 1.8gの物質を加える; HClまたはNaOHでpHを10.0に調節する; 電子レンジ中で沸騰させる; 冷却する; pHを調べ, 加熱/冷却サイクルの後にpHが安定に維持されるまでpH調節を繰り返す; MilliQ H_2O で総容量100mlとする; 1mlのアリコートを作成し, -80 で保存する。
10. MgCl_2 : Fischer Cat. # M33-500, MilliQ H_2O で1M保存溶液を作成する。
11. HEPES: Fischer Cat. # BP310-500; 200

1 ml MilliQ H₂Oに、59.6 gの物質を加え、pHを7.5に調節し、MilliQ H₂Oで総容量250 mlとし、濾過滅菌する(1 M保存溶液)。

12. TBST緩衝液: TBST緩衝液: 900 mlのdH₂Oに、6.057 g TRISおよび8.766 g NaClを加える; HClでpHを7.2に調節し、1.0 ml Triton-X₁₀₀を加える; dH₂Oで総容量1 Lとする。

13. MnCl₂: Fischer Cat. #M87-100, MilliQ H₂Oで1 M保存溶液とする。

14. DTT: Fischer Cat. #BP172-5

15. TBS (TRIS緩衝化食塩水): 900 mlのMilliQ H₂Oに、6.057 g TRISおよび8.777 g NaClを加える; MilliQ H₂Oで総容量を1 Lとする。

16. キナーゼ反応混合物: アッセイプレート(100ウエル)1枚あたりの量: 1.0 ml キナーゼ緩衝液, 200 μg GST-, MilliQ H₂Oで最終容量8.0 mlとする。

17. ビオチン標識EEEEYEEYEEYEEYEEYEEY: 水中のペプチド保存溶液(1 mM, 2.98 mg/ml)を使用の直前に新たに作成する。

18. Vectastain ELITE ABC試薬: 14 mlの作業用試薬を調製するためには、1滴の試薬Aを15 ml TBSTに加え、管を数回逆さにして混合する。次に1滴の試薬Bを加える。管を室温で環状振盪器に入れ、30分間混合する。

【0420】

プロトコル

A. srcでコーティングしたELISAプレートの調製

1. ELISAプレートを100 μlの炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.6)中の0.5 μg/ウエルの抗srcモノクローナル抗体で、4℃で一夜コーティングする。

2. ウエルをPBSで1回洗浄する。

3. プレートをPBS中5%ミルク0.15mlで、室温で30分間ブロッキングする。

4. プレートをPBSで5回洗浄する。

5. 溶解緩衝液中で希釈した、srcでトランスフォームした酵母の溶解物を10µg/ウェルで加える(ウェルあたり総容量0.1ml)。(溶解物の量は、バッチにより異なるであろう)。プレートを室温で20分間振盪する。

B. ホスホチロシン抗体でコーティングしたELISAプレートの調製

1. 4G10プレート: 100µl PBS中の0.5µg/ウェルの4G10で4で一夜コーティングし、150µlのPBS中5%ミルクで室温で30分間ブロッキングする。

C. キナーゼアッセイ法

1. 未結合蛋白質をプレートから除去し、プレートをPBSで5回洗浄する。

2. ウェルあたり0.08mlのキナーゼ反応混合物(ウェルあたり10µlの10Xキナーゼ緩衝液および10µM(最終濃度)のビオチン-EEEEYEEYEEEEYEEEEYEEEEY, 水中に希釈)を加える。

3. 10%DMSOを含有する水中に希釈した10µlの化合物を加え、室温で15分間プレインキュベートする。

4. 10µl/ウェルの水中0.05mMATP(最終5µMATP)を加えることにより、キナーゼ反応を開始させる。

5. ELISAプレートを室温で15分間振盪する。

6. ウェルあたり10µlの0.5MEDTAを加えることによりキナーゼ反応を停止させる。

7. 90µlの上清を、ブロッキングした4G10コーティングELISAプレートに移す。

8. 振盪しながら室温で30分間インキュベートする。

9. プレートをTBSTで5回洗浄する。

10. Vectastain ELITE ABC試薬(100µl/ウェル)とともに室温で30分間インキュベートする。

11. ウェルをTBSTで5回洗浄する。

12. Turbo TMBで発色させる。

【0421】

実施例18：生化学的lckアッセイ - ELISA

このアッセイを用いて、GST- のリン酸化を讀出しとして測定することにより、lck蛋白質キナーゼ活性を決定する。

材料および試薬：

以下の材料および試薬を用いた：

1. lckでトランスフォームした酵母：Schizosaccharomyces Pombeを用いて組換えLckを発現させる (Superti-Furga, et al., EMBO J, 12:2625-2634; Superti-Furga, et al., Nature Biotech., 14:600-605)。S. Pombe SP200株 (h-s leu1.32 ura4 ade210) を記載されたように増殖させ、pRSP発現プラスミドで酢酸リチウム法によりトランスフォームする (Superti-Furga, (上掲))。細胞を1 μMチアミンの存在下で増殖させ、発現を誘導する。
2. 細胞溶解物：lckを発現する酵母細胞をペレット化し、水で1回洗浄し、再ペレット化し、使用するまで-80 で凍結保存する。
3. GST- ：細菌中で発現させるためのGST- 融合蛋白質をコードするDNAは、Howard Hughes Medical Institute, the University of California, San FranciscoのArthur Weissから入手する。トランスフォームした細菌を振盪しながら25 で一夜増殖させる。GST- は、グルタチオンアフィニティークロマトグラフィー (Pharmacia, Alameda, CA) により精製する。
4. DMSO: Sigma, St. Louis, MO
5. 96ウエルELISAプレート: Corning 96ウエルEasy Wash, 改変平底プレート, Corning Cat. #25805-96
6. NUNC 96ウエルV-底ポリプロピレンプレート, 化合物希釈用: Applied Scientific Cat. #AS-72092

7. 精製ウサギ抗GST抗血清: Amrad Corporation (Australia) Cat. # 90001605
8. ヤギ抗ウサギ-IgG-HRP: Amersham Cat. # V010301
9. ヤギ抗マウスIgG(H+L): Jackson Labs Cat. # 5215-005-003
10. 抗Lck(3A5)モノクローナル抗体: Santa Cruz Biotechnology Cat # sc-433
11. 抗ホスホチロシンモノクローナル抗体UBI05-321(代わりにUB40を用いてもよい)

【0422】

緩衝溶液:

1. PBS(ダルベッコリン酸緩衝化食塩水)1X溶液: GIBCO PBS, GIBCO Cat. # 450-1300EB
2. ブロッキング緩衝液: 100g BSA, 12.1g TRIS-pH7.5, 58.44g NaCl, 10ml Tween-20, MilliQ H₂Oで総容量1Lとする。
3. 炭酸緩衝液: Na₂CO₄, Fischer, Cat. # S495; MilliQ H₂Oで100mM溶液とする。
4. キナーゼ緩衝液: 1.0ml(1M保存溶液より)MgCl₂; 0.2ml(1M保存溶液より)MnCl₂; 0.2ml(1M保存溶液より)DTT; 5.0ml(1M保存溶液より)HEPES; 0.1ml TX-100; MilliQ H₂Oで総容量10mlとする。
5. 溶解緩衝液: 5.0 HEPES(1M保存溶液より); 2.74ml NaCl(5M保存溶液より); 10ml グリセロール; 1.0ml TX-100; 0.4ml EDTA(100mM保存溶液より); 1.0ml PMSF(100mM保存溶液より); 0.1ml Na₃VO₄(0.1M保存溶液より); MilliQ H₂Oで総容量100mlとする。
6. ATP: Sigma Cat. # A-7699, 10mM保存溶液(5.

