

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532035

(P2004-532035A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004. 10. 21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/45	A 6 1 P 1/04	4 B O 2 4
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 9/10	4 B O 5 0
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 11/06	4 B O 6 3
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 19/02	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 249 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-587586 (P2002-587586)	(71) 出願人	390023526
(86) (22) 出願日	平成14年2月25日 (2002. 2. 25)		メルク エンド カムパニー インコーポ
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月27日 (2003. 8. 27)		レーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/005670		MERCK & COMPANY INC
(87) 国際公開番号	W02002/090524		OPERATED
(87) 国際公開日	平成14年11月14日 (2002. 11. 14)		アメリカ合衆国、ニュージャージー、ロー
(31) 優先権主張番号	60/272, 260		ウエイ、イースト リンカーン アヴェニ
(32) 優先日	平成13年2月28日 (2001. 2. 28)		ュー 1 2 6
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062007
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , CA, JP, US		弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なヒトシグナル伝達キナーゼ-MAPKAP-2 をコードする単離核酸分子、コードされたタンパク質、該核酸によって形質転換された細胞及びその使用

(57) 【要約】

各々が配列番号 1 及び配列番号 3 で表されるヌクレオチド配列を含む新規に同定された 2 つの酵素、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ活性化プロテインキナーゼ 2 が開示されている。開示された酵素の各々は、*in vitro* で Erk 及び p38 MAPK によってリン酸化され活性化されるセリン／トレオニンシグナル伝達キナーゼである。また、組換え核酸分子を含む細胞、そのアンチセンス構築物、開示されたタンパク質の各々に特異的な抗体が開示されており、また、新規な核酸分子及びそれらの遺伝子産物を含むキットのような新規な核酸分子及びそれらの遺伝子産物の使用方法が開示されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトのマイトジェン活性化プロテインキナーゼを活性化するプロテインキナーゼ-2 (MAPKAP-2 キナーゼ) をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子であって、前記ヌクレオチド配列が、

(a) ヒトのMAPKAP-2 キナーゼをコードしており配列番号1で表されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列、

(b) ヒトのMAPKAP-2 キナーゼをコードしており配列番号1で表されるヌクレオチド配列の相補配列に高緊縮条件下でハイブリダイズし、配列がDNAであるときは完全相補性であり、RNAであるときはヒト細胞の天然型mRNAに一致するようなヌクレオチド配列、

(c) 前項(a) または(b) の配列をコードするヒトMAPKAP-2 ポリペプチドに縮重するヌクレオチド配列、及び、

(d) 配列番号2で表されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列またはその対応フラグメント、

から成るグループから選択されることを特徴とする単離核酸分子。

【請求項 2】

MAPKAP-2 キナーゼのスプライス変異体をコードするコーディング領域を含み、MAPKAP-2 キナーゼが配列番号1で表されるヌクレオチド配列によってコードされていることを特徴とする単離核酸分子。

【請求項 3】

単離核酸分子がcDNAであることを特徴とする請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項 4】

前記核酸分子が配列番号1で表されるヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項 5】

前記単離核酸分子が配列番号1で表されるヌクレオチド配列の相補配列に緊縮性洗浄条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項 6】

配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するMAPKAP-2 キナーゼをコードする単離核酸分子。

【請求項 7】

請求項1に記載の核酸分子によってコードされた実質的に純粋なヒトMAPKAP-2 キナーゼ。

【請求項 8】

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むMAPKAP-2 キナーゼをコードする単離核酸配列のスプライス変異体であるヌクレオチド配列によってコードされた実質的に純粋なヒトMAPKAP-2 キナーゼ。

【請求項 9】

配列番号1で表されるヌクレオチド配列によってコードされた実質的に純粋なヒトMAPKAP-2 キナーゼ。

【請求項 10】

配列番号1で表されるヌクレオチド配列の相補配列に緊縮性洗浄条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされた実質的に純粋なヒトMAPKAP-2 キナーゼ。

【請求項 11】

配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む実質的に純粋なヒトMAPKAP-2 キナーゼ。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

請求項 1 に記載の核酸分子によってトランスフェクトまたは形質転換された細胞であって、細胞が細菌細胞、哺乳類細胞または両生類卵母細胞であり、核酸分子が細胞に異種性であることを特徴とする適当な宿主細胞。

【請求項 1 3】

生物サンプル中の M A P K A P - 2 メッセンジャー R N A の検出方法であって、

(a) M A P K A P - 2 キナーゼを発現すると推測される適当な宿主細胞に請求項 1 に記載の核酸分子を複合体の形成に有利な条件下で導入する段階と、

(b) 前記複合体の存在を前記サンプル中の前記 M A P K A P - 2 キナーゼの存在を示す指標として検出する段階と

から成る方法。

10

【請求項 1 4】

M A P K A P - 2 キナーゼをコードする D N A 配列の同定方法であって、c D N A ライブラリーまたはゲノムライブラリーを標識プローブでプローブする段階と、プローブに対して有意な相同度を有している配列をライブラリーから回収する段階とから成り、プローブが請求項 1 に記載のヌクレオチド配列から成ることを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

(a) 請求項 1 に記載の核酸分子を真核細胞に導入する段階と、

(b) 段階 (a) の細胞中の第二メッセンジャー活性を検出する段階とから成り、前記活性は導入された核酸分子によってコードされたポリペプチドによって仲介されることを特徴とするサンプル中の M A P K A P - 2 キナーゼの同定方法。

20

【請求項 1 6】

ヒト M A P K A P - 2 キナーゼの活性を調節する被験化合物を同定するバイオアッセイであって、該バイオアッセイが、

(a) 被験化合物の非存在下で M A P K A P - 2 キナーゼをコードする D N A で形質転換された真核細胞の第二メッセンジャー活性を測定し、これによって第一測定値を得る段階と、

(b) 被験化合物の存在下で M A P K A P - 2 キナーゼをコードする D N A で形質転換された真核細胞の第二メッセンジャー活性を測定し、これによって第二測定値を得る段階と、

(c) 第一測定値と第二測定値とを比較し、第一測定値と第二測定値との違いを生じた化合物を M A P K A P - 2 キナーゼの活性を調節する被験化合物として同定する段階とから成り、真核細胞が機能性ヒト副甲状腺ホルモン - 2 ポリペプチドを発現することの特徴とするバイオアッセイ。

30

【請求項 1 7】

M A P K A P - 2 に仲介される疾病状態に対する被験化合物の治療有効性をモニターする方法であって、

(i) 機能不全の M A P K A P - 2 仲介疾病状態にあると推測される患者から被験化合物を投与する前に投与前サンプルを採取する段階と、

(i i) 投与前サンプル中の m R N A またはゲノム D N A でコードされた M A P K A P - 2 キナーゼの発現レベルまたは活性を検出して第一測定値を得る段階と、

40

(i i i) 投与後サンプル中の m R N A またはゲノム D N A でコードされた M A P K A P - 2 キナーゼの発現レベルまたは活性を検出して第二測定値を得る段階と、

(i v) 第一測定値と第二測定値との M A P K A P - 2 キナーゼの発現レベルまたは活性を比較する段階と、

(v) 上記に応じて患者に対する化合物の投与を変更する段階とから成る方法。

【請求項 1 8】

機能不全のシグナル伝達 M A P K A P - 2 キナーゼによって示される疾病状態の退縮、進行または発症を判定する方法であって、方法が、(i) 前記疾病状態に罹っていると推測される被験者の c D N A または m R N A を含有するサンプルを、配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列を含む核酸ハイブリダイゼーションプローブに、該ハイブリダイゼーショ

50

ンブと c D N A または m R N A との結合に有利な条件下で接触させて両者間に複合体を形成させる段階と、(i i) 前記被験者が前記疾病状態を発症する危険があることを示す指標として前記複合体を検出する段階とから成ることを特徴とする方法。

【請求項 19】

機能不全のシグナル伝達 M A P K A P - 2 キナーゼを特徴とする病的障害の退縮、進行または発症を判定する方法であって、障害を生じた患者のサンプルを、配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列を有する単離核酸分子の遺伝子産物に特異的な検出可能プローブに、プローブ／遺伝子産物複合体の形成に有利な条件下で接触させる段階から成り、前記複合体の存在が患者の病的障害の退縮、進行または発症を示す指標となることを特徴とする方法。

10

【請求項 20】

プローブが抗体であることを特徴とする請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

抗体が放射性ラベルまたは酵素によって標識されていることを特徴とする請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

炎症インヒビターとして使用するための被験化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 配列番号 1 とヒト M A P K A P - 2 キナーゼをコードするヌクレオチド配列とから成るグループから選択され配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列の相補配列に高緊縮条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされ

20

た M A P K A P - 2 キナーゼに被験化合物を接触させる段階と、
(b) 接触した M A P K A P - 2 キナーゼタンパク質の H s p - 27 に結合する能力または H s p - 27 をリン酸化する能力を試験する段階とから成り、M A P K A P - 2 キナーゼによる H s p - 27 のリン酸化を阻害するかまたは M A P K A P - 2 キナーゼタンパク質と H s p - 27 との結合を阻害する被験化合物が炎症治療薬の候補となることを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 7 に記載のポリペプチドを医薬的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組合せて含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 24】

30

請求項 7 のポリペプチドの異常レベルを生じ易い被験者の体内でこのような異常レベルを修正する薬剤の効力をモニターする方法であって、有効量の薬剤を被験者に投与する段階と、投与後の被験者の体内のポリペプチドのレベルを測定する段階とから成り、ポリペプチドレベルが正常レベルに近づくように変化することが薬剤の効力の指標となることを特徴とする方法。

【請求項 25】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列に対して配列番号 2 の全長の少なくとも 80 % の一致を有しているポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む単離核酸分子であって、80 % 一致は、配列番号 2 に許容されるアミノ酸変異を定義し、該アミノ酸変異は式：

$$N a = X a - (X a Y)$$

40

〔式中、N a はアミノ酸変異の最大数、X a は配列番号 2 に含まれるアミノ酸の総数、Y は 0 . 80 の値を表し、X a と Y との非整数積はこの積を X a から減算する前に最も近い整数になるよう端数を切り捨てる〕で表される等式によって決定及び計算されることを特徴とする単離核酸分子。

【請求項 26】

M A P K A P - 2 キナーゼを活性化する (1 つまたは複数の) リガンドの同定方法であって、方法が、

(i) 転写調節要素に機能的に連結されたりポーター遺伝子と M A P K A P - 2 キナーゼをコードする外因性遺伝子とを含有している宿主細胞を用い、転写調節要素が活性化されると (1 つまたは複数の) リポーター遺伝子の発現が誘発されるようにして、内因性 M A

50

MAPKAP-2 キナーゼが欠失した宿主細胞をMAPKAP-2 キナーゼ活性を活性化すると推測される候補化合物に接触させる段階と、

(ii) (1つまたは複数の) リポーター遺伝子の誘発をモニターする段階と、

(iii) ポリペプチドを活性化 (1つまたは複数の) リガンドを同定する段階とから成る方法。

【請求項27】

請求項1に記載の核酸分子の遺伝子産物に特異的な抗体。

【請求項28】

異種性タンパク質を発現するように設計されたヒト以外の組換え細胞系であって、細胞系が配列番号2で表されるMAPKAP-2 キナーゼを誘導的に発現する請求項1に記載の異種性核酸分子によって形質転換されるかまたはトランスフェクトされた宿主細胞を含むことを特徴とするヒト以外の組換え細胞系。

10

【請求項29】

宿主細胞中で核酸分子の発現をコントロールする調節ヌクレオチド配列に作動可能に連結された請求項1に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項30】

結合相手を含有すると推測されるサンプル中のMAPKAP-2 キナーゼの結合相手の検出方法であって、

(i) サンプルと配列番号2のMAPKAP-2 キナーゼとをMAPKAP-2 キナーゼが結合相手に有利に結合する条件下で接触させる段階と、

20

(ii) 結合相手に対するMAPKAP-2 キナーゼの結合を検出することによってサンプル中の結合相手の存在を判定する段階とから成る方法。

【請求項31】

配列番号2のアミノ酸配列から成るキナーゼポリペプチドの結合活性またはキナーゼ活性を調節する化合物の同定方法であって、方法が、

(a) ポリペプチドを発現する細胞と被験化合物とをポリペプチドの結合活性またはキナーゼ活性の調節に適した条件下で接触させる段階と、

(b) 被験化合物によるポリペプチドの結合活性またはキナーゼ活性の調節を検出する段階とから成る方法。

【請求項32】

30

前記薬剤がMAPKAP-2 活性を阻害することを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記薬剤がMAPKAP-2 活性を刺激することを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項34】

薬剤がMAPKAP-2 キナーゼに特異的に結合する抗体であることを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項35】

薬剤がMAPKAP-2 遺伝子の転写またはMAPKAP-2 mRNAの翻訳を調節することによってMAPKAP-2 の発現を調節することを特徴とする請求項31に記載の方法。

40

【請求項36】

薬剤がMAPKAP-2 mRNAまたはMAPKAP-2 遺伝子のコーディング鎖にアンチセンスであるヌクレオチド配列を有する核酸分子であることを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項37】

哺乳類のMAPKAP-2 キナーゼの内因性シグナル伝達活性を調節する方法であって、MAPKAP-2 を発現し得る細胞を請求項31の化合物に接触させることから成る方法。

【請求項38】

ポリペプチドの活性の前記調節がポリペプチドに対する被験化合物の直接結合によって検

50

出されることを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記直接結合が細胞を溶解させ免疫沈降を行うことによって測定されることを特徴とする請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記直接結合が酵母ツーハイブリッドアッセイによって測定されることを特徴とする請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

ポリペプチドの活性の前記調節が M A P K A P - 2 キナーゼ活性アッセイの使用によって検出されることを特徴とする請求項 40 に記載の方法。

10

【請求項 42】

前記 M A P K A P - 2 キナーゼ活性アッセイが M A P K A P - 2 基質のリン酸化に基づくことを特徴とする請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

配列番号 2 のアミノ酸配列から成るポリペプチドの天然に生じる対立遺伝子変異体の結合活性またキナーゼ活性を調節する化合物の同定方法であって、対立遺伝子変異体が、45℃の 6 × S S C 中で配列番号 1 から成る核酸分子の相補配列にハイブリダイズし、次いで 50 - 65℃の 0.2 × S S C、0.1% S D S 中で 1 回以上洗浄した核酸分子によってコードされており、方法が、

(a) 対立遺伝子変異体を発現する細胞と被験化合物とを対立遺伝子変異体の結合活性またはキナーゼ活性の調節に適した条件下で接触させる段階と、

20

(b) 被験化合物による対立遺伝子変異体の結合活性またキナーゼ活性の調節を検出する段階とから成る方法。

【請求項 44】

配列番号 2 によって表されるアミノ酸配列、または、配列番号 2 に少なくとも 80% 一致し、配列番号 2 との違いが末端アミノ酸残基の 1 つまたは複数のアミノ酸の置換、付加、及び／または末端アミノ酸残基の欠失に限られた変異配列を含み、変異配列の H s p - 27 リン酸化能力が実質的に減少していないことを特徴とする単離ポリペプチド。

【請求項 45】

M A P K A P - 2 キナーゼまたは核酸の異常な発現または活性を特徴とする障害を有する患者の治療方法であって、M A P K A P - 2 調節剤である薬剤を患者に投与することから成る方法。

30

【請求項 46】

M A P K A P - 2 調節剤が M A P K A P - 2 キナーゼであることを特徴とする請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

M A P K A P - 2 調節剤が M A P K A P - 2 核酸分子であることを特徴とする請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

M A P K A P - 2 調節剤がペプチド、ペプチド模擬体またはその他の小分子であることを特徴とする請求項 45 に記載の方法。

40

【請求項 49】

M A P K A P - 2 タンパク質または核酸の異常な発現を特徴とする障害が免疫関連障害であることを特徴とする請求項 45 に記載の方法。

【請求項 50】

セリン含有基質のリン酸化方法であって、

(a) 有効濃度の A T P と配列番号 1 に少なくとも 84% の相同度を有しており H s p - 27 をリン酸化する酵素とを基質と共にインキュベートする段階と、

(b) 基質のリン酸化量を測定する段階とから成る方法。

【請求項 51】

50

更に、酵素と酵素のアンタゴニスト候補またはアゴニスト候補との混合物を形成する段階と、基質のリン酸化量に対する前記アンタゴニスト候補またはアゴニスト候補の効果を測定する段階とから成る請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

マイトジェン－活性化プロテインキナーゼ (MAPKAP-2) の活性を調節する試薬の同定方法であって、方法が、

(a) セリン、トレオニン及びチロシンキナーゼ活性を有している MAPKAP-2 キナーゼを含有する被験サンプルと試薬とを入手する段階と、

(b) 被験サンプルを MAPKAP-2 基質及び標識リン酸塩と共に基質のリン酸化に十分な条件下でインキュベートする段階と、

(c) 基質内への標識リン酸塩の取り込み率を測定し、この取り込み率を MAPKAP-2 活性の測定値とする段階と、

(d) MAPKAP-2 活性に対する試薬の効果を対照に比較する段階とから成り、前記 MAPKAP-2 活性の変化が MAPKAP-2 活性を調節できる試薬の存在を示す指標となることを特徴とする方法。

【請求項 53】

前記 MAPKAP-2 基質が Hsp-25、Hsp-27 及び ALT2 の 1 つまたは複数であることを特徴とする請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

前記調節が MAPKAP-2 活性の阻害であることを特徴とする請求項 51 に記載の方法。

【請求項 55】

試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 51 に記載の方法。

【請求項 56】

試薬が腫瘍壊死因子及びインターロイキン-1 から成るグループから選択されることを特徴とする請求項 51 に記載の方法。

【請求項 57】

MAPKAP-2 合成を調節する試薬の同定方法であって、方法が、

(a) セリン、トレオニン及びチロシンキナーゼ活性を有している MAPKAP-2 キナーゼを含有する被験サンプルを準備する段階と、

(b) 被験サンプルを試薬の存在下でインキュベートする段階と、

(c) サンプル中に存在するタンパク質をゲル電気泳動によって画分する段階と、

(d) タンパク質を膜に転移させる段階と、

(e) MAPKAP-2 キナーゼに特異的な標識抗体によってタンパク質をプローブし、MAPKAP-2 合成のレベルを検出抗体量によって測定する段階と、

(f) MAPKAP-2 合成に対する試薬の効果を対照に比較する段階とから成り、MAPKAP-2 合成の変化が MAPKAP-2 合成を調節し得る試薬の存在を示す指標となることを特徴とする方法。

【請求項 58】

MAPKAP-2 発現を調節する試薬の同定方法であって、

(a) MAPKAP-2 ポリヌクレオチドが発現されている被験サンプルを準備する段階と、

(b) 被験サンプルを試薬の存在下でインキュベートする段階と、

(c) 被験サンプルからポリアデニル化 RNA を単離する段階と、

(d) ポリアデニル化 RNA を MAPKAP-2 キナーゼに特異的なポリヌクレオチドプローブと共にインキュベートする段階と、

(e) ポリアデニル化 RNA にハイブリダイズしたプローブの量を測定し、MAPKAP-2 の発現レベルを RNA にハイブリダイズした MAPKAP-2 プローブの量に直接関係付ける段階と、

10

20

30

40

50

(f) M A P K A P - 2 発現に対する試薬の効果を対照に比較する段階とから成り、M A P K A P - 2 発現の変化がM A P K A P - 2 発現を調節し得る試薬の存在を示す指標となることを特徴とする方法。

【請求項 59】

試薬が、ポリヌクレオチド、ポリペプチド及び抗体から成るグループから選択されることを特徴とする請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

試薬が、アンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

マイトジェン活性化プロテインキナーゼを活性化するプロテインキナーゼー 2 (M A P K A P - 2 キナーゼ) の検出に役立つキットであって、前記キットが、バッファと、セリン、トレオニン及びチロシンキナーゼ活性を有するM A P K A P - 2 キナーゼに特異的に結合する標識抗体とを含んでおり、試験すべきサンプルがバッファ及び抗体に混合されることを特徴とするキット。

10

【請求項 62】

マイトジェン活性化プロテインキナーゼを活性化するプロテインキナーゼー 2 (M A P K A P - 2 キナーゼ) をコードしている核酸の検出に役立つキットであって、前記キットが、バッファと、M A P K A P - 2 をコードする核酸配列またはその相補配列に緊縮ハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る少なくとも約 20 個のヌクレオチドから

20

【請求項 63】

ヒトのマイトジェン活性化プロテインキナーゼを活性化するプロテインキナーゼー 2 (M A P K A P - 2 キナーゼ) をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子であって、前記ヌクレオチド配列が、

(a) ヒトのM A P K A P - 2 キナーゼをコードしており配列番号 3 で表されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列、

(b) ヒトのM A P K A P - 2 キナーゼをコードしており配列番号 3 で表されるヌクレオチド配列の相補配列に高緊縮条件下でハイブリダイズし、配列がD N Aであるときは完全相補性であり、R N Aであるときはヒト細胞の天然型m R N Aに一致するようなヌクレオチド配列、

30

(c) 前項 (a) または (b) の配列をコードするヒトM A P K A P - 2 ポリペプチドに縮重するヌクレオチド配列、及び、

(d) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列またはその対応フラグメント、

から成るグループから選択されることを特徴とする単離核酸分子。

【請求項 64】

M A P K A P - 2 キナーゼのスプライス変異体をコードするコーディング領域を含み、M A P K A P - 2 キナーゼが配列番号 3 で表されるヌクレオチド配列によってコードされていることを特徴とする単離核酸分子。

40

【請求項 65】

配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するM A P K A P - 2 キナーゼをコードする単離核酸分子。

【請求項 66】

配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むM A P K A P - 2 キナーゼをコードする単離核酸分子のスプライス変異体であるヌクレオチド配列によってコードされた実質的に純粋なヒトM A P K A P - 2 キナーゼ。

【請求項 67】

請求項 62 に記載の核酸分子によってトランスフェクトまたは形質転換された細胞であって、細胞が細菌細胞、哺乳類細胞または両生類卵母細胞であり、核酸分子が細胞に異種性

50

であることを特徴とする適当な宿主細胞。

【請求項 68】

請求項 63 に記載の核酸分子によってコードされた実質的に純粋なヒト MAPKAP-2 キナーゼ。

【請求項 69】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に少なくとも 80 % の一致を有しているヌクレオチドを含む単離核酸配列であって、配列番号 1 の全長に N a までの核酸変異を含み、N a はこのような変異の最大数を表し、式：

$$N a = X a - (X a Y)$$

〔式中の、X a は配列番号 1 に含まれるヌクレオチドの総数、Y は 0.80 の値を表し、X a と Y との非整数積はこの積を X a から減算する前に最も近い整数になるように端数を切り捨てる。〕によって計算され、前記ポリペプチドが MAPKAP-2 活性を有していることを特徴とする単離核酸配列。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞内シグナル伝達セリン／トレオニンキナーゼをコードする新規に同定された核酸分子、このポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド、及び、新規なポリペプチドに対して誘発された抗体に関する。本発明は更に、新規なポリヌクレオチド及びポリペプチドの使用、例えば、細胞内のシグナル伝達の調節方法、MAPKAP-2 仲間障害の治療プロトコルの設計における本文中に開示された MAPKAP-2 キナーゼの利用方法を提案する。また、開示された MAPKAP-2 キナーゼを不可欠な要素とするシグナル伝達経路の機能不全によってまたは機能不全の MAPKAP-2 キナーゼによって発症する医学的障害を有する哺乳類を治療するための治療用組成物を提供しそれらの使用を提案する。 20

【背景技術】

【0002】

細胞増殖の調節は、細胞環境を“感知”し、環境変化に関する入力シグナルを細胞に供給すべく作用する細胞表面受容体の種々のファミリーによって精密に統制される複雑なシグナル伝達経路アレイに仲介されている。これらのシグナル伝達経路は、タンパク質合成、分泌、代謝及び遺伝子発現の変化に導く細胞増殖のすべての重大な段階を調節する。これらのシグナルは、細胞表面膜に局在する特異的受容体分子に結合し該受容体分子を活性化する増殖因子、ホルモン、サイトカイン及びペプチドの形態を有している。活性化された受容体は次に細胞内シグナル伝達経路を起動し、最終的には、遺伝子発現、タンパク質分泌、細胞周期進行及び細胞分化に影響する多様な細胞応答を生じさせる。細胞内部のシグナル伝達経路は一般に、相互に情報を交換するタンパク質の連鎖によって形成され、連鎖中の各タンパク質成分は上流のアクチベーターからシグナルを取り込んで下流の種々のターゲットまたはエフェクタータンパク質に転送する。 30

【0003】

タンパク質の可逆的リン酸化はシグナル伝達の中心的な特徴である。多くの細胞プロセスがリン酸化／脱リン酸メカニズムによってある程度調節されることは当業界で公知である。実際、多くのプロテインキナーゼ“カスケード”が認識されており、このようなカスケードでは、一連のプロテインキナーゼがリン酸化し互いを順次に調節して、最終的には、代謝酵素、転写因子、細胞骨格タンパク質、細胞周期レギュレーター、翻訳コントロールタンパク質、イオンチャンネル及びその他のプロテインキナーゼのような基幹的な調節分子を差別的にリン酸化する。このように、プロテインキナーゼ及びホスファターゼは細胞調節において主要な役割を果たす。 40

【0004】

典型的な哺乳類細胞では 10,000 の活性タンパク質のうちの 1,000 以上がリン酸化されていると推定される。活性化を駆動する高エネルギーリン酸塩は一般に、プロテ 50

ンキナーゼによってアデノシン三リン酸分子 (A T P) から特定のタンパク質に転移され、タンパク質ホスファターゼによって該タンパク質から除去される。リン酸化は細胞外シグナル (ホルモン、神経伝達物質、増殖因子及び分化因子など)、細胞周期のチェックポイント及び環境的または栄養的ストレスに応答して生じ、分子スイッチの起動にほぼ類似している。スイッチが起動されると、適当なプロテインキナーゼが代謝酵素、調節タンパク質、受容体、細胞骨格タンパク質、イオンチャンネルもしくはポンプまたは転写因子を活性化する。

【0005】

プロテインキナーゼは、他のタンパク質をリン酸化したり及び／またはそれ自体がリン酸化する (自己リン酸化) 酵素である。基質に関しては、真核細胞のシグナル伝達に關与するプロテインキナーゼは、それらの利用基質に基づいて主要な3グループ、即ち、タンパク質—チロシン特異的キナーゼ (チロシン残基の基質をリン酸化する)、タンパク質—セリン／トレオニン特異的キナーゼ (セリン及び／またはトレオニン残基の基質をリン酸化する) 及びデュアル特異性キナーゼ (チロシン、セリン及び／またはトレオニン残基の基質をリン酸化する) に大別される。今日までに100をはるかに上回る数のプロテインキナーゼが同定されている。プロテインキナーゼの概要に関しては、Kemp, B. E. (ed.) *Peptides and Protein Phosphorylation*, CRC Press Inc. (1990) 及びHanksら, *Science* 241: 42-52 (1988) を参照するとよい。

【0006】

プロテインキナーゼが細胞調節において基幹的な役割を果たすことが判明したので、プロテインキナーゼの欠陥が多くの疾病状態及び病気の容態に關与することは意外ではない。例えば、多くのガン細胞中ではEGFもしくはPDGFのような細胞性チロシンキナーゼの過剰発現、または、構成的に活性の形態 (ガン遺伝子) を産生するチロシンキナーゼの突然変異が生じる。Druckerら, *Nature Medicine* 2: 561-56 (1996) 参照。タンパク質チロシンキナーゼはまた、炎症シグナルに關与する。欠陥Thr/Serキナーゼ遺伝子は筋硬直性ジストロフィー、ガン、アルツハイマー病のような複数の疾病に關与することが証明された。Sanpeiら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 341-6 (1995); Sperberら, *Neurosci. Lett.* 197: 149-153 (1995); Grammasら, *Neurobiology of Aging* 16: 563-569 (1995); Govoniら, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777: 332-337 (1996)。キナーゼは更に、アンギオテンシンII及び造血サイトカイン受容体のシグナル伝達にも關与していた。B. Berkら, *Circ. Res.*, 80: 5, pp. 607-16 (1997); R. Mufson, *FASEB J.*, 11: 1 pp. 37-44 (1997)。

【0007】

セリン／トレオニンプロテインキナーゼのファミリーに属するマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPキナーゼ/MAPK) が、増殖因子、マイトジェン及びプロテインチロシンキナーゼを受容体とする分化因子のような様々な細胞外アゴニストの細胞内作用の仲介に中心的な役割を果たしていることが最近になって証明された (Cobbら, 1991; Sturgill and Wu, 1991)。

【0008】

過去数年にわたるデータは、MAPキナーゼがプロテインキナーゼ及びプロテインホスファターゼの双方を介するシグナル伝達を促進し、様々な多くの病的生理状態を生み出す生物作用を起動する原因となることを示唆していた。このような状態としては、機能不全の白血球、T—リンパ球によって発症する状態、急性及び慢性の炎症疾患、例えば、リウマチ様関節炎、クローン病、炎症性腸疾患、骨粗鬆症、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患、ゼンソク及びアレルギー反応がある。