51mg/ml)を作成する。

7. TRIS-HCl: Fischer Cat. #BP152-5, 600 mlのMilliQ H₂Oに, 121.14gの物質を加え, HClでpHを7.5に調節し, MilliQ H₂Oで総容量1Lとする。

8. NaCl: Fischer Cat. #S271-10, MilliQ H₂Oで5M保存溶液を作成する。

9. Na₃VO₄: Fischer Cat. #S454-50; 80mlのMilliQ H₂Oに, 1.8gの物質を加える; HClまたはNaOHでpHを10.0に調節する; 電子レンジ中で沸騰させる; 冷却する; pHを調べ, 加熱/冷却サイクルの後にpHが安定となるまでpH調節を繰り返す; MilliQ H₂Oで総容量100mlとする; 1mlのアリコートを作成し, -80で保存する。

10. MgCl₂: Fischer Cat. #M33-500, MilliQ H₂Oで1M保存溶液を作成する。

11. HEPES: Fischer Cat. #BP310-500; 200 mlのMilliQ H₂Oに, 59.6gの物質を加え, pHを7.5に調節し, MilliQ H₂Oで総容量250mlとし, 濾過滅菌する(1M保存溶液)。

12. アルブミン, ウシ(BSA), Sigma Cat. #A4503; 150mlのMilliQ H₂Oに, 30gの物質を加え, MilliQ H₂Oで総容量300mlとし, 0.22µmフィルターを通して濾過し, 4で保存する。

13. TBST緩衝液: 900mlのdH₂Oに, 6.057g TRISおよび8.766g NaClを加える; HClでpHを7.2に調節する; 1.0ml Triton-X₁₀₀を加える; dH₂Oで総容量1Lとする。

14. MnCl₂: Fischer Cat. #M87-100, MilliQ H₂Oで1M保存溶液を作成する。

15. DTT; Fischer Cat. #BP172-5

16. TBS (TRIS緩衝化食塩水): 900mlのMilliQ H₂O

に、6.057 g TRISおよび8.777 g NaClを加える；MilliQ H₂Oで総容量1 Lとする。

17. キナーゼ反応混合物：アッセイプレート（100ウエル）1枚あたりの量：1.0 ml キナーゼ緩衝液，200 μg GST- ，MilliQ H₂Oで最終容量8.0 mlとする。

【0423】

方法：

A. lckでコーティングしたELISAプレートの調製

1. 100 μlの炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.6）中のヤギ抗マウスIgG 2.0 μg / ウエルで、4 で一夜コーティングする。
2. ウエルをPBSで1回洗浄する。
3. プレートを0.15 mlのブロッキング緩衝液で室温で30分間ブロッキングする。
4. プレートをPBSで5回洗浄する。
5. 0.1 ml PBS中の抗lck（モノクローナル抗体3A5）を0.5 μg / ウエルで室温で1 - 2時間加える。
6. プレートをPBSで5回洗浄する。
7. 溶解緩衝液中に希釈した、lckでトランスフォームした酵母の溶解物を20 μg / ウエルで加える（ウエルあたり総容量0.1 ml）（溶解物の量はバッチによって異なる）。プレートを4 で一夜振盪して活性の喪失を防止する。

B. ホスホチロシン抗体でコーティングしたELISAプレートの調製

1. UB40プレート：100 μl PBS中の1.0 μg / ウエルUB40を4 で一夜加え，150 μlのブロッキング緩衝液で少なくとも1時間ブロッキングする。

C. キナーゼアッセイ法

1. 未結合蛋白質をプレートから除去し，プレートをPBSで5回洗浄する。
2. ウエルあたり0.08 mlのキナーゼ反応混合物（ウエルあたり，水で希釈した10 μlの10Xキナーゼ緩衝液および2 μg GST- を含む）を加える。

3. 10% DMSOを含有する水中で希釈した化合物10 μ lを加え、室温で15分間ブレインキュベートする。
4. 水中0.1mM ATP (最終濃度10 μ M ATP)を10 μ l/ウエルで加えることによりキナーゼ反応を開始させる。
5. ELISAプレートを室温で60分間振盪する。
6. ウエルあたり10 μ lの0.5MEDTAを加えることによりキナーゼ反応を停止させる。
7. 90 μ lの上清を、上述のB節からのブロッキングした4G10コーティングELISAプレートに移す。
8. 振盪しながら室温で30分間インキュベートする。
9. プレートをTBSTで5回洗浄する。
10. 100 μ l TBST中1:5000に希釈したウサギ抗GST抗体とともに室温で30分間インキュベートする。
11. ウエルをTBSTで5回洗浄する。
12. 100 μ lのTBST中1:20,000に希釈したヤギ抗ウサギ-IgG-HRPとともに室温で30分間インキュベートする。
13. ウエルをTBSTで5回洗浄する。
14. TurboTMBで発色させる。

【0424】

実施例19：生化学的c-kitアッセイ-ELISA

A. 材料および試薬

- 1) HNTG: 5X保存濃度: 100mM HEPES pH7.2, 750mM NaCl, 50%グリセロール, 2.5% TritonX-100.
- 2) PBS (ダルベッコリン酸緩衝化食塩水): Gibcoカタログ# 450-1300EB
- 3) 1Xブロッキング緩衝液: 10mM TRIS - pH7.5, 1% BSA, 100mM NaCl, 0.1% TritonX-100
- 4) 1Xキナーゼ緩衝液: 25mM HEPES, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 6mM MnCl₂

- 5) PMSF保存溶液 = 100mM (Sigmaカタログ# P-7626)
- 6) 10mMATP (細菌起源) Sigma A-7699, 5g.
- 7) UB40抗ホスホチロシンmAb (Terrance, Sugenから入手可能)
- 8) HRPコンジュゲート化ヒツジ抗マウスIgG. (Amersham NA 931)
- 9) ABTS (5Prime-3Prime7-579844)
- 10) TRISHCL: Fisher BP152-5
- 11) NaCl: Fisher S271-10
- 12) TritonX-100: Fisher BP151-100
- 13) Na₃VO₄: Fisher S454-50
- 14) MgCl₂: Fisher M33-500
- 15) MnCl₂: Fisher M87-500
- 16) HEPES: Fisher BP310-500
- 17) アルブミン, ウシ (BSA): Sigma A-8551
- 18) TBST緩衝液: 50mM Tris pH7.2, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100
- 19) ヤギアフィニティー精製抗体ラビットIgG (全分子): Cappel 55641.
- 20) 抗kit (C-20) ウサギポリクローナルIgG抗体: Santa Cruz sc-168
- 21) kit/CHO細胞: GyrB/kitを安定に発現するCHO細胞, 1mg/mlのG418を補充した標準的CHO培地で成長させる
- 22) インドリノン化合物: インドリノン化合物は, 以下の出願に記載されるように合成した: PCT/US99/06468 (1999年3月26日出願, Fong, et al., 表題"METHODS OF MODULATING TYROSINE PROTEIN KINASE" (Lyon&Lyon書類番号231/250PCT, 図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)。

【0425】

B. 方法

以下の全ての工程は特に示さない限り室温で行う。すべてのELISAプレート洗浄はTBS-Tで4回すすぐことにより行う。

k i t細胞溶解

この方法は、レセプター捕捉の開始の1時間前に行う。

- 1) 95%以上コンフルエントの15cm皿をPBSで洗浄し、可能な限り吸引する。
- 2) 15cm皿1枚あたり1mMPMSFを含む3mlの1xHNTGで細胞を溶解する。細胞をプレートから掻き取り、50ml遠心管に移す。
- 3) 上清をプールし、氷上に1時間、時々ボルテックスしながら放置する。これを行わないと、バックグラウンドが増加する(約3倍高くなる)。
- 4) 管を平衡させ、10,000xgで10分間、4 で遠心分離する。蛋白質測定のためにアリコートを取り出す。
- 5) 蛋白質測定用SOPにしたがって、ビシンコニン酸(BCA)法を用いて蛋白質測定を行う

【0426】

ELISA法

- 1) Corning 96ウエルELISAプレートをウエルあたり2µgのPBS中のヤギ抗ウサギ抗体でウエル総容量100µlで被覆する。4 で一夜保存する。
- 2) プレートを逆さにして液体を除去することにより未結合ヤギ抗ウサギ抗体を除去する。
- 3) 100µlのブロッキング緩衝液を各ウエルに加える。室温で60分間振盪する。
- 4) TBS-Tで4回洗浄する。プレートをペーパータオル上で軽くたたいて過剰の液体および泡を除去する。
- 5) ウエルあたり0.2µgのTBS-T中に希釈したウサギ抗-k i t抗体を加え、ウエルの総容量を100µlとする。室温で60分間振盪する。