【0009】

10

20

30

40

50

ほぼ全ての細胞表面受容体がシグナル伝達中に1つまたは複数のMAPプロテインキナーゼ“カスケード”を使用する。受容体のタンパク質チロシンキナーゼ、非受容体のタンパク質チロシンキナーゼ、サイトカイン受容体及びヘテロトライマー形Gプロテイン結合受容体のような種々の受容体からのシグナルはすべてMAPKの活性化を生じさせると報告されていた。

【0010】

MAPキナーゼカスケードの活性化は様々な多くの刺激に対する細胞応答の初期イベントとして生じる。MAPキナーゼの活性化メカニズムは集中的に研究され、受容体のチロシンキナーゼのリガンド誘発活性化によって開始され一連のプロテインキナーゼの逐次活性化を生じさせる保存されたシグナル伝達カスケードが判明した。MAPキナーゼ経路に集まるシグナルの多様性はこのカスケードが無数の目的に役立つことを示しており、その活性化の結果は細胞の状況に依存するであろう。

10

【0011】

MAPキナーゼは、配列Thr-X-Tyrをもつデュアルリン酸化モチーフにおいて、それ自体が“デュアル特異性”酵素であるマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPKK)によってリン酸化されることによって活性化される(Ahnら, 1991; Gomez and Cohen, 1991; Nakielnnyら, 1992a, b)。デュアル特異性キナーゼはタンパク質中のチロシン残基及びセリン/トレオニン残基の双方をリン酸化し得る。活性化されたMAPKは核に転位し、核でc-Myc、C/EBPβ、p62^{TCF}/Elk-1、ATF-2及びc-Junのような様々の転写因子を直接的にリン酸化し活性化し得る。Grunicke, Hans H., Signal Transduction Mechanisms in Cancer, Springer-Verlag (1995)。

20

【0012】

哺乳類のMAPキナーゼには、細胞外シグナル調節キナーゼ(extracellular regulated kinases, ERK)、c-Jun N末端キナーゼ(JNK)及びCSBP/p38/RK/Mpk2キナーゼがある(Cobbら)。これらのサブグループは、MAPキナーゼ活性化に必要なトリペプチドデュアルリン酸化モチーフの配列: Thr-Glu-Tyr(ERK)、Thr-Pro-Tyr(JNK)及びThr-Gly-Tyr(p38)によって識別される。最も特性決定の進んだ経路は細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)を活性化する経路である。c-Jun N末端キナーゼ(JNK)及びp38MAPKを活性化するシグナル伝達経路についてはそれほど理解は進んでいない。Davis, Trends Biochem. Sci. 19: 470-473 (1994) 参照。各経路は、MAPキナーゼまたはERK、MAP/ERKキナーゼ(MEK)及びMEKキナーゼ(MEKK)から成るMAPキナーゼモジュールを含む。

30

【0013】

公知の全てのシグナル伝達経路はMAPキナーゼをリン酸化及び活性化するために2つのデュアル特異性プロテインキナーゼMEK1及びMEK2を使用すると考えられている。MAPキナーゼの基質としては、リン酸化によって活性化されて遺伝子発現を誘発する別のプロテインキナーゼ及び複数の転写因子がある。

40

【0014】

JNK及びp38キナーゼはプロ炎症性サイトカインTNF-α及びインターロイキン-1に応答して、また、熱ショック、紫外線、リポ多糖類及びタンパク質合成インヒビターのような細胞性ストレスによって活性化される。B. Derijardら, Cell, 76, pp. 1025-37 (1994); L. Shapiroら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, pp. 12230-4 (1995) 参照。MAPKキナーゼ、特にp38経路の活性化の結果として転写因子及び開始因子がリン酸化され、細胞分裂、アポトーシス、培養細胞の浸潤性及び炎症応答に影響を及ぼす。

【0015】

50

p38MAPキナーゼは、MAPキナーゼ活性化プロテインキナーゼMAPKAP-2及びMAPKAP3、MAPキナーゼ相互作用性キナーゼMNK1及びMNK2、並びに、p38-調節/活性化プロテインキナーゼPRAK及びMSK1のような多くのプロテインキナーゼを活性化する。更に、ATF2（活性化転写因子2）、CHOP/GADD153及びMEF2（筋細胞エンハンサー因子2）のような転写因子が同時にリン酸化される。p38MAPキナーゼのシグナル伝達のターゲットが核であることが最近になって判明した。

【0016】

上記と極めて対照的に、ERKキナーゼはマイトジェン及び増殖因子によって活性化される。D. Bokemeyerら, *Kidney Int.* 49, pp. 1187-98 (1996)。ERKカスケードは1つまたは複数のRafファミリーキナーゼによって開始され、これらのキナーゼがMAPキナーゼキナーゼ1 (MKK1) 及びMKK2をリン酸化及び活性化し、その結果としてMKKがMAPキナーゼ細胞外シグナル調節キナーゼ1 (Erk1) 及びErk2をリン酸化及び活性化し得る (Davis, 1993; Marshall, 1995)。Erkが次に、表皮増殖因子受容体、サイトゾルホスホリパーゼA2、リボソームS6キナーゼI1 (Rsk)、Elk-1（三重複合体因子）、c-Jun及びc-Mycのような細胞質及び核の双方の基質をリン酸化する (Sturgillら, 1988; Pulvererら, 1991; Gilleら, 1995)。ERKカスケードの活性化によって生じる最終結果は細胞増殖または分化に導く最初期遺伝子転写の誘発である。活性化されたMAPキナーゼは核に転位し転写因子をリン酸化すると報告されている。

【0017】

MAPキナーゼの基質としては、S6キナーゼ-rsk1及びrsk2 (p90^{rsk}) 及びMAPKAPキナーゼ-2 (MAPKAP-2) がある。後者はマイトジェン活性化プロテインキナーゼ活性化プロテインキナーゼ-2の頭字語である。

【0018】

MAPKAP-2はマイトジェン活性化プロテインMAPキナーゼ (MAPK) のp42及びp44のアイソフォームによって活性化される酵素として骨格筋中で初めて同定された (Stokoeら, 1992a)。MAPKAP-2は、基質特異性、インヒビターH7に対する不感受性及びアミノ酸配列によって、同じくp42/p44MAPKによって活性化されるリボソームプロテインS6キナーゼ (MAPKAPキナーゼ-1) のRSKファミリーから識別される (Stokoeら, 1992a, 1993)。MAPKAPキナーゼ-2の触媒ドメインは、複数のカルモジュリン依存性プロテインキナーゼを含むプロテインキナーゼ系統樹の1分枝及びMAPKAPキナーゼ-2のC末端キナーゼドメインに極めて類似している (35%-40%一致) (Stokoeら, 1993, Engelら, 1993)。該ドメインの前にプロリンに富むN末端ドメインが存在し、また、共通前駆体mRNAのオルタナティブスプライシングによって異なる2つのC末端配列が形成され得ると報告されている。これらのアイソフォームの1つは、推定される核局在シグナルKK(X)₁₀KRRKKを含んでいる (Stokoeら, 1993; Zuら, 1994)。MAPKAP-2 mRNA転写物は試験したどの哺乳類組織にも同様の濃度で存在している (Stokoeら, 1993; Zuら, 1994)。

【0019】

MAPKAP-2の基質としては、グリコーゲンシンターゼ、スモール熱ショックタンパク質Hsp-25及びHsp-27、ATF2及びCREBがある (Stokoeら, 1992b; Freshenyら, 1994; Tanら, 1996)。最も特性決定されたMAPKAP-2の基質はHsp27である。

【0020】

MAPKAP-2は、細胞をインターロイキン-1もしくは腫瘍壊死因子で刺激するかまたは細胞ストレスに曝したときに活性化される (Rouseら, 1994)。MAPKAP-2はまた、in vitroでErksによってリン酸化及び活性化される。しかし

ながら細胞中ではMAPKAP-2はp38MAPKによって支配的に調節されている。炎症応答中には、TNF- α 及びIL- β がp38を活性化し、これはTNF及びIL-1の産生増加を起動する。TNF及びIL-1は次に炎症応答を増幅する。このプロセスは敗血症ショック及びアテローム性動脈硬化巣の形成に1つの役割を果たすと考えられている。

【0021】

最近の文献を考察すると、p38キナーゼ及びMAPKAP-2キナーゼ経路が化学的、機械的及びプロ炎症性襲撃に対する細胞の応答における中心成分であるという考え方がほぼ定説になっている。

【0022】

例えば、ERK、JNK及びp38経路がIL-2産生に強いつながりをもつ明らかな証拠が示された。IL-2遺伝子の転写及びT細胞増殖に導く十分なTリンパ球活性化にはp38の活性化が必要であることは明白に確認された。従って、選択的キナーゼ阻害によるシグナル伝達プロセスの遮断がIL-2産生及びTリンパ球増殖を抑制すると予測され、これらは、リウマチ様関節炎、クローン病及び炎症性腸疾患を非限定例とする慢性炎症疾患の治療に有効であろう。

【0023】

本文に記載のMAPKAP-2キナーゼ（配列番号2）は、プロ炎症性遺伝子産物の活性化に導くストレス関連刺激に対する細胞応答を伝達すると考えられている。サイトカインのような炎症メディエータの有害作用が独創的な抗炎症療法の開発に新しい道を開く。MAPK及びMAPKAP-2は、ストレスに対する細胞応答を仲介するシグナル伝達イベントで中心的な役割を果たすので、これらの不活性化またはこれらに対する拮抗作用は応答を減衰させるために極めて重要である。

【0024】

従って、MAPKAP-2も含めたMAPK類は、リウマチ様関節炎（RA）、クローン病、炎症性腸疾患、骨関節炎（OA）及び多発性硬化症（MS）に限定される訳ではないが、これらを含む自己免疫疾患の病理に極めて重要な役割を果たしているとして予測される。

【0025】

従って、本文に記載の新規なヒトのセリン／トレオニンシグナル伝達キナーゼ（配列番号2）及び該キナーゼをコードする核酸配列、例えば配列番号1は、機能不全のTリンパ球を非限定例とする機能不全の白血球をコントロールするため、リウマチ様関節炎（RA）、クローン病、炎症性腸疾患、骨関節炎（OA）及び自己免疫疾患を治療するため、急性及び慢性の炎症並びに機能不全の天然型MAPKAP-2キナーゼによって発症する別の疾病を研究、診断及び治療するために診断用及び治療用に使用できる特異的ターゲットとして有意な潜在能力を有している。

【0026】

実際、本文に記載のヒトMAPKAP-2シグナル伝達セリン／トレオニンキナーゼをモジュレーターとして使用する潜在的な診断用及び治療用の用途は容易に明らかになるであろう。治療的な介入を特に必要とする疾病の共通分野の非限定例は、機能不全の白血球、T細胞活性化によって発症する病態生理的障害、急性及び慢性の炎症性疾患、例えば、リウマチ様関節炎（RA）、クローン病、炎症性腸疾患、自己免疫疾患、骨関節炎、移植拒絶、マクロファージ調節、アテローム性動脈硬化症、線維芽細胞調節、病的線維症、喘息、アレルギー反応、アテローム、骨関節炎、敗血症、神経変性及び関連疾患などである。

【0027】

特異的サイトゾル経路に組み込まれる（1つまたは複数の）特異的シグナル伝達ポリペプチドを調節または不活性化する化合物は一般に、下流の生理的応答を調節または減衰させる有意な潜在能力を有しているであろう。従って、本文中に記載のような天然型または組換えヒトMAPKAP-2キナーゼの活性を調節する化合物をスクリーニングできること

10

20

30

40

50

は、治療薬の開発にとって最も重要である。従って、出願人らは、ターゲットに基づく薬物設計プログラムに役立つようなヒトMAPKAP-2キナーゼをクローニングすることを試みた。

【0028】

出願人らはここに、本文に記載の新規なヒトセリン／トレオニンシグナル伝達キナーゼの発現クローニングによる単離を報告する。出願人らは、新規なキナーゼをコードする新しく発見された単離核酸分子はMAPKAP-2キナーゼが関与する欠陥シグナル伝達経路に付随する種々の障害を治療するために有効な治療薬候補の開発を可能にすると信じている。

【0029】

本発明の新規なキナーゼは公知のMAPKAP-2に比べて1つまたは複数の塩基に接触するアミノ酸残基が異なっている配列を有しているか、または、公知のMAPKAP-2キナーゼの配列とは異なっており従って公知の配列から識別できるヌクレオチド塩基配列を有している。 10

【0030】

(発明の開示)

本発明は新規に同定された酵素MAPKAP-2を開示する。この酵素は、特にErks及びp38 MAPKによってin vitroでリン酸化及び活性化されるセリン／トレオニンシグナル伝達キナーゼである。

【0031】

より特定のには本発明は、MAPKAP-2キナーゼをコードする核酸分子、組換え核酸分子、組換え核酸分子を含有する細胞、アンチセンスMAPKAP-2核酸構築物、このようなタンパク質に対して誘発された抗体、該抗体を含有するハイブリドーマ、MAPKAP-2核酸を検出する核酸プローブ、サンプル中のMAPKAP-2核酸またはポリペプチドの検出方法、核酸プローブまたは抗体を含むキット、MAPKAP-2またはそのフラグメントに結合し得る化合物の(1つまたは複数の)検出方法、MAPKAP-2活性のアゴニストまたはアンタゴニストの検出方法、哺乳類の体内でMAPKAP-2関連活性を刺激または抑制する方法、哺乳類体内の(1つまたは複数の)MAPKAP-2キナーゼの正常に比べて過多または過少の発現に付随する病的状態を開示ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストによって治療する方法、MAPKAP-2アゴニストまたはアンタゴニストを含む医薬組成物に関する。 20 30

【0032】

キナーゼをコードする単離核酸分子は好ましくは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を含む。

【0033】

本発明の別の目的は、配列番号1で表される核酸配列と緊縮条件下でハイブリダイズし得る核酸分子を含み、該核酸分子が発現ベクターに作動可能に連結されている組換え分子を提供することである。

【0034】

配列番号1で表される配列を含むポリペプチドの相補配列を含む(1つまたは複数の)アンチセンス分子も提供される。より特定のには本発明の目的は、配列番号1の核酸コーディング領域の転写／翻訳を調節する能力を有しているアンチセンス分子に及ぶ。 40

【0035】

ヒトのMAPKAP-2キナーゼの生物活性を調節する化合物を同定する方法も提供される。

【0036】

配列番号1で表されるヌクレオチド配列を有しているポリヌクレオチドの対立遺伝子変異体も提供される。

【0037】

本発明は更に、組換え宿主細胞内で本発明のシグナル伝達キナーゼを発現させる発現ベクターを目的とする。該ベクターは、実質的に配列番号2で表されるアミノ酸配列を有して 50

いるキナーゼまたはその薬理学的及び／または生物学的に活性のもしくは生物学的に有効な誘導体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含有する。

【0038】

本発明は更に、配列番号1に由来のアンチセンス核酸配列を含む生物学的に有効な核酸分子を発現させる発現ベクターを目的とする。該核酸分子は、本発明のシグナル伝達ポリペプチドの核酸コーディング領域の転写／翻訳を調節する能力を有している。

【0039】

MAPKAP-2キナーゼをコードしている上述のDNA、mRNAまたはプラスミドを含有するに組換え細胞も本発明で提供される。

【0040】

実際、本発明の1つの目的は、シグナル伝達ポリペプチドを発現させる発現ベクターを含有する宿主細胞を提供することである。該ベクターは実質的に配列番号2で表されるアミノ酸配列を有しているシグナル伝達ポリペプチドまたはその薬理学的及び／または生物学的に活性のもしくは生物学的に有効な誘導体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を含有する。

【0041】

本発明のまた別の目的は、本文に開示されたポリヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズすべく十分な長さの核酸分子を含む核酸プローブに及ぶ。本発明の核酸プローブによって遺伝子工学業界の平均的な当業者は任意の種から同様のポリペプチドを同定及びクローニングすることができ、これによって本発明の配列の用途を拡大し得る。

【0042】

本発明はまた、配列番号1に由来の単離及び精製された核酸分子を目的とする。核酸分子は、実質的に配列番号2で表される生物学的に有効なドミナントネガティブ突然変異ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、本発明のMAPKAP-2キナーゼの生物活性及び／または薬理活性を調節する能力を有している。

【0043】

新しく開示された種類のタンパク質セリン／トレオニンキナーゼは、細胞の表面の受容体から開始されたシグナルを調節することができ、その調節能力はこの種類のキナーゼによるMAPK-依存性経路の活性化に依存している。本文で開示されたポリペプチドは配列番号2で表されるアミノ酸配列をコードする核酸分子と緊縮条件下でハイブリダイズし得る核酸配列によってコードされたアミノ酸配列の少なくとも一部分を含んでいる。

【0044】

本発明の別の目的は、実質的に配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む精製ポリペプチドを提供することである。生物学的に活性のそのフラグメントも包含される。

【0045】

本発明の別の目的は、シグナル伝達経路のシグナル伝達ポリペプチド、特に開示されたMAPKAP-2キナーゼの活性と特異的に相互作用し該活性を調節する潜在的に薬理学的有効性をもつ化合物のスクリーニング及び定量的キャラクタリゼーションを行う（1つまたは複数の）アッセイを提供することである。

【0046】

本発明は更に、シグナル伝達分子の生物活性及び／または薬理活性を調節する化合物の同定方法であって、

- (a) シグナル伝達活性を調節すると推測される候補化合物と配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドとを組合せる段階と、
- (b) ポリペプチドの生物活性及び／または薬理活性に対する候補化合物のモジュレーター効果を測定する段階とから成る方法を提供する。

【0047】

本発明は更に、シグナル伝達分子の生物活性及び／または薬理活性を調節する化合物の同定方法であって、

- (a) シグナル伝達活性のモジュレーター候補化合物と配列番号2で表されるアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を有するポリペプチドを発現する宿主細胞とを組合せる段階と、

(b) ポリペプチドに付随する生物活性及び／または薬理活性に対する候補化合物のモジュレーター効果を測定する段階とから成る方法を提供する。このような測定は、ポリペプチドのレベルまたは活性の変化を検出する段階を含む。

【0048】

本発明はまた、上記方法のいずれか1つによって同定された化合物を目的とする。該化合物は、MAPKAP-2キナーゼの生物活性及び／または薬理活性、即ちキナーゼ活性を調節する。

【0049】

更に本発明は、上記方法のいずれか1つによって同定された化合物を含み、該化合物がMAPKAP-2キナーゼの生物活性及び／または薬理活性を調節するような医薬組成物を目的とする。 10

【0050】

機能不全のシグナル伝達経路によって発症する疾病状態の(1つまたは複数の)治療方法も提供される。1つのこのような方法は、化合物がMAPKAP-2キナーゼの生物活性及び／または薬理活性を調節することが上記方法のいずれか1つによって同定された化合物を有効量で投与するか、または、実質的に配列番号2で表される生物学的に有効なドミナントネガティブ突然変異体またはその機能性誘導体を有効量で投与することから成る。

【0051】

代替的な実施態様は、欠陥シグナル伝達分子によって仲介される病態生理状態の治療を要する患者の治療方法に及ぶ。該方法は、配列番号1に由来の生物学的に有効なアンチセンス核酸分子を有効量で投与するか、または、実質的に配列番号2で表される生物学的に有効なドミナントネガティブ突然変異体またはその機能性誘導体をコードする核酸を有効量で投与することから成る。 20

【0052】

本発明の更に別の目的によれば、実質的に配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むシグナル伝達ポリペプチドに特異的な抗体、実質的に配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド配列を同定するための診断用組成物が提供される。

【0053】

本発明はまた、配列番号1に由来のPCRプライマー、及び、実質的に配列番号1で表される核酸分子の作製方法を目的とする。 30

【0054】

MAPKAP-2キナーゼポリペプチドをコードするゲノムDNA、cDNAまたはmRNAを含有するプラスミドも提供される。

【0055】

本発明の別の特徴によれば、組換え技術によって本発明のシグナル伝達キナーゼを産生させる方法が提供される。該方法は、本発明のMAPKAP-2キナーゼをコードする核酸配列を含有している原核性及び／または真核性の形質転換宿主細胞を(1つまたは複数の)キナーゼポリペプチドの発現を促進する条件下で培養する段階と、次いで(1つまたは複数の)ポリペプチドを回収する段階とから成る。 40

【0056】

別の目的によれば、本発明は、本発明のMAPKAP-2キナーゼの発現レベルを調節し、これによって本文に開示された新規なキナーゼに直接または間接に関係付けられる障害を治療的及び／または予防的に治療する手段を提供する。

【0057】

また、医薬的に許容される担体中に、(a)本発明のMAPKAP-2キナーゼ、(b)免疫学的に活性または生物学的に活性のそのフラグメント、または、(c)上記の(a)または(b)に親和性を有している抗体を含む治療用組成物も本発明に包含される。これらの治療用組成物は、発現もしくは活性の異常(低下または過剰)レベルまたは実質的に配列番号2で表されるアミノ酸配列を有している欠陥シグナル伝達ポリペプチドを特徴と 50

する種々の障害の治療手段を提供する。

【0058】

本発明のシグナル伝達キナーゼが得られたことに基づいて、天然型または組換えMAPKAP-2キナーゼと（1つまたは複数の）その結合相手、即ち、いずれもMAPKAP-2をリン酸化することが公知のERKまたはp38のような上流キナーゼ、または、活性化MAPKAP-2によってリン酸化されるHsp-27もしくはHsp-25のような下流のターゲット基質との相互作用を刺激または阻害するアゴニストまたはアンタゴニストを同定し得る。実質的に配列番号2で表されるアミノ酸配列を有しているMAPKAP-2キナーゼを発現する細胞の代謝及び反応性はアゴニストまたはアンタゴニストによってコントロールされ、これによって問題の疾病を軽減しまたはいくつかの場合には予防する手段を提供する。 10

【0059】

上記に従って、MAPKAP-2に結合しMAPKAP-2を活性化するか（アゴニスト）または活性化を阻害する（アンタゴニスト）化合物のスクリーニング方法が提供される。実際、様々な潜在的アゴニストまたはアンタゴニストによって本文に開示されたキナーゼを試験すると、キナーゼの機能及び活性に関する追加の情報が提供されるであろう。このような情報から、本文に開示されたシグナル伝達キナーゼと極めて特異的に相互作用し得る化合物の同定に到達し得る。このような特異性は医学的用途で極めて価値が高いことが判明している。このようなアッセイは、MAPKAP-2キナーゼに結合しこれによってキナーゼとその結合相手との相互作用をブロックまたは阻害する化合物を同定するように設計し得る。別のアッセイは、MAPKAP-2に仲介される細胞内経路を刺激し得る化合物を同定するように設計できる。 20

【0060】

本文に開示されたヒトMAPKAP-2キナーゼのアゴニストまたはアンタゴニストの検出方法は、MAPKAP-2を産生する細胞を1つの化合物の存在下でインキュベートする段階と、MAPKAP-2キナーゼの活性レベルの変化を検出する段階とから成る。

【0061】

本発明の別の目的は、MAPKAP-2関連キナーゼ活性を変化させるに十分な量のMAPKAP-2アゴニストまたはアンタゴニストと医薬的に許容される希釈剤、担体もしくは賦形剤とから成る医薬組成物に及ぶ。 30

【0062】

本発明のまた別の目的によれば、新規な本発明ポリペプチドをコードする核酸配列中の突然変異に関係した疾病を検出するため、及び、コードされたポリペプチドのレベル変化を検出するための診断用アッセイが提供される。

【0063】

また、本文に開示されたMAPKAP-2キナーゼを様々な潜在的アゴニストまたはアンタゴニストで試験すると、MAPKAP-2キナーゼの機能及び活性に関する追加情報が提供され、天然型MAPKAP-2との極めて特異的な相互作用またはその結合相手との相互作用を生じ得る化合物の同定及び設計に到達し得る。

【0064】

本文に開示された新規な核酸、これらの核酸によってコードされているポリペプチド、本発明で提供されるベクター及び細胞は、MAPKAP-2キナーゼ、該キナーゼに対する抗体、及び、該抗体に対する抗体を産生し得る。これによって、その存在が本発明ポリペプチドだけの分析を妨害し得る他の多くの夾雑タンパク質を実質的に含有しない合成または組換えキナーゼポリペプチドタンパク質の製造手段が提供される。新規なMAPKAP-2を利用できれば、MAPKAP-2キナーゼに対する薬物の効果を観察することができ、これによって本文に開示されたMAPKAP-2キナーゼまたはその天然型及びその対応結合相手に特異的な薬物の初期*in vitro*スクリーニングを1つの試験系で行うことが可能になる。 40

【0065】

更に、欠陥シグナル伝達経路、特に実質的に配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する（1つまたは複数の）欠陥シグナル伝達ポリペプチドが担当する欠陥シグナル伝達経路によって仲介される疾病を検出するための診断用アッセイも提供される。

【0066】

また、本発明の特異的抗体を入手できれば、MAPKAP-キナーゼ及びその対応リガンド（例えば、正常vs疾患脳組織）の分布及び発現密度をモニターするために免疫組織化学の技術を応用することが可能になる。このような抗体はまた、診断及び治療の用途に使用できよう。この抗体は好ましくは、ポリペプチドの生物活性（即ち、アデニル酸シクラーゼ活性化）を中和し得る。

【0067】

従って、本発明のキナーゼと共に免疫複合体を形成し得る抗体の精製調製物も含めたこのような抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）は、ポリペプチドまたはそのフラグメントを抗原として使用することによって産生させ得る。

【0068】

その結果として、本発明の1つの目的は、細胞内シグナルで調節された実質的に純粋なキナーゼを提供することである。該タンパク質は配列番号2で表されるアミノ酸配列を有しているヒトキナーゼポリペプチドに選択的に結合し得る抗体を使用して単離される。

【0069】

本発明の別の目的は、MAPK依存性経路の少なくとも1つの酵素によってリン酸化されるポリペプチドに選択的に結合し得る単離抗体に関する。該抗体は、実質的に純粋な本発明のタンパク質を有効量で動物に投与する段階とタンパク質に選択的に結合し得る抗体を回収する段階とを含む方法によって得ることができる。

【0070】

本発明のまた別の目的によれば、本発明のシグナル伝達キナーゼまたは（1つまたは複数の）このようなキナーゼをコードする核酸分子をDNAの合成、DNAベクターの作製、キナーゼアッセイなどのようなin vitro目的に利用する方法が提供される。

【0071】

更に、薬剤開発及び種々の疾病状態の治癒的治療に関しては、本発明のMAPKAP-2キナーゼをコードするポリヌクレオチドを入手できれば、このような遺伝子中で幾つかの疾病状態の発症に相関関係を有し得る改変（たとえば変異）を同定することが可能になる。更に、このような突然変異を合成DNA配列に特異的に導入し、次いでその効果を判定するために該合成DNAを実験動物またはin vitroアッセイ系に導入することによってこのような疾病状態の動物モデルの作製が可能になる。

【0072】

これらの目的及びその他の目的の少なくとも幾つかは本文に開示された種々の実施態様において取り扱う。本発明のその他の特徴及び利点は明細書及び特許請求の範囲を更に読み込むことによって当業者に明らかになるであろう。

【0073】

本文及び特許請求の範囲に使用された不定冠詞及び定冠詞を付けて単数形で表された用語は、複数形を含まないことが文脈から明らかでないときは複数形を含意する。従って、例えば、“1つの宿主細胞”という表現は複数のこのような宿主細胞を含意する。また“抗体”という表現は1つまたは複数の抗体及び当業者に公知のその等価物を含意する。その他に関しても同様である。

【0074】

以下の（1つまたは複数の）定義及び（1つまたは複数の）記載は、末端欠損MAPKAP-2をコードする（1つまたは複数の）ポリヌクレオチド及びコードされた（1つまたは複数の）タンパク質（それぞれ配列番号1及び2）を対象としているが、これらの定義及び記載が全長クローン（配列番号3及び4）にも同様に通用することは理解されよう。

【0075】

異なる定義がない限り、本文中で使用したすべての技術的及び科学的用語は本発明が属す

10

20

30

40

50

る分野の平均的な当業者が普通に理解する意味と同義である。本文中に記載の方法及び材料と同様または等価の任意の方法及び材料を本発明の実施または試験に使用することはできるが、好ましい方法、装置及び材料を以下に記載する。

【0076】

刊行物に報告されている本発明に使用できるような手順、ベクターなどを記載し開示する目的で本文に引用したすべての刊行物は参照によって本発明に含まれるものとする。本発明は先行発明に基づいたこのような開示に先行する権利がないことを認めたと解釈できる表現は本文中に全く存在しない。