- 6) 溶解物をHNTGで希釈する(180 µgの溶解物/100 µl)。
- 7) 100 µlの希釈溶解物を各ウエルに加える。室温で60分間振盪する。
- 8) TBSTで4回洗浄する。プレートをペーパータオルの上で軽くたたいて過剰の液体および泡を除去する。
- 9) 化合物/抽出物(または記載される他のもの)をポリプロピレン96ウエルプレート中で1×キナーゼ緩衝液および5 µlのATP中で希釈する。
- 10) 100 µlの希釈薬剤をELISAプレートのウエルに移す。振盪しながら室温で60分間インキュベートする。
- 11) 10 µlの0.5MEDTAを加えて反応を停止させる。この段階でプレートはある程度の時間安定である。
- 12) TBSTで4回洗浄する。プレートをペーパータオルの上で軽くたたいて過剰の液体および泡を除去する。
- 13) ウエルあたり100 µlのUB40(TBST中1:2000希釈)を加える。振盪しながら室温で60分間インキュベートする。
- 14) TBSTで4回洗浄する。プレートをペーパータオルの上で軽くたたいて過剰の液体および泡を除去する。
- 15) ウエルあたり100 µlのヒツジ抗マウスIgG-HRP(TBST中1:5000希釈)を加える。振盪しながら室温で60分間インキュベートする。
- 16) TBSTで4回洗浄する。プレートをペーパータオルの上で軽くたたいて過剰の液体および泡を除去する。
- 17) ウエルあたり100 µlのABTSを加える。振盪しながら15-30分間インキュベートする。
- 18) DynatechMR7000ELISAリーダーでアッセイを読む。試験フィルター=410nm, 参照フィルター=630nm。

【0427】

実施例20: RAFのリン酸化機能を測定するアッセイ

以下のアッセイは, RAFにより触媒される, その標的蛋白質MEKならびにMEKの標的であるMAPKのリン酸化の量を測定する。RAF遺伝子配列は, Bonnerら(1985, Molec. Cell. Biol. 5:1400-

1407)に記載されており、多くの遺伝子配列データバンクにおいて容易にアクセス可能である。核酸ベクターの構築および本発明のこの部分において用いられる細胞株は、Morrisonら(1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8855 - 8859)にすべて記載されている。

材料および試薬

1. Sf9 (Spodoptera frugiperda) 細胞; GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD
2. RIPA緩衝液: 20mM Tris / HCl pH7.4, 137mM NaCl, 10%グリセロール, 1mM PMSF, 5mg/L アプロテニン, 0.5% Triton X-100;
3. チオレドキシン-MEK融合蛋白質(T-MEK): T-MEK
発現およびアフィニティークロマトグラフィーによる精製は、製造元の方法に従って実施する。カタログ# K350-01およびR₃₅0-40, Invitrogen Corp., San Diego, CA
4. His-MAPK (ERK2); His-タグMAPKは、His-MAPKをコードするpUC18ベクターによりトランスフォームしたXL1 Blue細胞中で発現させる。His-MAPKはNi-アフィニティークロマトグラフィーにより精製する。Cat # 27-4949-01, Pharmacia, Alameda, CA, 本明細書に記載されたとおり。
5. ヤギ抗マウスIgG: Jackson Laboratories, West Grove, PA. カタログ, # 515-006-008, Lot # 28563
6. RAF-1蛋白質キナーゼ特異的抗体: URP2653, UBI
7. コーティング緩衝液: PBS; リン酸緩衝化食塩水, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD
8. 洗浄緩衝液: TBST - 50mM Tris / HCl pH7.2, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100
9. ブロッキング緩衝液: TBST, 0.1% エタノールアミン pH7.4
10. DMSO, Sigma, St. Louis, MO

11. キナーゼ緩衝液 (KB) : 20 mM HEPES / HCl (pH 7.2) , 150 mM NaCl , 0.1% Triton X-100 , 1 mM PMSF , 5 mg / L アプロテニン , 75 mM オルトバナジウム酸ナトリウム , 0.5 mM DTT および 10 mM MgCl₂
12. ATP 混合物 : 100 mM MgCl₂ , 300 mM ATP , 10 mCi ³³PATP (DuPont - NEN) / mL
13. 停止溶液 : 1% リン酸 ; Fisher , Pittsburgh , PA
14. Wallac リン酸セルロースフィルターマット ; Wallac , Turku , Finland
15. フィルター洗浄溶液 : 1% リン酸 , Fisher , Pittsburgh , PA
16. Tomtec プレート回収機 , Wallac , Turku , Finland
17. Wallac ベータプレートリーダー # 1205 , Wallac , Turku , Finland
18. 化合物用に , NUNC 96 ウェルV底ポリプロピレンプレート , Applied Scientific カタログ # AS - 72092

【0428】

プロトコル

以下のすべての工程は、特に指示しないかぎり、室温で実施した。

1. ELISA プレートコーティング : ELISA ウェルを 100 ml のヤギ抗マウスアフィニティー精製抗血清 (1 mg / 100 mL コーティング緩衝液) で 4 で一夜コーティングする。ELISA プレートは、4 で保存したとき、2 週間使用することができる。
2. プレートを逆さにして液体を除去する。100 mL のブロッキング溶液を加え、30 分間インキュベートする。
3. ブロッキング溶液を除去し、洗浄緩衝液で 4 回洗浄する。プレートをペーパータオル上で軽くたたいて過剰の液体を除去する。
4. 各ウェルに 1 mg の RAF - 1 特異的抗体を加え、1 時間インキュベート

する。工程3に記載したように洗浄する。

5. RAS / RAFで感染させたSf9細胞からの溶解物を解凍し、TBS Tで10mg / 100mLに希釈する。10mgの希釈溶解物をウエルに加え、1時間インキュベートする。インキュベーションの間、プレート振盪器でプレート振盪する。陰性対照には溶解物を加えない。各ウイルスにつきMOI 5で細胞を組換えバキュロウイルスで感染させた後、RAS / RAFで感染させたSf9昆虫細胞からの溶解物を調製し、48時間後に回収する。細胞をPBSで1回洗浄し、RIPA緩衝液中で溶解する。不溶物質を遠心分離(5分間、10000xg)により除去する。溶解物のアリコートドライアイス/エタノール中で凍結し、使用まで-80で保存する。

6. 非結合物質を除去し、上に簡単に述べたように洗浄する(工程3)。

7. ウエルあたり2mgのT-MEKおよび2mgのHis-MAEPKを加え、キナーゼ緩衝液で容量を40mLに調節する。細胞抽出物からT-MEKおよびMAPKを精製する方法は、本明細書の実施例に記載される。

8. 化合物(保存溶液10mg / mL DMSO)または抽出物をTBS Tプラス1% DMSO中であらかじめ20倍に希釈する。5mLのあらかじめ希釈した化合物/抽出物を工程6に記載したウエルに加える。20分間インキュベートする。対照には薬剤を加えない。

9. 5mL ATPミックスを加えることによりキナーゼ反応を開始する。インキュベーションの間、ELISAプレート振盪器でプレート振盪する。

10. 60分後、30mLの停止溶液を各ウエルに加えることによりキナーゼ反応を停止する。

11. ホスホセルロースマットおよびELISAプレートをTomtecプレート回収機中に置く。フィルターを回収し、フィルター洗浄溶液で製造元の推奨にしたがってこれを洗浄する。フィルターマットを乾燥する。フィルターマットを密封し、ケース中に置く。ケースを放射活性検出装置に入れ、フィルターマット上の放射活性リンを定量する。

あるいは、アッセイプレートの個々のウエルからの40mLのアリコートを、ホスホセルロースフィルターマットの対応する位置に移すことができる。フィル

ターを風乾した後、フィルターをトレイ中に置く。トレイを穏やかにロックし、洗浄溶液を15分間ごとに1時間交換する。フィルターマットを風乾する。フィルターマットを密封し、サンプル中の放射活性リンを測定するのに適当なケース中に入れる。ケースを検出装置に入れ、フィルターマット上の放射活性リンを定量する。

【0429】

実施例21：CDK2 / サイクリンA - 阻害アッセイ

このアッセイは、外部基質中のCDK2の蛋白質キナーゼ活性を測定する。

材料および試薬：

1. 緩衝液A (80mM Tris (pH 7.2), 40mM MgCl₂) : 4.84g Tris (F.W. = 121.1g/mol), 4.07g MgCl₂ (F.W. = 203.31g/mol), 500ml H₂O中に溶解。HClでpHを7.2に調節する。
2. ヒストンH1溶液 (0.45mg/ml ヒストンH1および20mM HEPES (pH 7.2) : 11.111mlの20mM HEPES pH 7.2 (477mg HEPES (F.W. = 238.3g/mol))中の5mg ヒストンH1 (Boehringer Mannheim), 100ml ddH₂O中に溶解する。1ml アリコートとして -80 で保存する。
3. ATP溶液 (60μM ATP, 300μg/ml BSA, 3mM DTT) : 120μlの10mM ATP, 600μlの10mg/ml BSAで20mlとし、1ml アリコートとして -80 で保存する。
4. CDK2溶液 : cdk2 / サイクリンA, 10mM HEPES, pH 7.2, 25mM NaCl, 0.5mM DTT, 10%グリセロール中。9μl アリコートとして -80 で保存する。