【0077】

以下の記載中、組換えDNA技術の分野で使用される多くの用語が多く使用されている。これらの用語に与えるべき範囲も含めて、明細書及び特許請求の範囲がより明白にかつ確実に理解できるように、これらの用語を以下に定義する。 10

【0078】

“遺伝子”という用語は、そのヌクレオチド配列がポリペプチド分子をコードしている核酸分子を意味する。遺伝子は割り込みのないヌクレオチド配列でもよく、または、イントロン、プロモーター領域、スプライシング部位及び反復配列のような介在セグメントを含んでいてもよい。遺伝子はRNAでもよくまたはDNAでもよい。好ましい遺伝子は、本発明のMAPKAP-2キナーゼをコードする遺伝子である。

【0079】

本発明の明細書及び特許請求の範囲でDNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質の修飾語として“単離された”及び／または“精製された”という用語が使用されているとき、このように呼ばれるDNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質がヒトの手によってこのような形態で製造され、従ってそれらの天然の*in vivo*細胞環境から離れていることを意味する。このヒトによる介入の結果として、本発明の組換えDNA、RNA、ポリペプチド及びタンパク質は、天然に生じるときのDNA、RNA、ポリペプチド及びタンパク質には使用できないような本文中に記載の方法で使用する。 20

【0080】

同様に、DNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質の修飾語として本文中に使用された“組換え”という用語は、このように呼ばれるDNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質が人間の力、例えば、クローニング、組換え発現などによって作製されたことを意味する。従って、例えば本文中で使用された組換えタンパク質という用語は、人間の力によって宿主に加えられたDNAを発現する組換え宿主によって産生されたタンパク質を意味する。 30

【0081】

本文中で使用された“挿入”または“付加”という用語はそれぞれ、天然に生じる分子に比較して1つまたは複数のアミノ酸残基またはヌクレオチド残基が付加されるようなアミノ酸配列またはヌクレオチド配列の変化を意味する。

【0082】

本文中で使用された“置換”という用語は、1つまたは複数のアミノ酸またはヌクレオチドがそれぞれ別のアミノ酸またはヌクレオチドによって置換されることを意味する。 40

【0083】

“シグナル伝達障害”という用語は、シグナル伝達経路の異常に関連する疾患または状態を意味する。このような異常は、欠陥MAPKAP-2キナーゼの存在、または、その天然型の上流プロテインキナーゼ即ち哺乳類ERKもしくはp38による不適正なリン酸化、または、MAPKAP-2キナーゼの低レベル発現もしくは遍在レベル発現の結果として生じ得る。あるいは、活性化ERKもしくはp38が内因性MAPKAP-2キナーゼと有効に相互作用せず、そのためシグナル伝達経路に異常が生じることもある。また、それらの間の相互作用、または、MAPKAP-2とその天然型結合相手のいずれかとの間の相互作用のレベルが正常であっても、相互作用がシグナル伝達経路障害を有効に治療できないこともある。 50

【0084】

“障害”という用語は、MAPKAP-2キナーゼまたはこのようなキナーゼをコードする核酸で治療することによって好転する任意の状態を意味する。この用語は、問題の障害に対する哺乳類の疾病素質のような病理的条件も含めた慢性及び急性の障害または疾病を含意する。障害の非限定例は、心血管系障害、神経系障害及び疼痛知覚障害などである。

【0085】

“異常”または“異常な”という用語は、このような疾病または状態に罹っていない生物で観察されるレベルとは統計的に異なるレベルを意味しており、シグナルの過剰な量、強度もしくは持続時間またはシグナルの不十分な量、強度もしくは持続時間を特徴とする。シグナル伝達異常は、細胞の機能、生存率または分化状態の異常として現れる。また異常な相互作用レベルは正常レベルよりも高いことも低いこともあり、生物の正常な性能または機能を損なうであろう。

10

【0086】

“シグナル伝達経路”という用語は、細胞外タンパク質受容体から細胞膜を介して細胞質に与えられるメッセージの伝達に関与する一連のイベントを意味する。シグナルは最終的に細胞に特定の機能を実行させ、例えばコントロール不能な増殖を生じさせ、これによってガンを引き起こす。シグナル伝達経路の種々のメカニズム (Fryら, Protein Science, 2:1785-1797, 1993) は、所与のシグナルの量または強度を測定し得る方法を提供する。シグナル伝達経路の異常に関連する特定の疾病次第では、種々の症状を検出し得る。当業者は本文中に記載された様々な別の疾病に付随する症状を認識できる。更に、幾つかのアダプター分子は膜に向かう第二のシグナル伝達タンパク質を補充するので、種々のタンパク質及び複合体の濃度及び局在性もシグナル伝達の1つの測定手段となる。更に、円二色性及び蛍光試験を使用してシグナルの伝達に関与するコンホメーション変化を観察し得る。

20

【0087】

本文中で使用された“アゴニスト”という用語は、MAPKAP-2生物活性を模倣するかまたは正の調節を行う（例えば増強または補充する）薬剤を意味する。MAPKAP-2アゴニストは野生型MAPKAP-2タンパク質または野生型MAPKAP-2の少なくとも1つの生物活性をもつその誘導体でよい。MAPKAP-2治療薬はまた、MAPKAP-2遺伝子の発現の正の調節を行うかまたはMAPKAP-2タンパク質の少なくとも1つの生物活性を増加させる化合物でもよい。アゴニストはまた、MAPKAP-2キナーゼと別の分子、例えばその基質との相互作用を増加させる化合物でもよい。あるいは、“アゴニスト”が、MAPKAP-2タンパク質に結合したときにMAPKAP-2の効果を増加させるかまたは効果の持続期間を延長させる分子を指してもよい。

30

【0088】

本文中で使用された“アンタゴニスト”という用語は、少なくとも1つのMAPKAP-2生物活性の負の調節を行う（例えば抑制または阻害する）薬剤を意味する。MAPKAP-2アンタゴニストは、MAPKAP-2キナーゼと別の分子、例えば下流のターゲット分子との相互作用を阻害または抑制する化合物でもよい。従って、好ましいアンタゴニストは、MAPKAP-2がその上流キナーゼ、例えば、MAPKAP-2を活性化するMAPK酵素またはMAPKAP-2によって活性化される下流ターゲット基質に結合することを阻害または抑制する化合物である。アンタゴニストはまた、MAPKAP-2遺伝子の発現の負の調節を行うかまたはMAPKAP-2タンパク質の存在量を減少させる化合物でもよい。MAPKAP-2アンタゴニストはドミナントネガティブ形態のMAPKAP-2キナーゼ、例えば、MAPKAP-2転写因子によって調節されるが転写を調節できない遺伝子上流領域と相互作用し得るMAPKAP-2キナーゼの形態でもよい。MAPKAP-2アンタゴニストはまた、ドミナントネガティブ形態のMAPKAP-2キナーゼ、MAPKAP-2アンチセンス核酸、または、MAPKAP-2 RNAと特異的に相互作用し得るリボザイムであってもよい。また別のMAPKAP-2アンタゴニストはMAPKAP-2キナーゼに結合しその作用を阻害する分子である。このような

40

50

分子にはペプチド、抗体及び小分子がある。

【0089】

本文中で使用された“ドミナントネガティブ突然変異体”という用語は、対応する野生型天然形態に対して配列中の少なくとも1つの位置に関する変化、好ましくは天然型ペプチド中の生物活性及び／または薬理活性に必要な活性部位のアミノ酸残基位置を変化させる位置に変化が生じ、これによって突然変異ペプチドをコードするようになった核酸コーディング領域配列を意味する。本文中で使用されたドミナントネガティブ突然変異体はまた、突然変異ペプチドに対しても同様の意味で使用し得る。

【0090】

従って、“ドミナントネガティブ突然変異タンパク質”という用語は、正常なシグナル伝達経路を妨害する突然変異タンパク質を意味する。ドミナントネガティブ突然変異タンパク質は、該当ドメイン（例えば、MAPKAP-2キナーゼまたはNBP）を含んでいるが、例えば同じタンパク質の第二ドメインの結合を妨害することによって適正なシグナル伝達を妨害する突然変異を有している。ドミナントネガティブタンパク質の一例はMillerら, Nature Feb. 10, 1994に記載されている。記載された薬剤は好ましくは、実質的に配列番号2で表される配列を有しているシグナル伝達キナーゼとNBPとの相互作用をブロックまたは促進するペプチドである。ペプチドは組換えペプチドでも精製ペプチドでもよく、または、医薬的に許容される担体もしくは希釈剤中に配置されてもよい。

10

【0091】

本文中に使用された“調節”という用語は、実質的に配列番号2で表される配列を有しているシグナル伝達分子の生物活性及び／または薬理活性を増進または阻害する能力、または、本発明核酸の核酸コーディング領域の機能的特性を増進または阻害する能力を意味する。本文中で使用された“調節する”という用語はまた、MAPKAP-2キナーゼの生物活性の変化または変質を意味する。

20

【0092】

調節は、MAPKAP-2キナーゼのタンパク質活性の増加もしくは減少でもよく、結合特性の変化、または、生物的、機能的もしくは免疫的特性の何らかの別の変化でもよい。

【0093】

アンチセンス核酸分子及びドミナントネガティブ突然変異核酸コーディング領域及びドミナントネガティブ突然変異ペプチドに関して本文中で使用された“生物学的に有効な”という用語は、本発明の新規なシグナル伝達タンパク質キナーゼの生物活性及び／または薬理活性及び／または本発明の新規なシグナル伝達タンパク質キナーゼの核酸コーディング領域の転写／翻訳を調節するこれらの分子の能力を意味する。

30

【0094】

本文に開示された新規な核酸分子またはポリペプチドについて本文中で使用された“機能性誘導体”という用語は、本文中に定義したような機能的な生物活性及び／または薬理活性を有しており配列番号1または配列番号2に由来する統一体、例えば、末端欠損形態、欠失を有する形態、機能性フラグメント、置換を有する形態、挿入もしくは延長末端を有する形態、または、生物学的に有効なドミナントネガティブ突然変異体、または、生物学的に有効なアンチセンス分子を意味する。

40

【0095】

本文中で使用された“直接投与”という用語は、本発明の実施態様及び／または機能性誘導体（例えば配列番号1または2）を含む核酸分子、ペプチドまたは化合物の直接投与を意味する。直接投与の非限定例は遺伝子治療である。

【0096】

本文中で使用された“抗体”という用語は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖及びヒト化した抗体、並びに、Fabもしくはその他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産生物を含むFabフラグメントを包含する。

【0097】

50

本文中で使用された“許容される担体”という用語は、リン酸塩緩衝生理食塩水、水、水中油型もしくは油中水型エマルジョン、様々な種類の湿潤剤のような標準的医薬担体のいずれをも包含する。

【0098】

本発明の核酸、オリゴヌクレオチド（アンチセンスを含む）、これらを含むベクター、形質転換宿主細胞、ポリペプチド及びその組合せ、並びに、本発明の抗体は、化合物が本発明のMAPKAP-2キナーゼの潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストとして機能し得るか否かについて判定するための化合物の *in vitro* スクリーニングに使用できる。

【0099】

従って、（1つまたは複数の）MAPKAP-2キナーゼポリペプチドに結合する化合物の同定方法も本発明によって考察される。本発明の（1つまたは複数の）キナーゼは競合的結合アッセイに使用できる。このようなアッセイは、どの化合物が本発明の（1つまたは複数の）キナーゼに結合できるか否かを判定するための多くの化合物の高速スクリーニングに適している。結合することが判明した化合物については、このような化合物が本発明の（1つまたは複数の）キナーゼポリペプチドのモジュレーター、アゴニストまたはアンタゴニストのいずれの作用を行うかを判断するために引き続いてより詳細なアッセイを行うことができる。

【0100】

当業者には理解されるであろうが、本発明のMAPKAP-2キナーゼのキナーゼ活性を調節する化合物を同定するアッセイ方法では一般に対照との比較が必要である。1つの種類の“対照”は、“対照”細胞または培養物を化合物に接触させないこと以外は、化合物に接触させる被験細胞または被験培養物と実質的に同じ処理を受ける細胞または細胞培養物を意味する。例えば、電圧クランプ電気生理的手順を使用する方法では、細胞を浸漬させる外部溶液を変えるだけで同じ細胞を化合物の存在下または非存在下で試験できる。別の種類の“対照”細胞または培養物は、“対照”細胞または培養物が本発明のポリペプチドを発現しないこと以外は、形質転換細胞に等しい細胞または培養物でもよい。従って、化合物に対する形質転換細胞の応答を同じ反応条件下の同じ化合物に対する“対照”細胞または培養物の応答（または応答の欠如）に比較する。

【0101】

本発明のまた別の実施態様では、MAPKAP-2キナーゼの活性化を、上述のバイオアッセイによって同定された少なくとも1つの有効量の化合物（アゴニストまたはアンタゴニスト）にキナーゼを接触させることによって調節できる。

【0102】

本発明の別の実施態様によれば、異常なシグナル伝達を特徴とする疾病状態を診断する方法が提供される。例えば、機能不全のシグナル伝達を特徴とする病的障害に罹っている患者からサンプルを採取し、配列番号1で表されるヌクレオチド配列に実質的に相同のヌクレオチド配列を有している核酸プローブに接触させる。サンプル中に存在する何らかの相補mRNAに対するプローブの結合を測定し、患者体内のこのような病的障害の退縮、進行または発症の指標とする。

【0103】

あるいは、本発明の核酸分子の遺伝子産物に特異的な検出可能プローブに患者のサンプルを、プローブ／遺伝子産物複合体の形成に有利な条件下で接触させることもできる。複合体の存在が患者体内の病的障害の退縮、進行または発症の指標となる。

【0104】

本発明の別の実施態様によれば、適当な包装材料中に少なくとも1つの本発明の核酸を含む好ましくはキット形態の診断用システムが提供される。診断用核酸は本文中に記載のキナーゼコーディング核酸に由来する。例えば1つの実施態様では診断用核酸が配列番号1に由来する。本文に開示した診断用システムは、ゲノムDNAまたは被転写核酸（例えばmRNAまたはcDNA）中でMAPKAP-2キナーゼをコードする核酸の有無を検定

10

20

30

40

50

するアッセイに有用である。

【0105】

適当な診断用システムは少なくとも1つのアッセイに十分な量の少なくとも1つの本発明の核酸を含むか、または好ましくは2つ以上の発明の核酸を個別に包装された（1つまたは複数の）化学試薬として含む。典型的には、包装された試薬の使用説明書も添付されている。本発明の核酸プローブ及び／またはプライマーを本文に記載の本発明方法を実施するための適当なバッファ及び溶液と組合せたキット形態に組込むことは当業者には容易であろう。

【0106】

本文中に使用された“プロテインキナーゼ”という用語は、それ自体のリン酸化状態または別のタンパク質もしくはポリペプチドのリン酸化状態を調節し得るタンパク質またはポリペプチドを含意する。プロテインキナーゼは、セリン／トレオニン残基、チロシン残基、または、デュアル特異性キナーゼのようにセリン／トレオニン残基とチロシン残基との双方に特異性（即ち、リン酸化特異性）を有し得る。

10

【0107】

本文中で使用された“マイトジェン活性化プロテインキナーゼ”または“MAPK”という用語は、別のタンパク質をリン酸化及び活性化するという特徴的な活性を有しているプロテインキナーゼを意味しており、その非限定例は、MAPKAP-2である。MAPKの例は、p38 MAPキナーゼ、JNK及びERKである。これらは一般にデュアル特異性キナーゼである。

20

【0108】

“治療”という用語は、治癒的治療と予防的または防止的措置との双方を意味する。治療を要する者という用語は、既に障害を生じている者及び障害が生じ易い者または障害を予防する必要がある者の双方を意味する。

【0109】

“スクリーニング”という用語は、生物について1つの特性の有無を検査することを意味する。そのプロセスは、シグナル伝達レベル及び組換えもしくは天然産生のMAPKAP-2キナーゼとその天然の結合相手（NBP）／基質との間の相互作用レベルのような種々の特性の測定または検出を含む。

【0110】

“NBP”という用語は、ポリペプチドに天然に会合するMAPKAP-2キナーゼの天然の結合相手を意味する。特定の天然結合相手の構造（一次、二次または三次）はMAPKAP-2キナーゼと天然の結合相手との間の特定タイプの相互作用に影響を及ぼすであろう。例えば、天然の結合相手がMAPKAP-2キナーゼに相補的なアミノ酸配列を含むとき、可能な相互作用は共有結合であろう。同様に、別の構造的特徴は対応する別の相互作用を可能にするであろう。相互作用は特定の残基に限定されないが、具体的にはホスホチロシン、ホスホセリンまたはホスホトレオニン残基が関与するであろう。広範囲の配列がMAPKAP-2キナーゼと相互作用できる。当業界で公知の技術を使用してMAPKAP-2キナーゼの複数の天然結合相手を同定し得る。NBPはまた、天然及び合成のMAPKAP-2基質を包含する。本発明のまた別の目的は、シグナル伝達経路の異常を特徴とする疾病または状態を有する生物の治療方法を提供することである。

30

40

【0111】

好ましい実施態様では、診断または治療される疾病または状態が上述のような疾病または状態であり、薬剤は、遺伝子治療または後述する等価の別の方法によって提供されるドミナントネガティブ突然変異タンパク質であり、薬剤は治療的に有効であり、後述するようなEC₅₀またはIC₅₀を有している。

【0112】

100 μM以下のEC₅₀またはIC₅₀が好ましく、50 μM以下がより好ましく、20 μM以下が最も好ましい。このような低いEC₅₀またはIC₅₀の利点は、低濃度の分子を治療または診断のためにin vivoまたはin vitroで使用できること

50

である。このような低い EC_{50} または IC_{50} をもつ分子の発見によって、同様の力価及び有効性を有している追加の分子を設計及び合成することが可能になった。更に、筋肉細胞では分子が $100 \mu M$ 以下の EC_{50} または IC_{50} を有し得る。

【0113】

“治療有効量”という用語は、治療的に適正な効果を有している医薬組成物の量を意味する。治療的に適正な効果は、患者の疾病もしくは状態の1つまたは複数の症状をある程度まで軽減するか、または、疾病もしくは状態に付随するかもしくは原因となる1つまたは複数の生理的もしくは生化学的パラメーターを部分的もしくは全面的に正常に戻す。一般に、治療有効量は、 EC_{50} または IC_{50} 、患者の年齢と体格、患者に付随する疾病次第で分子が約1ナノモルと1 μ モルとの間である。

10

【0114】

本発明はまた、細胞中のMAPK依存性経路の活性を調節し得る治療用化合物を包含する。該化合物は、(a)細胞を推定調節分子に接触させる段階と、(b)MAPK依存性経路の少なくとも1つの構成要素に特異的な少なくとも1つの基質の活性化またはリン酸化を測定することによって細胞中のMAPK依存性経路の活性を調節するという推定調節化合物の能力を測定する段階とから成るプロセスによって同定される、基質は、配列番号2で表されるアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有しているヒトキナーゼポリペプチドである。これらの構成要素としてはERKまたはp38があり、これらは双方ともMAPK経路の構成要素でありMAPKAP-2をリン酸化することが知られている。

【0115】

本発明の代替的实施態様は、機能不全のMAPKAP-2仲介シグナル伝達経路によって発症する疾病の治療方法を提供する。該方法は、MAPK依存性経路の活性を低減し得る分子、活性化細胞外シグナル調節キナーゼによってリン酸化されるポリペプチドの活性を低減し得る分子及びそれらの組合せのような少なくとも1つの調節分子を含む治療用化合物を有効量で患者に投与することから成り、この場合の有効量は、疾病に關与する有害な細胞を消滅させる量を意味する。

20

【0116】

また別の目的として本発明によって提供されるスクリーニングアッセイは、その生殖細胞及び体細胞が本文に開示されたMAPKAP-2キナーゼまたはその天然基質を活性化させるに十分なタンパク質の選択部分をコードするヌクレオチド配列を含有するトランスジェニック哺乳動物に関する。例えば本発明のMAPKAP-2キナーゼをコードする配列をヒト以外の哺乳類の胚に導入し得る複数の手段が存在し、このような手段の幾つかは例えば、米国特許第4,736,866号、Jaenisch, Science 240-1468-1474 (1988) 及びWestphalら, Annu. Rev. Cell Biol. 5:181-196 (1989) に記載されている。これらの文献は参照によって本発明に含まれるものとする。この場合、動物細胞が受容体を発現し、従って、選択されたアゴニストまたはアンタゴニストを試験するためまたはスクリーニングするための便利なモデルとして使用し得る。

30

【0117】

I. MAPKAP-2をコードするポリペプチドを含むDNA構築物；DNA構築物を含有するベクター、宿主細胞、発現、など

40

新規なヒトシグナル伝達キナーゼ-MAPKAP-2ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子がここに提供される。より特定のには、MAPKAP-2をコードする単離cDNA及び組換えメッセンジャーRNA (mRNA) が記載されている。単離核酸分子のスプライス変異体も記載されている。典型的には、本発明のMAPKAP-2がスプライス変異体として生じるのでないならば、MAPKAP-2をコードしているポリヌクレオチドは本文中に記載されたMAPKAP-2コーディングDNAに実質的な配列相同性（即ち、約90%を上回る相同性）を有しているであろう。スプライス変異体をコードしているDNAまたはRNAは、全体配列としてはここで提供されるDNAまたはRNAに90%未満の相同性であるかもしれないが、このようなスプライス変異体

50

は開示されたDNAにほぼ100%相同性の領域を含むであろう。

【0118】

“核酸”または“核酸分子”という用語は、デオキシリボ核酸（DNA）及び適当な場合にはリボ核酸（RNA）のようなポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを意味する。この用語はまた、ヌクレオチド類似体から作製され記載の実施態様に応用できるようなRNAまたはDNAの類似体、一本鎖（センスまたはアンチセンス）及び二重鎖のポリヌクレオチドを等価物として包含する。DNAは相補的DNA（cDNA）またはゲノムDNA、例えば、本文中に開示された新規なキナーゼをコードする遺伝子でもよい。

【0119】

異なる指定がない限り、“ヌクレオチド”という用語は、糖部分（ペントース）とリン酸塩基と窒素含有複素環塩基とから成るDNAまたはRNAのモノマーユニットを定義する。塩基はグリコシド炭素（ペントースの1'炭素）を介して糖部分に結合されており、塩基と糖との組合せがヌクレオシドである。ヌクレオシドがペントースの3'位または5'位に結合したリン酸塩基を含有するとき、これをヌクレオチドと呼ぶ。作動可能に連結されたヌクレオチドの配列を本文中で典型的には“塩基配列”または“ヌクレオチド配列”及び文法的に等価の名称と呼び、本文中では左から右に向かう方向が慣用の5'-末端から3'-末端の方向に対応する式によって表す。

【0120】

本文中に提示した“ヌクレオチド配列”の各々は、デオキシリボヌクレオチド（略号A、G、C及びT）の配列として表される。しかしながら、核酸分子の“ヌクレオチド配列”という用語は、DNA分子またはポリヌクレオチドについては、デオキシリボヌクレオチドの配列を意味しており、RNA分子またはポリヌクレオチドについては、対応するリボヌクレオチドの配列（A、G、C及びU）を意味する。この場合、特定のデオキシリボヌクレオチド中のチミジンデオキシリボヌクレオチド（T）の各々がリボヌクレオチドウリジン（U）で置換されている。例えば、デオキシリボヌクレオチドの略号を使用して表された配列番号1の配列を有するRNA分子という用語は、配列番号1のデオキシリボヌクレオチドA、GまたはCの各々が対応するリボヌクレオチドA、GまたはCによって置換され、デオキシリボヌクレオチドTがリボヌクレオチドUによって置換された配列を有するRNA分子を含意すると理解されたい。

【0121】

“本発明のポリヌクレオチド”または“核酸”という用語は、MAPKAP-2キナーゼまたはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列、または、本文中に開示されたヌクレオチド配列に高緊縮条件下でハイブリダイズするヌクレオチドの配列を含有するDNAまたはRNAを意味する。

【0122】

本文中で使用された“スプライス変異体”という用語は、ゲノムDNAの（1つまたは複数の）一次転写物のディファレンシャルプロセッシングによって産生され、2種以上のmRNAを産生させる（1つまたは複数の）MAPKAP-2キナーゼコーディング核酸の変異体を意味する。ディファレンシャルプロセッシングされた一次転写物に由来のcDNAは、アミノ酸完全一致領域と別のアミノ酸配列をもつ領域とを有するMAPKAP-2キナーゼをコードするであろう。従って、同じゲノム配列が多数の近縁mRNA及びタンパク質の産生に導く。得られるmRNA及びタンパク質の双方を本文中で“スプライス変異体”と呼ぶ。

【0123】

本文中で使用された“対立遺伝子”または“対立遺伝子配列”または“対立遺伝子形態”という用語は、同じ機能のタンパク質をコードする遺伝子であるが同じ遺伝子の別の形態に比べて異なるヌクレオチド配列を含む代替的遺伝子形態を意味する。

【0124】

対立遺伝子は核酸配列中の少なくとも1つの突然変異の結果として生じ、その構造または機能が変化したかまたは不変化の変形mRNAまたはポリペプチドを生じる。所与の天然

または組換え遺伝子は、0、1または多数の対立遺伝子形態を有し得る。対立遺伝子を生じさせる大抵の突然変異的变化の原因は一般に、ヌクレオチドの自然的な欠失、付加または置換である。これらの種類の变化が所与の配列中に単独で生じててもよくまたは組合せて1回または複数回生じててもよい。

【0125】

本文中で使用された“対立遺伝子多型”または“対立遺伝子変異体”という用語は、1つの遺伝子の内部のヌクレオチド配列の変異を意味しており、この場合、普遍的集団中の別々の個体が遺伝子の別々の変異体を発現するであろう。

【0126】

本文中の“から本質的に構成される”という表現は、開示された配列を包含することを意味しており、自然的に生じるかまたは *in vitro* の化学的もしくは遺伝的な修飾の結果であるかにかかわらず、開示された（1つまたは複数の）ヌクレオチド配列の対立遺伝子変異を含意する。このような変異体の各々が本文中に開示された対応する MAPKAP-2 のヌクレオチド配列と本質的に同じヌクレオチド配列を有することは理解されよう。

【0127】

核酸分子またヌクレオチド配列の“フラグメント”は、全長よりも短く、配列番号1のヌクレオチド配列に緊縮ハイブリダイゼーション条件下で特異的にハイブリダイズし得る最小の長さを少なくとも含む核酸の一部分である。このようなフラグメントの長さは好ましくは15-17ヌクレオチドまたはそれ以上である。

【0128】

“変異”核酸分子という用語は、MAPKAP-2 キナーゼをコードする天然型ヌクレオチド配列中に小変化、即ち、天然型配列の1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、付加及び／または置換という変化を含み、好ましくは天然型核酸分子の生物活性を実質的に維持しているポリヌクレオチド配列を意味する。変異核酸分子は例えば、標準DNA突然変異誘発技術または変異DNA分子もしくはその一部分の化学的合成によって作製し得る。一般的に、基準のヌクレオチド配列と変異体とのヌクレオチド配列とが全体的にはほぼ相似であり多くの領域で一致しているような変異に限定される。

【0129】

変異ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の変化がサイレントでもよい。即ち、変化がポリヌクレオチドによってコードされたアミノ酸を変化させない。変化がこの種のサイレント変化に限定されている場合、変異体は基準と同じアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするであろう。

【0130】

あるいは、変化が“保存性”でもよい。保存性変異は、基準ポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドのアミノ酸配列を変えるようなヌクレオチド配列の変化である。このようなヌクレオチド変化の結果として、基準配列によってコードされたポリペプチド中のアミノ酸置換、付加、欠失、融合及び末端欠損が生じるであろう。従って、保存性変異は、核酸配列によってコードされたポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸残基の保存性変化を生じさせるような遺伝子のタンパク質コーディング領域の変化である。

【0131】

好ましい核酸分子の変異形態は、本発明のMAPKAP-2 キナーゼをコードする天然型遺伝子と少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%のヌクレオチド配列相似を有しているのが好ましい。

【0132】

“プライマー”または“（1つまたは複数の）核酸重合プライマー”という用語は、4つの異なるヌクレオチド三リン酸と重合剤（即ち、DNAポリメラーゼまたは逆転写酵素）との存在下に適当なバッファ中で適当な温度という条件で核酸鎖に相補的なプライマー延長産物の合成を開始するとき、DNA合成の開始点として作用し得る天然または合成のオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーの正確な長さは多くの要因に左右されるが、典

型的には15-20ヌクレオチドの範囲である。短いプライマー分子は一般に、鋳型と共に十分に安定な複合体を形成するためにはより低い温度を必要とする。プライマーは鋳型の正確な配列を反映する必要はないが、鋳型とハイブリダイズすべく十分に相補的でなければならない。所望の場合にはプライマーを標識できる。