【0430】

アッセイの説明

1. 阻害剤の溶液を、ddH₂O / 15% DMSO (v/v) で所望の最終アッセイ濃度の3倍で調製する。
2. 20μlの阻害剤をポリプロピレンの96ウエルプレートのウエルに加え

る（または陽性および陰性対照については20 μ lの15% DMSO）。

3. ヒストンH1溶液（1ml / プレート）, ATP溶液（1ml / プレート
プラス陰性対照について1アリコート）, およびCDK2溶液（9 μ l / プレー
ト）を解凍する。CDK2は使用まで氷上に保存する。CDK2溶液を適当にア
リコートに分けて, 凍結解凍サイクルの繰り返しを避ける。

4. 9 μ l CDK2溶液を2.1ml 緩衝液A（プレートあたり）で希釈し,
混合し, 20 μ lを各ウエルに加える。

5. 1ml ヒストンH1溶液を1ml ATP溶液（プレートあたり）と混合し
て, 10ml ねじ蓋管に入れる。³³P ATPを0.15 μ Ci / 20 μ l（
アッセイ中, 0.15 μ Ci / ウエル）の濃度となるよう加える。BSAの泡を
避けるよう注意深く混合する。20 μ lを適当なウエルに加える。プレートを
プレート振盪器上で混合する。陰性対照については, 等量の20mM HEPES（
pH 7.2）とATP溶液とを混合し, ³³P ATPを0.15 μ Ci / 20
 μ l溶液の濃度となるよう加える。20 μ lを適当なウエルに加える。

6. 反応を60分間進行させる。

7. 35 μ lの10% TCAを各ウエルに加える。プレートをプレート振盪器
上で混合する。

8. 40 μ lの各サンプルをP30フィルターマットの升目上にスポットする
。マットを乾燥させる（約10 - 20分間）。

9. フィルターマットを250mlの1%リン酸（ddH₂O 1lあたり1
0mlリン酸）で4 X 10分間洗浄する。

10. フィルターマットをベータプレートリーダーで計数する。

【0431】

細胞 / 生物学的アッセイ

実施例22: PDGF - 誘導性BrdU取り込みアッセイ

材料および試薬:

1. PDGF: ヒトPDGF B/B; 1276-956, Boehringer
er Mannheim, Germany
2. BrdU標識試薬: 10mM, PBS (pH 7.4)中, Cat. No.

- 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
3. FixDenat: 固定溶液 (即使用可), Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
4. 抗BrdU-POD: ペルオキシダーゼとコンジュゲート化したマウスモノクローナル抗体, Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
5. TMB基質溶液: テトラメチルベンジジン (TMB), 即使用可, Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
6. PBS洗浄溶液: 1XPBS, pH7.4 (Sugen, Inc., Redwood City, California)
7. アルブミン, ウシ (BSA): 画分V粉末; A-8551, Sigma Chemical Co., USA
8. ヒトPDGF-Rを発現するよう遺伝子工学処理された3T3細胞株

【0432】

プロトコル

1. 細胞をDMEM, 10%CS, 2mMGl n中で, 96ウエルプレートに8000細胞/ウエルで播種する。細胞を5%CO₂中で37 で一夜インキュベートする。
2. 24時間後, 細胞をPBSで洗浄し, 次に無血清培地 (0%CS DME M, 0.1%BSA) 中で24時間血清飢餓とする。
3. 第3日に, リガンド (PDGF, 3.8nM, DMEM, 0.1%BSA 中で調製) および試験化合物を細胞に同時に加える。陰性対照ウエルには, 無血清DMEMおよび0.1%BSAのみを加える; 陽性対照細胞には, リガンド (PDGF) を加えるが試験化合物を加えない。試験化合物は, 96ウエルプレート中で無血清DMEM中でリガンドとともに調製し, 連続希釈して7種類の試験濃度とする。
4. リガンド活性化の20時間後, 希釈BrdU標識試薬 (DMEM, 0.1%BSA中1:100) を加え, 細胞をBrdU (最終濃度 = 10 μM) ととも

に1.5時間インキュベートする。

5. 標識試薬とともにインキュベーションした後、デカントし、逆さにしたプレートペーパータオル上で軽くたたくことにより、培地を除去する。Fix Denat 溶液を加え(50 µl / ウエル)、プレートをプレート振盪器上で室温で45分間インキュベートする。

6. デカントし、逆さにしたプレートをペーパータオル上で軽くたたくことにより、Fix Denat 溶液をよく除去する。ブロッキング溶液としてミルクを加え(PBS中5%脱水ミルク, 200 µl / ウエル)、プレートをプレート振盪器上で室温で30分間インキュベートする。

7. デカントによりブロッキング溶液を除去し、ウェルをPBSで1回洗浄する。抗BrdU-POD溶液(PBS, 1%BSA中1:100希釈)を加え(100 µl / ウエル)、プレートをプレート振盪器上で室温で90分間インキュベートする。

8. デカントし、ウェルをPBSで5回すすぐことにより抗体コンジュゲートをよく除去し、プレートを逆さにしてペーパータオル上で軽くたたくことにより乾燥させる。

9. TMB基質溶液を加え(100 µl / ウエル)、プレート振盪器で室温で20分間、発色が光度計による検出に十分となるまでインキュベートする。

10. サンプルの吸光度は、Dynatech ELISAプレートリーダーで410 nmで測定する(参照波長として490 nmで読みとるフィルターを用いる"二波長"モード)。

【0433】

実施例23: EGF - 誘導性BrdU取り込みアッセイ

材料および試薬

1. EGF: マウスEGF, 201; Toyobo, Co., Ltd. Japan
2. BrdU標識試薬: 10mM, PBS (pH7.4)中, Cat.No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
3. Fix Denat: 固定溶液(即使用可), Cat.No. 164722

- 9, Boehringer Mannheim, Germany
4. 抗BrdU-POD: ペルオキシダーゼとコンジュゲート化したマウスモノクローナル抗体, Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
5. TMB基質溶液: テトラメチルベンジジン (TMB), 即使用可, Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
6. PBS洗浄溶液: 1XPBS, pH7.4
7. アルブミン, ウシ (BSA): 画分V粉末; A-8551, Sigma Chemical Co., USA
8. ヒトEGF-Rを発現するよう遺伝子工学処理された3T3細胞株
【0434】

プロトコル

1. 細胞をDMEM中10%CS, 2mMGlucoseで, 96ウエルプレート中で8000細胞/ウエルで播種する。細胞を5%CO₂中で37℃で一夜インキュベートする。
2. 24時間後, 細胞をPBSで洗浄し, 次に無血清培地(0%CS DMEM, 0.1%BSA)中で24時間血清飢餓とする。
3. 第3日に, リガンド(EGF, 2nM, DMEM, 0.1%BSA中で調製)および試験化合物を細胞に同時に加える。陰性対照ウエルには0.1%BSAを含む無血清DMEMのみを加える。陽性対照細胞には, リガンド(EGF)を加えるが試験化合物を加えない。試験化合物は, 96ウエルプレート中で, 無血清DMEM中でリガンドとともに調製し, 連続希釈して7種類の試験濃度とする。
4. リガンド活性化の20時間後, 希釈したBrdU標識試薬(DMEM中1:100, 0.1%BSA)を加え, 細胞をBrdU(最終濃度=10μM)とともに1.5時間インキュベートする。
5. 標識試薬とともにインキュベートした後, デカントして逆さにしたプレートをペーパータオル上で軽くたたくことにより培地を除去する。FixDenat

t 溶液を加え (50 μ l / ウエル) , プレートをプレート振盪器で室温で45分間インキュベートする。

6 . デカントして逆さにしたプレートをペーパータオル上で軽くたたくことにより F i x D e n a t 溶液をよく除去する。ブロッキング溶液としてミルクを加え (P B S 中 5 % 脱水ミルク , 200 μ l / ウエル) , プレートをプレート振盪器で室温で30分間インキュベートする。

7 . デカントによりブロッキング溶液を除去し , ウエルを P B S で1回洗浄する。抗 B r d U - P O D 溶液 (P B S 中 1 : 100 希釈 , 1 % B S A) を加え (100 μ l / ウエル) , プレートをプレート振盪器で室温で90分間インキュベートする。