【0133】

本文中に開示されたMAPKAP-2キナーゼのスプライス変異体の所在を検出するために当業界で公知の核酸増幅技術を使用できる。これは、不一致の(1つまたは複数の)配列を包囲するDNA配列に基づくオリゴヌクレオチドをヒトRNAまたはゲノムDNAを増幅させるプライマーとして使用することによって行われる。増幅産物のサイズ及び配列の決定から、スプライス変異体の存在が明らかになる。更に、ヒトゲノムDNAをハイブリダイゼーションによって単離すると、イントロンによって隔てられた多数のエキソンを含有するDNAが生じ、これは本文中に開示されたMAPKAP-2キナーゼをコードする転写物の種々のスプライス変異体に対応している。核酸操作技術は例えば、Sambrookら(1989)及びAusubelら(1987, 定期的に更新)に概説されている。核酸の化学合成方法は例えば、Beaucage and Carruthers, Tetra. Lett. 22:1859-1862, 1981及びMatteucciら, J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981に検討されている。核酸の化学合成は例えば市販の全自動オリゴヌクレオチドシンセサイザーで行うことができる。

10

【0134】

本文中で使用された核酸“プローブ”は、配列番号1で表される配列中の連続14個以上の塩基と同じであるかまたは該塩基に相補的である少なくとも14個、好ましくは少なくとも20個、より好ましくは少なくとも50個の連続塩基を含むヌクレオチド配列を有している一本鎖のDNAもしくはRNAまたはそれらの類似体である。更に、配列番号1に対応する完全配列の完全cDNAコーディング領域もプローブとして使用し得る。

20

【0135】

現在好ましいとされているプローブに基づくスクリーニング条件は、約37℃の温度、約20%のホルムアミド濃度、約5×の標準生理食塩水型クエン酸塩(SSC; 20×SSCは3Mの塩化ナトリウム、0.3Mのクエン酸ナトリウム, pH7.0を含有している)である。このような条件で完全な相同性を要せずにプローブ配列にかなりの程度の相似性を有している配列を同定し得る。

30

【0136】

“ハイブリダイゼーション”は、染色体DNA中で天然に生じる結合と同様に核酸の相補鎖(即ち、センス:アンチセンス鎖またはプローブ:ターゲットDNA)が水素結合を介して互いに結合することを意味する。所与のプローブをターゲットDNAにハイブリダイズさせるために使用される緊縮性レベルは当業者が容易に変更できる。

【0137】

本文中で使用された“緊縮ハイブリダイゼーション条件”という表現は、ポリ核酸ハイブリッドが安定する条件を表す。当業者には明らかであろうが、ハイブリッドの安定性はハイブリッドの融解温度(T_m)によって表される。 T_m は式:

$81.5^{\circ}\text{C} - 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600 / l$ 40
によって概算できる。式中の l はハイブリッドのヌクレオチド長さである。 T_m は配列相同度が1%減少する毎に $1^{\circ}\text{C} - 1.5^{\circ}\text{C}$ 低下する。一般に、ハイブリッドの安定度はナトリウムイオン濃度及び温度の関数である。典型的には、ハイブリダイゼーション反応を低緊縮条件下で行い、次いで、もっと高い種々の緊縮性で複数回の洗浄を行う。ハイブリダイゼーション緊縮性という用語はこのような洗浄条件に関係がある。

【0138】

本文中で使用された“中程度に緊縮性のハイブリダイゼーション”という表現は、ターゲットDNAをターゲットDNAに約60%一致、好ましくは約75%一致、より好ましくは約85%一致する相補的核酸に結合させ得る条件を表す。ターゲットDNAに約90%以上一致する相補的核酸が特に好ましい。好ましい中程度に緊縮性の条件は、50%ホル

50

ムアミド、5×Denhartt溶液、5×SSPE、0.2%SDS、42℃のハイブリダイゼーション、次いで0.2×SSPE、0.2%SDS、65℃の洗浄に等価の条件である。

【0139】

“高緊縮ハイブリダイゼーション”という表現は、0.018MのNaCl中、65℃で安定なハイブリッドを形成する核酸配列だけがハイブリダイゼーションできる条件を表す（即ち、ハイブリッドが0.018MのNaCl中、65℃で安定でないときは、このハイブリッドは本文中で考察するような高緊縮条件下で安定でない）。高緊縮条件は例えば、50%ホルムアミド、5×Denhartt溶液、5×SSPE、0.2%SDS、42℃でハイブリダイゼーションし、次いで0.1×SSPE及び0.1%SDS中、65℃で洗浄することによって与えることができる。 10

【0140】

“低緊縮ハイブリダイゼーション”という表現は、10%ホルムアミド、5×Denhartt溶液、6×SSPE、0.2%SDS、42℃のハイブリダイゼーション、次いで1×SSPE、0.2%のSDS中、50℃の洗浄に等価の条件を表す。

【0141】

Denhardt溶液及びSSPE（例えばSambrook, Fritsch and Maniatis: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989参照）は別の適当なハイブリダイゼーションバッファと同様に当業界で公知である。例えば、SSPEはpH7.4のリン酸塩緩衝された0.18MのNaClである。SSPEは例えば、175.3gのNaCl、27.6gの NaH_2PO_4 及び7.4gのEDTAを800mlの水に溶解し、pHを7.4に調整し、次いで1リットルになるまで水を加えることによって20×の予製液として調製できる。Denhardt溶液（Denhardt (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 23:641参照）は例えば、5gのフィコール（Type 400, Pharmacia LKB Biotechnology, INC., Piscataway N. J.）、5gのポリビニルピロリドン及び5gのウシ血清アルブミン（Fraction V; Sigma, St. Louis Mo.）を混合し、次に500mlまで水を加え、濾過して粒状物を除去することによって50×の予製液として調製できる。 20 30

【0142】

本文中に開示された新規なヒトMAPKAP-2キナーゼをコードする好ましい核酸は、中程度に緊縮性、好ましくは高緊縮性の条件下で、配列番号1で表される核酸配列の実質的に全部の配列またはかなりの部分（即ち、典型的には少なくとも15-30ヌクレオチド）にハイブリダイズする。

【0143】

好ましくは、プローブに少なくとも70%の相同度を有している配列を同定できプローブにもっと低い相同度を有している配列から識別するようなハイブリダイゼーション条件を選択する。その結果として、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と実質的に同じヌクレオチド配列を有している核酸が得られる。 40

【0144】

このように、核酸プローブは種々の用途に役立つ。他方で核酸プローブは、本発明による核酸分子を増幅させるPCRプライマーとして使用し得る。また、例えばin-situハイブリダイゼーションまたはノーザンブロットハイブリダイゼーションによってターゲット組織中で本発明分子の発現を検出する有効なツールとなり得る。

【0145】

本発明のプローブは後述するように当業界で公知の方法で標識し、種々の診断用キットに使用してもよい。

【0146】

“ラベル”という用語は、化合物または組成物に特異的に結合して該化合物または組成物 50

の検出を容易にするような化合物または組成物を意味する。この用語は、標識された化合物または組成物にそれらが別の分子に特異的に結合できるような特性を与えることも含意する。“標識された”という用語は、化合物または組成物が典型的には共有結合によって特異的に結合したことを表すが、化合物または組成物をラベルで標識するために非共有結合的相互作用も使用できる。従って、ラベルは直接検出可能ラベル、即ち、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）または蛍光もしくは燐光分子（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド燐光）でもよく、または、ラベルが間接に、即ち、酵素活性（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ペーターガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）もしくは別の分子（ストレプトアビジン、ビオチン、抗原、エピトープまたは抗体）への結合能力によって検出されてもよい。ラベルの取り込みは種々の手段で行われる。即ち、ポリメラーゼ伸介プライマー延長反応において放射性標識したかもしくはビオチニル化したヌクレオチドを使用してもよく、または、組換え発現もしくは合成手段を介してエピトープにタグ付けしてもよく、または、抗体に結合させてもよい。

10

【0147】

ラベルは直接付着させてもよく、または、立体障害を少なくするために種々の長さのスペーサーアームを介して付着させてもよい。多様な種類の標識試薬のいずれかを本発明の目的に使用し得る。例えば、1つまたは複数の標識ヌクレオシド三リン酸、プライマー、リンカーまたはプローブを使用できる。免疫蛍光分析技術に関する記載は、De Luca, “Immunofluorescence Analysis”, Antibody Assa Tool 収載, Marchalonis 編, John Wiley & Sons, Ltd., pp. 189-231 (1982) に見出される。該文献は参照によって本発明に含まれるものとする。

20

【0148】

また、ラベルという用語が“タグ”を含意してもよい。タグは、標識分子に特異的に結合できる。例えば、ビオチンをタグとして使用し、タグに結合するアビジニル化またはストレプトアビジニル化ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）を使用し、次いで、HRPの存在を検出するために発色性基質（例えば、テトラメチルベンズアミン）を使用し得る。同様にして、タグがエピトープまたは抗原（例えば、ジゴキシゲニン）であり、タグに結合させるために酵素標識、蛍光標識または放射性標識した抗体を使用できる。

30

【0149】

核酸配列の定義において、実質的に相似のアミノ酸配列をコードし得るすべての対象核酸配列は、実質的に相似であると考えるかまたは基準核酸配列、即ち、本文中に開示されたMAPKAP-2キナーゼのコーディング配列（配列番号1）に実質的に等しいヌクレオチド配列を含むと考える。

【0150】

実際、“実質的に同じ配列”という用語は、2つのタンパク質をコードするDNAまたはRNAが中程度に緊縮性の条件下でハイブリダイズし、同じアミノ酸配列を有するかまたはそれらの構造もしくは機能を変化させない配列変化を有しているタンパク質をコードしていることを意味する。

40

【0151】

ヌクレオチド配列“相似性”は、2つのポリヌクレオチド配列が（適正なヌクレオチド挿入または欠失を伴って）最適に位置合せされたときそれらの配列の対応する位置に等しいヌクレオチド塩基をどの程度有するかを表す判断基準である。配列相似性またはパーセント相似性は、例えば、University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG) から入手可能なGAPコンピュータープログラム、バージョン6.0のような配列解析ソフトウェアを使用して配列情報を比較することによって決定できる。GAPプログラムは、Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981) によって設計されたようなNeedleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443,

50

1970) の位置合せ方法を利用する。

【0152】

本文中で使用された“実質的に等しいヌクレオチド配列”という用語は、少なくとも約90%の一致を有することを意味しており、実質的に等しいアミノ酸配列は95%を上回るアミノ酸一致を有している。しかしながら、スプライス変異体として生じたので上記レベル未満の相同度を有しているかまたは保存性アミノ酸置換（または縮重コドンの置換）によって修飾されているタンパク質（及びこのようなタンパク質をコードするDNAまたはmRNA）が本発明の範囲内に包含されることは理解されよう。

【0153】

本文中で使用された“実質的に表されたような”または“表された”という用語もまた、変化を有してはいるが実質的に同じ生化学的または薬理学的機能を実質的に同じ方法で果たす本文中に定義されたような機能誘導タンパク質及び機能誘導核酸を意味する。しかしながら、本文中で使用された“実質的に表されたような”という表現は、生物学的に有効なドミナントネガティブ突然変異体をも包含し、本文中に定義された生物学的に有効なアンチセンス分子をも含意する。 10

【0154】

本発明はまた、配列番号1で示される核酸とは異なるが同じ表現型を有している核酸を包含する。表現型的に相似の核酸を“機能的に等価の核酸”と呼ぶこともある。

【0155】

本文中で使用された“機能的に等価の核酸”または“機能性誘導体”という表現は、偶発的な僅かな配列変異を有することを特徴とし本文中に開示された核酸配列と実質的に同様に機能して（1つまたは複数の）同じタンパク質を産生する核酸配列を意味する。 20

【0156】

機能的に等価の配列は、本文中に開示され特許請求の範囲に記載された核酸及びアミノ酸組成物と実質的に同じ組成物を産生するために実質的に同様に機能するであろう。

【0157】

特に、機能的に等価のDNAは、本文中に開示されたタンパク質（配列番号2）と同じタンパク質をコードしているか、または、1つの非極性残基が別の非極性残基で置換されているかもしくは1つの荷電残基が同様の荷電残基で置換されているような保存性アミノ酸変異を有しているタンパク質をコードしている。これらの変化は、タンパク質の三次構造を実質的に変化させない変化であると当業者に認められている変化を包含する。 30

【0158】

特に、機能的に等価の核酸は、本文中に開示されたポリペプチドと同じポリペプチド、または、保存性アミノ酸変異を有しているポリペプチド、または、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有しているポリペプチドに実質的に相似のポリペプチドをコードしている。

【0159】

本発明の1つの実施態様において、本文中に開示されたMAPKAP-2キナーゼをコードするcDNAは配列番号1で表される配列と実質的に同じヌクレオチド配列を含む。本発明のタンパク質をコードする好ましいcDNA分子は配列番号1で表される配列と実質的に同じヌクレオチド配列を含む。 40

【0160】

本発明の別の実施態様は、配列番号2で表される配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードする基準ヌクレオチド配列と実質的に同じヌクレオチド配列を有している（1つまたは複数の）核酸を考察する。

【0161】

更に、本発明のMAPKAP-2キナーゼをコードしているが遺伝コードの縮重性のため上述のハイブリダイゼーション条件下で本発明の核酸に必ずしもハイブリダイズしないような核酸が提供される。本発明のMAPKAP-2キナーゼをコードする好ましい核酸は、配列番号2で表される配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチドから構成される。 50

【0162】

本文中で使用された“縮重”という用語は、配列番号1に比べて少なくとも1つのヌクレオチドが違っているが配列番号2で表されるアミノ酸と同じアミノ酸をコードするコドンの意味する。例えば、トリプレット“UCU”、“UCC”、“UCA”及び“UCG”で表される4つのコドンはすべてアミノ酸セリンをコードしているので、これらは互いに縮重である。

【0163】

本文中で使用された“発現”という用語は、ポリ核酸がmRNAに転写されペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に翻訳されるプロセスを表す。ポリ核酸がゲノムDNAに由来するとき、適切な真核性宿主細胞または生物が選択されるならば、発現はmRNAのスプライシングを包含するであろう。

10

【0164】

本文中で使用された“発現ベクター”という用語は、宿主細胞への核酸領域の転写を指令する核酸ベクター構築物の意味する。発現ベクターの非限定例はプラスミド、レトロウイルスベクター、ウイルス及び合成ベクターである。

【0165】

本文中で使用された“形質転換された宿主細胞”という用語は、本発明の核酸分子または機能性誘導体が組み込まれた細胞の意味する。

【0166】

本発明の核酸は当業界で公知の様々な方法、例えば、配列番号1の種々の領域から得られたオリゴヌクレオチドプライマーを使用するPCR増幅などのような本文中に記載された方法によって作製できる。