8 . デカントし , ウエルを P B S で5回すすぐことにより抗体コンジュゲートをよく除去し , プレートを逆さにしてペーパータオル上で軽くたたくことにより乾燥させる。

9 . T M B 基質溶液を加え (100 μ l / ウエル) , プレート振盪器で室温で20分間 , 発色が高度計検出に十分となるまでインキュベートする。

10 . サンプルの吸光度は , D y n a t e c h E L I S A プレートリーダーで , 410 nm (参照波長として490 nm を読むフィルターを用いる " 二波長 " モード) で測定する。

【0435】

実施例24 : E G F 誘導性 H E R 2 推進 B r d U 取り込み

材料および試薬 :

1 . E G F : マウス E G F , 201 ; T o y o b o , C o . , L t d . J a p a n

2 . B r d U 標識試薬 : 10 mM , P B S (p H 7 . 4) 中 , C a t . N o . 1647229 , B o e h r i n g e r M a n n h e i m , G e r m a n y

3 . F i x D e n a t : 固定溶液 (即使用可) , C a t . N o . 1647229 , B o e h r i n g e r M a n n h e i m , G e r m a n y

4 . 抗 B r d U - P O D : ペルオキシダーゼとコンジュゲート化したマウスモノクローナル抗体 , C a t . N o . 1647229 , B o e h r i n g e r M

annheim, Germany

5. TMB基質溶液: テトラメチルベンジジン (TMB), 即使用可, Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany

6. PBS洗浄溶液: 1XPBS, pH7.4, 自社製。

7. アルブミン, ウシ (BSA): 画分V粉末; A-8551, Sigma Chemical Co., USA

8. EGF-Rの細胞外ドメインおよびHer2の細胞内ドメインを有するキメラレセプターを発現するよう遺伝子工学処理された3T3細胞株

【0436】

プロトコル:

1. 細胞をDMEM, 10%CS, 2mMGlucose中で96-ウエルプレートに8000細胞/ウエルで播種する。細胞を37°Cで5%CO₂中で一夜インキュベートする。

2. 24時間後, 細胞をPBSで洗浄し, 次に無血清培地(0%CS DMEM, 0.1%BSAを含む)中で24時間血清飢餓とする。

3. 第3日に, リガンド(EGF = 2 nM, 0.1%BSAを含むDMEM中で調製)および試験化合物を細胞に同時に加える。陰性対照ウエルには無血清DMEM, 0.1%BSAのみを加える; 陽性対照細胞にはリガンド(EGF)を加えるが試験化合物は加えない。試験化合物は, 無血清DMEM中でリガンドとともに96ウエルプレート中で調製し, 連続希釈して7種類の試験濃度とする。

4. リガンド活性化の20時間後, 希釈BrdU標識試薬(DMEM中1:100, 0.1%BSA)を加え, 細胞をBrdU(最終濃度 = 10 μM)とともに1.5時間インキュベートする。

5. 標識試薬とともにインキュベートした後, デカントして逆さにしたプレートをペーパータオル上で軽くたたくことにより培地を除去する。FixDenat溶液を加え(50 μl/ウエル), プレートを室温でプレート振盪器で45分間インキュベートする。

6. デカントし, 逆さにしたプレートをペーパータオル上で軽くたたくことに

より, FixDenat 溶液をよく除去する。ブロッキング溶液としてミルクを加え (PBS 中 5% 脱水ミルク, 200 μ l / ウェル), プレートをプレート振盪器上で室温で 30 分間インキュベートする。

7. デカントによりブロッキング溶液を除去し, ウェルを PBS で 1 回洗浄する。抗 BrdU - POD 溶液 (PBS, 1% BSA 中 1:100 希釈) を加え (100 μ l / ウェル), プレートをプレート振盪器上で 90 分間室温でインキュベートする。

8. デカントし, ウェルを PBS で 5 回すすぐことにより抗体コンジュゲートをよく除去し, プレートを逆さにしてペーパータオル上で軽くたたくことにより乾燥させる。

9. TMB 基質溶液を加え (100 μ l / ウェル), プレート振盪器で室温で 20 分間, 発色が光度計検出に十分となるまでインキュベートする。

10. サンプルの吸光度を, Dynatech ELISA プレートリーダーで, 410 nm で (参照波長として 490 nm で読むフィルターを用いる "二波長" モードで) 測定する。

【0437】

実施例 25 : IGF1 - 誘導性 BrdU 取り込みアッセイ

材料および試薬 :

1. IGF1 リガンド : ヒト, 組換え ; G511, Promega Corp, USA
2. BrdU 標識試薬 : 10 mM, PBS (pH 7.4) 中, Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
3. FixDenat : 固定溶液 (即使用可), Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
4. 抗 BrdU - POD : ペルオキシダーゼとコンジュゲート化したマウスモノクローナル抗体, Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germany
5. TMB 基質溶液 : テトラメチルベンジジン (TMB), 即使用可, Cat. No. 1647229, Boehringer Mannheim, Germ

any

6. PBS洗浄溶液: 1XPBS, pH7.4

7. アルブミン, ウシ (BSA): 画分V粉末; A-8551, Sigma Chemical Co., USA

8. ヒトIGF-1レセプターを発現するよう遺伝子工学処理された3T3細胞株

【0438】

プロトコル:

1. 細胞をDMEM, 10%CS, 2mMGlucose中で96-ウエルプレートに8000細胞/ウエルで播種する。細胞を5%CO₂中, 37℃で一夜インキュベートする。

2. 24時間後, 細胞をPBSで洗浄し, 次に無血清培地(0%CS DMEM, 0.1%BSA)中で24時間血清飢餓とする

3. 第3日に, リガンド(IGF1 = 3.3 nM, 0.1%BSAを含むDMEM中で調製)および試験化合物を細胞に同時に加える。陰性対照ウエルには0.1%BSAを含む無血清DMEMのみを加える。陽性対照細胞にはリガンド(IGF1)を加えるが試験化合物を加えない。試験化合物は, 96ウエルプレートで無血清DMEM中でリガンドとともに調製し, 連続希釈して7種類の試験濃度とする。

4. リガンド活性化の16時間後, 希釈BrdU標識試薬(DMEM, 0.1%BSA中1:100)を加え, 細胞をBrdU(最終濃度 = 10 μM)とともに1.5時間インキュベートする。

5. 標識試薬とともにインキュベーションした後, デカントし, 逆さにしたプレートをペーパータオル上で軽くたたくことにより培地を除去する。FixDenat溶液を加え(50 μl/ウエル), プレートをプレート振盪器上で室温で45分間インキュベートする。

6. デカントし, 逆さにしたプレートをペーパータオル上で軽くたたくことによりFixDenat溶液をよく除去する。ブロッキング溶液としてミルクを加え(PBS中5%脱水ミルク, 200 μl/ウエル), プレートをプレート振盪

器上で室温で30分間インキュベートする。

7. ブロッキング溶液をデカントにより除去し、ウエルをPBSで1回洗浄する。抗BrdU-POD溶液(PBS, 1%BSA中1:100希釈)を加え(100 μ l/ウエル)、プレートがプレート振盪器上で室温で90分間インキュベートする。

8. デカントし、ウエルをPBSで5回すすぐことにより抗体コンジュゲートをよく除去し、プレートを逆さにしペーパータオル上で軽くたたくことにより乾燥する。

9. TMB基質溶液を加え(100 μ l/ウエル)、プレート振盪器上で室温で20分間、発色が光度計検出に十分となるまでインキュベートする。

10. サンプルの吸光度は、Dynatech ELISAプレートリーダーで、410nm(参照波長として490nmで読むフィルターを用いる"二波長"モード)で測定する。

【0439】

実施例26: HUV-EC-Cアッセイ

また、以下のプロトコルを用いて、PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGFまたはFlk-1/KDR(これらはすべてHUV-EC細胞により天然に発現されている)に対する化合物の活性を測定することができる。

第0日

1. HUV-EC-C細胞(ヒト臍静脈内皮細胞, (American Type Culture Collection; カタログNo. 1730CRL))を洗浄し、トリプシン処理する。ダルベッコリン酸緩衝化食塩水(D-PBS; Gibco BRL; カタログNo. 14190-029から入手)で2回、約1ml/10cm²組織培養フラスコで洗浄する。非酵素細胞解離溶液(Sigma Chemical Company; カタログNo. C-1544)中で0.05%トリプシン-EDTAでトリプシン処理する。0.05%トリプシンは、0.25%トリプシン/1mMEDTA(Gibco; カタログNo. 25200-049)を細胞解離溶液中で希釈することにより作成する。約1ml/25-30cm²組織培養フラスコで37 $^{\circ}$ Cで約5分間トリプシン処理する。細

胞をフラスコからはがした後，等量のアッセイ培地を加え，50 ml 滅菌遠心分離管 (Fisher Scientific; カタログ No. 05-539-6) に移す。

2. 50 ml 滅菌遠心分離管中にアッセイ培地を加えることにより，細胞を約 35 ml のアッセイ培地で洗浄し，約 200 g で 10 分間遠心分離し，上清を吸引し，35 ml の D-PBS に再懸濁する。D-PBS でさらに 2 回洗浄し，細胞を約 1 ml / 組織培養フラスコ 15 cm² のアッセイ培地に再懸濁する。アッセイ培地は，F12K 培地 (Gibco BRL; カタログ No. 21127-014) + 0.5% 熱不活性化ウシ胎児血清からなる。Coulter Counter (商標) (Coulter Electronics, Inc.) で細胞を計数し，アッセイ培地を細胞に加えて $0.8 - 1.0 \times 10^5$ 細胞/ml の濃度とする。

3. 細胞を 96 ウェル平底プレートに 100 μ l / ウェルまたは $0.8 - 1.0 \times 10^4$ 細胞 / ウェルで加える; 37 °C, 5% CO₂ で約 24 時間インキュベートする。

【0440】

第1日

1. 試験化合物の 2 倍滴定を別々の 96 ウェルプレート中に作成する。一般に，50 μ M から 0 μ M まで。上述の第 0 日，工程 2 と同じアッセイ培地を用いる。滴定は，90 μ l / ウェルの試験化合物を 200 μ M (4X 最終ウェル濃度) で特定のプレートカラムの最上のウェルに加えることにより行う。試験化合物保存液濃度は通常 DMSO 中 20 mM であるため，200 μ M の薬剤濃度は 2% DMSO を含む。

したがって，DMSO 濃度を一定に保持しながら薬剤を希釈するために，アッセイ培地中 (F12K + 0.5% ウシ胎児血清) 2% DMSO とした希釈剤を，試験化合物滴定の希釈剤として用いる。この希釈物をカラム中の残りのウェルに 60 μ l / ウェルで加える。カラムの最上ウェル中の 120 μ l の 200 μ M 試験化合物希釈物から 60 μ l を採取し，カラムの第 2 のウェル中の 60 μ l と混合する。このウェルから 60 μ l を採取し，カラム中の第 3 のウェル中の 60 μ

1と混合し、2倍滴定が完了するまでこれを続ける。最後から2番目のウエルが混合されたとき、このウエル中の120 μ lの60 μ lを採取し、これを廃棄する。最後のウエルには薬剤非含有対照として60 μ lのDMSO/培地希釈物を加える。以下のアッセイの、滴定する試験化合物の三重のウエルに十分な9つのカラムを作成する：(1) VEGF (Pepro Tech Inc., から入手, カタログNo. 100-200), (2) 内皮細胞成長因子 (ECGF) (酸性線維芽細胞成長因子またはaFGFとしても知られる) (Boehringer Mannheim Biochemicaから入手, カタログNo. 1439600); または(3) ヒトPDGF B/B (1276-956, Boehringer Mannheim, Germany) およびアッセイ培地対照。ECGFはヘパリンナトリウムを有する調製物として得た。

2. 50 μ l/ウエルの試験化合物希釈物を、第0日からのHUV-EC-C細胞0.8-1.0 \times 10⁴細胞/100 μ l/ウエルを含む96ウエルアッセイプレートに移し、37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂で約2時間インキュベートする。

3. 三重に、80 μ g/ml VEGF, 20ng/ml ECGF, または各試験化合物の条件に対する培地対照を50 μ l/ウエルで加える。試験化合物については、成長因子濃度は所望の最終濃度の4倍である。第0日、工程2からのアッセイ培地を用いて、成長因子の濃度を調節する。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂で約24時間インキュベートする。各ウエルに50 μ lの試験化合物希釈物, 50 μ lの成長因子または培地, および100 μ lの細胞を加え、総量200 μ l/ウエルとする。すなわち、すべてをウエルに加えたとき、4倍濃度の試験化合物および成長因子は1倍となる。

【0441】

第2日

1. ³H-チミジン (Amersham; カタログNo. TRK-686) を1 μ Ci/ウエル (RPMI培地+10%熱不活性化ウシ胎児血清中で調製した100 μ Ci/ml溶液を10 μ l/ウエル) で加え、37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂で約24時間インキュベートする。RPMIはGibco BRLから入手する, カタログNo. 11875-051

第3日

1. プレートを - 20 で一夜凍結する。

第4日

1. プレートを融解し、96ウエルプレート回収器 (Tomtec Harvester 96 (登録商標)) でフィルターマット (Wallac; カタログ No. 1205-401) 上に回収する; Wallac Betaplate (商標) 液体シンチレーション計数機で計数する。

【0442】

結論

当業者は、本発明は、その目的を実施し、記載される結果および利点、ならびに本明細書に固有のものを得るのによく適合していることを容易に理解するであろう。本明細書に記載される分子複合体および方法、手順、処理、分子、特定の化合物は、現在のところ好ましい態様の代表的なものであり、例示的なものであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。当業者は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して置換基の変更および改変をなすことができることを容易に理解するであろう。

【0443】

本明細書において言及されるすべての特許および刊行物は、本発明の属する技術分野の技術者のレベルを示す。すべての特許および刊行物は、それぞれの刊行物が特定の個々に本明細書の一部としてここに引用されることと同じ程度に、本明細書の一部として引用される。

【0444】

本明細書に例示的に記載されている発明は、本明細書に特定的に開示されていない任意の要素または限定なしでも適切に実施することができる。すなわち、例えば、本明細書における各例において、"・・・を含む"、"・・・から本質的になる"および"・・・からなる"との用語は、他の2つのいずれかと置き換えることができる。本明細書において用いた用語および表現は、説明の用語として用いられるものであり、限定ではない。そのような用語および表現の使用においては、示されかつ記載されている特徴またはその一部の等価物を排除することを意図する

ものではなく、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲中で種々の変更が可能であることが理解される。すなわち、好ましい態様および任意の特徴により本発明を特定的に開示してきたが、当業者には本明細書に記載される概念の変更および変種が可能であり、そのような変更および変種も特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

さらに、発明の特徴および局面がマーカッシュグループの用語で記載されている場合、当業者は、本発明が、マーカッシュグループのメンバーの個々のメンバーまたはサブグループに関してもまた記載されていることを認識するであろう。例えば、Xが、臭素、塩素およびヨウ素からなる群より選択されるとして記載されている場合、Xが臭素である特許請求の範囲およびXが臭素および塩素である特許請求の範囲も完全に記載されている。

【0445】

遺伝コードの縮重の観点から、核酸の他の組み合わせもまた本明細書のペプチドおよび蛋白質をコードする。例えば、GCT, GCC, GCA, GCGの4つの核酸配列はすべてアミノ酸アラニンをコードする。したがって、あるアミノ酸について平均で3つのコドンが存在し、100アミノ酸の長さのポリペプチドは平均で 3^{100} 、もしくは 5×10^{47} 種類の核酸配列によりコードされるであろう。すなわち、日常的な方法を用いて過度の実験なしに、核酸配列を改変して第1の核酸配列によりコードされるものと同じポリペプチドをコードする第2の核酸配列を形成することができる。すなわち、特許請求の範囲に記載されるペプチドおよび蛋白質をコードするすべての可能な核酸もまた、コドン使用、特にヒトにおいて好ましいものを完全に考慮してこれらがすべて書き出されているように、本明細書に完全に記載されている。さらに、ポリペプチドの有意な活性が変更しない配列の領域内において、ポリペプチドのアミノ酸配列、またはそのようなポリペプチドをコードする対応する核酸配列の変更が生ずるよう設計しまたは選択することができる。例えば、ポリペプチドの活性部位と離れたターン中で、アミノ酸変化を生じさせることができる。また、欠失（例えば活性部位に影響を与えないポリペプチドのセグメントまたはそのようなポリペプチドをコードする対応する核酸配列を除去する）および付加（例えば、活性部位の機能に影響を与え

ずに、ポリペプチド配列により多くのアミノ酸を付加する、例えばGST融合蛋白質を形成する、または活性部位の機能に影響を与えずにそのようなポリペプチドをコードする対応する核酸配列に付加する)もまた本発明の範囲内である。ポリペプチドに対するそのような変更は、当業者が日常的な方法を用いて過度の実験なしに行うことができる。すなわち、本発明のペプチドまたは蛋白質の有意な活性に影響を与えないと容易に決定することができるすべての可能な核酸および/またはアミノ酸配列もまた本明細書に完全に記載されている。

【0446】

本明細書においては、本発明を広くかつ一般的に記載している。一般的開示に含まれるより狭い種および亜属のそれぞれのグループもまた本発明の一部を形成する。これには、除かれたものが具体的に記載されているか否かにかかわらず、属から任意の主題を除く「ただし・・・」またはネガティブ限定を含む発明の一般的記載が含まれる。

【0447】

他の態様は特許請求の範囲の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ヒト蛋白質キナーゼのヌクレオチド配列を5'から3'の方向で示す。

【図2】 図2は、ヒト蛋白質キナーゼのアミノ酸配列を翻訳の方向で示す。

。

【 図 1 B 】

FIGURE 1B

```

>SEQ_ID_2_SGK351
GGGAACTAATTTATGCAGTTAGAAAAGAGAGGGAATATTTATGGAAGACACTGCGTGCCTTTIACITGGCAGAAATCCTCCATGGCCTTGGGGCATTIACATCAAA
AGGGATCATCTACAGAGACCCTGAAGCCGGAGAAATATCAIGCTTAATCACCAAGGTCATGTGAAACTAACAGACTTGGACTATGCAAGAATCTAATCAATG
ACGGAACAGTCCACACACATTTTGTGGAACAATAGAAATACATGGCCCTGAAATCTTGATGAGAAATGGCCACAATTGCTGTGGATTTGTTGGAGTTTGGG
AGCATTAAATGTATGACATGCCAATGGGCAACCCCAATTTACTGGGGAATAGAAAGAAAACAATTGACAAATCCTCAAATGTAAACTCAATTTGCCCTCCC
TACCTCACAGAAAGCCAGAGATCTGCTTAAAAAGCTACTAGAAAAGAAATGCTGCTTCATCTGGGAGCTGGTCTCTGGGACCCCTGGAGAAAGTTCAAGCT
CATCCATTCTTTAGACACATTAACCTGGGAAGAACTTCTGGCTGGAAAGGTGGAGCCCCCCCCCTTTAAACCCTCIGTGTGTAAGT

```

【 図 2 A 】

FIGURE 2A

```

>SEQID_AA_3_SGK341
MKWWGDTGVGNPPSFTTGLSSRPGAMVADRSRWPLAQGKGAQAGTWRAAVECSGRGLGAASESPQPPPGVEGAAQFAEPDGALEGAAAGGSGBEGSGGGP
RRALRAVYVRSSESGGAAGGPEAGAROCILRACEAEGAHLTSPVPELDFGETAVLDAFYDADVAVDMSDVSRQPSLFYHLGVRESFDMANNVILYHDYDADI
ALSUDMVTQKNTASSGNYYHIPYVTPCIDYPCESDAQRKASEYMQFNWDNLDGFLCMLVDRHSLKDDIHYVTSYTYKEILLNDIRKAREKYQGBELAKELARI
KLKRMNDTEVLTSIHNLILSYRDHQDYDAMVKLVEITLMLPTCDLADQHNKPHYAFALNRRNSTGDREKALQMLQVLSQCDHPGDMFCLCGRIYKDIHLDSDCK
DTSRDSALIEWYRKGFELQSSLYSGINLAVLLVAGQQFETSLELRKIGVRLNSLLGRKGSLEKMNNDVVGQFFSVSMLAHDVGRKAVQAARLFRKLPVWYLR
LVQNLLJRRFRKTHHSRQERLNFWDIFEATNEVNTGIRFPVLVIEPTKYVQPSVSNNEAERTVSLWHVSPTEMKQHEWNTASSKGISLSKEDRCCFLY
VHDNSDDFYFSTEQCSRFSLYKEMUNTAGSTVELEGEFDGDTLEXYEDHDANGERVVLGKGTYGIVYAGRDLNQVRIAKEIFERDSRYSQFHEEIALHKYL
KHRNIVQYLGVSSENGYKIFMEQVPGGSLSALLRSKWGPMKEPTKFTKQLEGLKYLHENQVHRDIKDNVIVNTYSGVYKISDFGTSKRLAGVNPCTETFTTGL
QYMAPHIDQGRPGYGAPADIWSLGCHEMATSKEPPELGEPOAAMFKVGMFKHPEPEALSAAARAFILSCFEPDPKRAITTAELLEGEFLQVYKGGKKNLAKP
SEGRGVVLAALPTQGBPMATSSSEHGSVDFSDAQPDALFEKTRAPRHHLGHLLSVDFESSALEDRGLASSPEDDQGLFLRKKDSERRALYKILWEEQNQVASNLQ
ECVACSSEELHLSVGHKQJGHELDFFIRSPHRVMAATTISKLVLDLDFDSSISQIHLVLFQFQDAVNKILRNHLIRPHWMEAMDNIERRAVQAAVTLIPELRAHPEPTC
ETEGVDKMDMAEBEGYPPATGPGQEAQPHQQLSLQELRQETNRLLBEHLVEKBREYQNLRLRQTLQKKTQELYHLQLKLSNCITENPAGPYGQRTDKELIDWLR
LQGADAKTIEKIVEEGYTLSDILNEHKEDLRYLRLRGGLCRLWSAVSQYRRAQEASETKDKA

```


【 2 B】

FIGURE 2B

```
>SEQID_AA_4_SGK351
GELFMQLRREGFMEDTACFYLAESMALGHILHOKGITYRDLKPENMLNHQGHVVKLTDFGLCKESHGTVIHFCCGTEYMAPELLMRESGHNCAYDCWWSJGALMY
DMPTGAPPTGENRCKTIDNLIKCKLNLPYILTQEARDLLKLLKRNAASHLGAGPGDAGEVQAHPFFRHINWEELLARKVEFFPKPLLYS
```

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | | | | | |
|---|--|----------|--|--|--|-----------------------|
| | | | | | International Application No.
PCT/US 01/11675 | |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | | | | | |
| IPC 7 | C12N15/54 | C12N9/12 | C12N1/21 | C12N5/12 | C07K16/40 | |
| | C12Q1/48 | C12Q1/68 | A61K38/45 | | | |
| 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 | C12N | C12Q | C07K | A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | | | |
| Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) | | | | | | |
| EPO-Internal, BIOSIS | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | | | | | Relevant to claim No. |
| X | <p>WANG XUHONG SUNNY ET AL: "Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 49, 1996, pages 31607-31611, XP002182275</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p> | | | | | 1-14, 21, 25 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | | | | | |
| * Special categories of cited documents: | | | | | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | | *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 | | | |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date | | | *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 | | | |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | | | *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 | | | |
| *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | | *S* document member of the same patent family | | | |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search | | | | Date of mailing of the international search report | | |
| 25 January 2002 | | | | 08.02.2002 | | |
| Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. 5618 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016 | | | | Authorized officer

Oderwald, H | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 01/11675

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>ICHIJO H ET AL: "INDUCTION OF APOPTOSIS BY ASK1, A MAMMALIAN MAPKKK THAT ACTIVATES SAPK/JNK AND P38 SIGNALING PATHWAYS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 275, no. 5296, 1997, pages 90-94, XP000933551
ISSN: 0036-8075
the whole document</p> | 1-14, 21, 25 |
| X | <p>DATABASE EM_HTG 'Online!
EMBL Heidelberg, Germany;
AC AC025563, 15 March 2000 (2000-03-15)
WATERSTON R H: "The sequence of Homo sapiens clone"
XP002182276
see nucleotides 188380-188870
abstract</p> | 1-5 |
| X | <p>GROVE J R ET AL: "CLONING AND EXPRESSION OF TWO HUMAN P70 S6 KINASE POLYPEPTIDES DIFFERING ONLY AT THEIR AMINO TERMINI" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 11, no. 11, 1 November 1991 (1991-11-01), pages 5541-5550, XP002051876
ISSN: 0270-7306
the whole document</p> | 1-14, 21, 25 |
| A | <p>WO 99 15635 A (ZENECA LTD)
1 April 1999 (1999-04-01)
the whole document</p> | 1-14, 21-28 |
| A | <p>WO 99 47686 A (CADUS PHARMACEUTICAL CORP ;JOHNSON GARY L (US))
23 September 1999 (1999-09-23)
the whole document</p> | 1-14, 21-28 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/11675**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

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

2. Claims Nos.: 15-20
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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

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

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

see additional sheet

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

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

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

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

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

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

1. Claims: 1-28 (partially)

A nucleic acid molecule (SEQ ID NO: 1) encoding a kinase polypeptide having SEQ ID NO: 3. Said polypeptide, a recombinant cell, an antibody, a hybridoma, a kit, a method for identifying a substance that modulates the activity of said polypeptide, a method for treating a disease or disorder, a method for detection of a kinase polypeptide.

2. Claims: 1-28 (partially)

same as invention 1 but comprising SEQ ID NO: 2 and 4.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 15-20

Present claims 15-20 relate to a product/compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a substance that modulates the activity of a kinase. The claims cover all products/compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products/compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product/compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, no search has been carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/11675

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|----|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9915635 | A | 01-04-1999 | AU 9172698 | 12-04-1999 |
| | | | A1 | |
| | | | EP 1015566 | 05-07-2000 |
| | | | A1 | |
| | | | WO 9915635 | 01-04-1999 |
| JP 2001517430 | T | | | 09-10-2001 |
| | | | US 6265560 | 24-07-2001 |
| | | | B1 | |
| ----- | | | | |
| WO 9947686 | A | 23-09-1999 | AU 3354499 | 11-10-1999 |
| | | | A2 | |
| | | | WO 9947686 | 23-09-1999 |
| US 6312934 | B1 | | | 06-11-2001 |
| | | | | |
| ----- | | | | |

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 P 9/12 | | A 6 1 P 15/08 | 4 C 0 8 4 |
| 15/08 | | 15/10 | 4 H 0 4 5 |
| 15/10 | | 25/00 | |
| 25/00 | | 25/02 | |
| 25/02 | | 25/04 | |
| 25/04 | | 25/06 | |
| 25/06 | | 25/14 | |
| 25/14 | | 25/16 | |
| 25/16 | | 25/18 | |
| 25/18 | | 25/22 | |
| 25/22 | | 25/24 | |
| 25/24 | | 25/28 | |
| 25/28 | | 27/02 | |
| 27/02 | | 31/04 | |
| 31/04 | | 31/10 | |
| 31/10 | | 31/12 | |
| 31/12 | | 35/00 | |
| 35/00 | | 37/06 | |
| 37/06 | | 43/00 | 1 1 1 |
| 43/00 | 1 1 1 | C 0 7 K 16/40 | |
| C 0 7 K 16/40 | | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/15 | | 1/19 | |
| 1/19 | | 1/21 | |
| 1/21 | | 9/12 | |
| 5/10 | | C 1 2 Q 1/02 | |
| 9/12 | | 1/48 | Z |
| 15/02 | | 1/68 | A |
| C 1 2 Q 1/02 | | G 0 1 N 33/15 | Z |
| 1/48 | | 33/50 | Z |
| 1/68 | | 33/53 | M |
| G 0 1 N 33/15 | | 33/566 | |
| 33/50 | | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| 33/53 | | 5/00 | A |
| 33/566 | | | B |
| | | 15/00 | C |

(31)優先権主張番号 6 0 / 2 1 3 , 8 0 5

(32)優先日 平成12年6月22日(2000.6.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

- (72)発明者 ブラウマン, グレゴリー
 アメリカ合衆国 94070 カリフォルニア
 州 サン カルロス, ワインディング ウ
 ェイ 35
- (72)発明者 ホワイト, デイビッド
 アメリカ合衆国 94002 カリフォルニア
 州 ベルモント, バークレイ ウエイ
 2623
- (72)発明者 マニング, ジェラルド
 アメリカ合衆国 94025 カリフォルニア
 州 メンロ パーク, フレモント ストリ
 ート 4, 844
- (72)発明者 シュダーサナム, スーチャ
 アメリカ合衆国 94904 カリフォルニア
 州 グリーンプレー, コルテ パテンシオ
 20
- (72)発明者 マルティネス, リカルド
 アメリカ合衆国 94404 カリフォルニア
 州 フォスター シティ, カルティエ レ
 ーン 984
- (72)発明者 ケーネピール, ショーン
 アメリカ合衆国 94610 カリフォルニア
 州 オークランド, オレンジ ストリート
 22, 447

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 新型人类蛋白激酶和蛋白激酶如酶 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003530110A | 公开(公告)日 | 2003-10-14 |
| 申请号 | JP2001575192 | 申请日 | 2001-04-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 苏根公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Sujen公司 | | |
| [标]发明人 | プラウマングレゴリー
ホワイトデイビッド
マニングジェラルド
シュダーサナムスーチャ
マルティネスリカルド
ケーネピールシヨーン | | |
| 发明人 | プラウマン,グレゴリー
ホワイト,デイビッド
マニング,ジェラルド
シュダーサナム,スーチャ
マルティネス,リカルド
ケーネピール,シヨーン | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P3/00 A61P9/02 A61P9/10 A61P9/12 A61P15/08 A61P15/10
A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24
A61P25/28 A61P27/02 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00
C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/54
C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 | | |
| CPC分类号 | A61K38/00 A61P3/00 A61P9/02 A61P9/10 A61P9/12 A61P15/08 A61P15/10 A61P25/00 A61P25/02
A61P25/04 A61P25/06 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P27
/02 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 C12N9/1205 | | |
| FI分类号 | A61K45/00 A61P3/00 A61P9/02 A61P9/10 A61P9/12 A61P15/08 A61P15/10 A61P25/00 A61P25/02
A61P25/04 A61P25/06 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P27
/02 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15
C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z
G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.C | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045
/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA77 4B024/AA01 4B024/BA10 4B024/BA41
4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024
/HA01 4B024/HA12 4B050/CC04 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA05
4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ20 4B063/QQ27 4B063/QQ44 4B063
/QR07 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA15X
4B065/AA26X 4B065/AA41X 4B065/AA46X 4B065/AA48X 4B065/AA50X 4B065/AA57X 4B065/AA72X
4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01
4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084
/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/MA13 4C084/MA17
4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA36 4C084/MA37 4C084
/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14
4C084/ZA022 4C084/ZA122 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA222
4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA422 4C084/ZA432 4C084/ZB082 4C084/ZB262 4C084/ZB322
4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC202 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045
/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 | | |

优先权

60/195953 2000-04-10 US

60/201015 2000-05-01 US

60/213805 2000-06-22 US

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

本发明涉及激酶多肽，编码激酶多肽的核苷酸序列以及可用于诊断和治疗各种激酶相关疾病和病症的各种产物和方法。使用生物信息学策略，鉴定了PTK和STK的哺乳动物成员，并预测了它们的蛋白质结构。

1. 本发明涉及激酶多肽，编码激酶多肽的核苷酸序列以及可用于诊断和治疗各种激酶相关疾病和病症的各种产物和方法。使用生物信息学策略，鉴定了PTK和STK的哺乳动物成员，并预测了它们的蛋白质结构。

2. 激酶是细胞内信号转导通路中的关键分子。它们通过磷酸化靶蛋白来传递信号。激酶家族包括酪氨酸激酶（TK）、丝氨酸/苏氨酸激酶（SK）、脂肪族激酶（AK）、双特异性激酶（BSK）和组氨酸激酶（HK）。

3. 本发明特别关注于鉴定新的哺乳动物成员，这些成员属于蛋白酪氨酸激酶（PTK）和丝氨酸/苏氨酸激酶（STK）家族。通过生物信息学策略，我们鉴定了数百个新的候选成员。

4. 我们预测了这些新成员的蛋白质结构，并发现它们具有与已知激酶家族成员相似的结构域。这些发现为理解激酶在细胞信号转导中的作用提供了新的见解。

5. 本发明还提供了编码这些新成员的核苷酸序列，以及可用于诊断和治疗各种激酶相关疾病和病症的产物和方法。

6. 本发明的方法和策略可以用于鉴定其他激酶家族的新成员，并预测它们的蛋白质结构。

7. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶抑制剂和激动剂，这些分子可以用于治疗各种疾病。

8. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞信号转导中的作用，以及它们在疾病发生中的作用。

9. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞增殖、分化和凋亡中的作用。

10. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞迁移和侵袭中的作用。

11. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。

12. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。

13. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。

14. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。

15. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。

16. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。

17. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。

18. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。

19. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。

20. 本发明的方法和策略还可以用于鉴定激酶在细胞凋亡中的作用。