20

【0167】

配列番号1に含まれているヌクレオチドに等しいかまたは十分に等しいポリヌクレオチドは、cDNAもしくはゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションプローブとしてまたは核酸増幅（PCR）反応のプライマーとして、本発明のポリペプチドをコードする全長cDNA及びゲノムクローンを単離するため、並びに、配列番号1に高い配列相似性を有している別の遺伝子（ヒト以外の種のホモログ及びオーソログをコードする遺伝子を含む）のcDNA及びゲノムクローンを単離するために使用され得る。典型的にこれらのヌクレオチド配列は、基準配列に70%一致、好ましくは80%一致、より好ましくは90%一致、最も好ましくは95%一致の配列である。プローブまたはプライマーは一般に、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドから成り、50ヌクレオチド以上でもよい。特に好ましいプローブは30-50ヌクレオチドであろう。

30

【0168】

本発明のポリヌクレオチドに由来の核酸プローブがこの目的に特に有用であろう。核酸の例は、MAPKAP-2キナーゼをコードするRNA、cDNAまたは単離ゲノムDNAである。このような核酸の非限定例は、配列番号で表される配列と実質的に同じヌクレオチド配列をもつ核酸、または、配列番号2で表されるアミノ酸配列をコードする核酸である。プローブは一般に少なくとも15のヌクレオチドを含むであろう。好ましくはこのようなプローブは少なくとも30個のヌクレオチドを含み、50ヌクレオチド以上でもよい。特に好ましいプローブは30-50ヌクレオチドの範囲であろう。プローブは本文に開示されたポリヌクレオチドのスプライス変異体を単離するために使用し得る。

40

【0169】

このように、ポリペプチドをコードする核酸を単離する1つの手段は、腎臓、肝臓、骨格筋、白血球、白血病MOLT4及びリンパ球DNAのような種々のソースのヒトの組織及びcDNAを本発明の配列によってプローブし、次いで使用プローブに対して有意レベルの配列相同性を有している配列を選択することである。一般には、哺乳類ライブラリーをスクリーニングした後、ハイブリダイゼーションシグナルを検出することによって陽性クローンを同定し、同定したクローンを制限酵素マッピング及び／またはDNA配列解析によって特性決定し、次いで、本発明に示した配列に比較検討し、それらが完全MAPKA

50

P-2 キナーゼをコードするDNAを含むか否かを確認する。選択されたクローンが不完全な場合、オーバーラップクローンを得るためにこのクローンを使用して同じライブラリーを再度スクリーニングするかまたは別のライブラリーをスクリーニングするとよい。所望ならば、完全MAPKAP-2 キナーゼをコードするオーバーラップクローンが得られるまで陽性クローンでライブラリーを再スクリーニングすることができる。ライブラリーがcDNAライブラリーであるとき、オーバーラップクローンは読み取り枠を含むであろう。ライブラリーがゲノムであるとき、オーバーラップクローンはエキソンとイントロンを含むであろう。双方の場合に、DNA及び本発明に示したコードされたタンパク質に比較することによって完全クローンを同定し得る。

【0170】

好ましい緊縮ハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC(150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸三ナトリウム)、50 mMのリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×Denhardt溶液、10%硫酸デキストラン及び20 µg/mlの変性し切断したサケ精子DNAから成る溶液中、42℃で一夜インキュベーションする段階、次いで、0.1×SSC中、約65℃でフィルターを洗浄する段階から成る。従って本発明はまた、適当なライブラリーを緊縮ハイブリダイゼーション条件下で配列番号1の配列またはそのフラグメントを有する標識プローブでスクリーニングすることによって得られるポリヌクレオチドを包含する。

【0171】

多くの場合に、単離cDNA配列が不完全であること、即ち、本発明のヒトのポリペプチドをコードする領域がcDNAの5'端で短く切られていることを当業者は理解されるであろう。これは、逆転写酵素が本来的に低い“プロセッシング適性(processivity)”(重合反応中に鋳型との付着を維持し得る酵素の能力の判断基準)をもつ酵素なので、第一鎖のcDNAの合成中にmRNA鋳型のDNAコピーを完成できないからである。

【0172】

全長cDNAを得るためまたは短いcDNAを延長するために使用可能ないくつかの方法が当業者に公知であり、例えば、Rapid Amplification of cDNA ends(RACE)の方法がある(例えば、Frohmanら, PNAS USA 85, 8998-9002, 1988参照)。Marathon.TM.法(Clontech Laboratories Inc.)に代表されるような上記方法の新しい修正方法ではより長いcDNAの検索がはるかに容易になった。Marathon.TM.法では、選択組織から抽出したmRNAからcDNAを調製し、各末端に“アダプター”配列を結合させる。次に、遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーとアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーとの組合せを使用して核酸増幅(PCR)を行って、cDNAの“欠失”5'端を増幅する。次に“入れ子式(nested)”プライマー、即ち、増幅産物内にアニールするように設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列の以後の3'にアニールするアダプター特異的プライマーと既知の遺伝子配列の以後の5'にアニールする遺伝子特異的プライマー)を使用してPCR反応を繰り返す。次にこの反応の産物をDNA配列決定によって解析し、全長cDNAを構築した。全長cDNAを構築するためには、上記反応産物を既存のcDNAに直接接合することによって完全配列を与えるか、または、5'プライマーの設計に関する新しい配列情報を使用して独立の全長PCRを行う。

【0173】

このようにして同定された本発明のDNA配列またはcDNA配列は、このような核酸が当業者に公知の様々なタンパク質発現系に取り込まれるときにはMAPKAP-2 キナーゼの産生に使用できる。更に、このような核酸分子またはそのフラグメントを検出容易な置換基で標識し、所与のサンプル中の本発明のコーディング遺伝子またはmRNA転写物の存在及び/または量を検定するアッセイでハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。本文中に記載の核酸分子及びそのフラグメントはまた、本文中に記載の本発明の

10

20

30

40

50

タンパク質をコードする遺伝子を増幅するためのPCR反応でプライマー及び／または鋳型として使用できる。

【0174】

ヒト以外の種に由来するホモログ及びオースログも含めた本発明のMAPKAP-2キナーゼをコードするポリヌクレオチドは、適当なライブラリーを緊縮ハイブリダイゼーション条件下で配列番号1またはそのフラグメントの配列を有する標識プローブでスクリーニングする段階と、全長cDNA及びポリヌクレオチド配列を含むゲノムクローンを単離する段階とから成る方法によって得ることができる。このようなハイブリダイゼーション技術は当業者に公知である。

【0175】

“一致”は公知の方法によって容易に計算できる。公知方法の非限定例は、以下の文献（Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I. Griffin, A. M. and Griffin, H. G. eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; 及び Carillo, H. and Lipman, D., SIAMJ Applied Math., 48:1073 (1988) に記載された方法である。一致を判定する方法は、被験配列間で最大の整合度（マッチ）が与えられるように設計する。更に、一致を判定する方法は公的に利用可能なコンピュータープログラムにコード化されている。2つの配列間の一致を判定するコンピュータープログラム法の非限定例は、GCGプログラムパッケージである（Devereux, J. ら, Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)）、BLASTP、BLASTN及びFASTA（Atschul, S. F. ら, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)）。BLAST XプログラムはNCBI及びその他のソースから公的に利用できる（BLAST Manual, Altschul, S. ら, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S. ら, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)）。公知のSmith Watermanアルゴリズムも一致の判定に使用できる。

【0176】

ポリヌクレオチド比較用パラメーターとしては以下のパラメーターがある：

(1) アルゴリズム：Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス：マッチ=+10、ミスマッチ=0

ギャップペナルティ：50

ギャップ長ペナルティ：3

“ギャップ”プログラムはGenetics Computer Group, Madison Wisから入手可能。これらは核酸比較用デフォルトパラメーターである。

【0177】

ポリヌクレオチド及びポリペプチドに関する“一致”の好ましい意味はそれぞれ以下の(1)及び(2)で説明される。

【0178】

(1) ポリヌクレオチドの実施態様は更に、配列番号1で表される基準配列に少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の一致を有するポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド配列から成る単離ポリヌクレオチドを含む。この場合、ポリヌクレオチド配列は配列番号1で表される基準配列に一致してもよく、または、基準配列に対して整数個のヌクレオチド変異を含んでいてもよく、この変異は少なくとも1つのヌクレオチドの欠失、置換（トランジション及びトランスバージョンを含む）または挿入から成るグループから選択されており、これらの変異は基準ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置で生じるかまたはこれらの末端位置間の任意の位置で基準配列中のヌクレオチド間に個々に散在したり基準配列内に1つまたは複数の連続グループとして散在しており、ヌクレオチド変異の数は、一致パーセントを100で除算した整数を配列番号1のヌクレオチドの総数に乗算し、この積を配列番号1のヌクレオチドの総数から減算することによって算出される。即ち、式：

10

$$Nn = Xn - (Xn \cdot Y)$$

で算出され、

式中の、Nnはヌクレオチド変異の数、Xnは配列番号1のヌクレオチドの総数、Yは50%ならば0.50、60%ならば0.60、70%ならば0.70、80%ならば0.80、85%ならば0.85、90%ならば0.90、95%ならば0.95、97%ならば0.97、100%ならば1.00であり、乗算演算子を表す記号である。XnとYとの積が整数でないときは、Xnから減算する前に最も近い整数になるよう端数を切り捨てる。

配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の変異は、このコーディング配列中にナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト突然変異を生じさせ、これによって、このような変異後のポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドを変異させる。

20

【0179】

本発明のMA PKAP-2キナーゼをコードする相補的DNAクローンは、与えられたDNAから調製し得る。また、本発明のポリヌクレオチドはゲノムDNAライブラリーのような天然ソースから得ることもでき、または、市販されている公知技術を使用して合成することもできる。

【0180】

実際には、本発明のポリヌクレオチドは、標準クローニング及びスクリーニングを使用し、天然型MA PKAP-2またはその天然型結合相手を発現しているかまたは発現すると推測される細胞中のmRNAに由来のcDNAライブラリーから、発現配列タグ（EST）解析を使用して得ることができる（Adams, M. D. ら, Science (1991) 252: 1651-1656; Adams, M. D. ら, Nature, (1992) 355: 632-634; Adams, M. D. ら, Nature (1995) 377 Supp: 3-174）。

30

【0181】

本発明のMA PKAP-2をコードするヌクレオチド配列は配列番号1で表されたコーディング配列に全長にわたって一致してもよく、または、配列番号2のポリペプチドをコードするこのヌクレオチド配列の縮重形態でもよく、または、配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に高い一致度を有していてもよい。

40

【0182】

本発明の新規なヒトMA PKAP-2キナーゼをコードする代表的な核酸分子は多くの特徴を有している。例えば、

（i）核酸分子が配列番号2で表されるアミノ酸配列をコードしているか、または、

（ii）中程度の緊縮条件下で（i）のDNAにハイブリダイズする核酸分子であるか、または、

（iii）上記の（a）または（b）に縮重のDNAであり、このDNAが生物学的に活性のMA PKAP-2キナーゼをコードしているか、または、

（iv）配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に少なくとも75.9%の一致を有しているヌクレオチド配列であるか、または、

50

(v) その対応するフラグメントであるか、または、

(vi) 配列番号1に含まれているヌクレオチド配列に十分な一致を有するヌクレオチド配列またはその対立遺伝子変異体、そのスプライス変異体及び／またはそれらの相補配列である。

【0183】

好ましくは、(1つまたは複数の)本発明の核酸分子、即ち配列番号1は、ヒトのMAPKAP-2キナーゼをコードするヌクレオチド配列に少なくとも80%一致するか、配列番号1で表されるコーディングヌクレオチド配列に少なくとも85%一致するか、または、配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に少なくとも90%一致するような高い一致度のヌクレオチド配列を含有する。

10

【0184】

特に好ましい本発明の実施態様としては、実質的に配列番号2で表されるアミノ酸配列を有している本発明のMAPKAP-2キナーゼをコードするポリヌクレオチド及びその変異体がある。

【0185】

別の好ましい実施態様は、配列番号2のMAPKAP-2のアミノ酸配列中に複数、例えば5-10、1-5、1-3、1-2または1個のアミノ酸残基の置換、欠失または付加を何らかの組合せで含むMAPKAP-2ポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドである。

【0186】

別の好ましい本発明の実施態様は、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するMAPKAP-2キナーゼをコードするポリヌクレオチドに全長で少なくとも80%一致するポリヌクレオチド、及び、このようなポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである。これについては、このようなポリヌクレオチドに全長で少なくとも80%一致するポリヌクレオチドが特に好ましく、少なくとも90%一致するポリヌクレオチドがとりわけ好ましい。更に、少なくとも97%一致するポリヌクレオチドが極めて好ましく、少なくとも98-99%一致するポリヌクレオチドはいっそう好ましく、少なくとも99%一致するポリヌクレオチドが最も好ましい。

20

【0187】

本発明は更に、本文中に上述した配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。これについては、本発明はとりわけ、緊縮条件下で本文中に上述したポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本文中に使用された“緊縮条件”という用語は、配列間に少なくとも95%の一致度、好ましくは少なくとも97%の一致度が存在するときのみ生じるハイブリダイゼーションを意味する。

30

【0188】

別の実施態様においては、本発明は、5'から3'の方向に、宿主細胞中で転写を開始させる有効なプロモーター、及び、(1つまたは複数の)上述の本発明の核酸分子を含む組換えDNA分子に関する。

【0189】

本発明はまた、1つまたは複数の本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作された宿主細胞、及び、組換え技術による本発明のポリペプチドの産生に関する。

40

【0190】

本発明のDNA構築物に由来のRNAを使用してこのようなタンパク質を産生させるために無細胞翻訳系も使用できる。

【0191】

クローン化DNAを適当な発現ベクターに取り込ませ、プラスミドベクター、または、各々が1つまたは複数の異なる遺伝子をコードしているプラスミドベクターの組合せ、または、直鎖DNAによって真核細胞のトランスフェクションを行い、トランスフェクトされた細胞を当業界で公知の方法で選択する(例えば、Sambrookら、(1989)M

50

olecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 参照)。本発明の核酸構築物を含む発現ベクターを宿主細胞に導入（形質導入）して形質導入された組換え細胞（即ち、組換えヘテロログス核酸を含有する細胞）を作製する適当な手段は当業界で公知である（概要に関しては、例えば、Friedman, 1989, Science, 244:1275-1281; Mulligan, 1993, Science, 260:926-932 参照、これらの各々はその記載内容全部が参照によって本発明に含まれるものとする）。

【0192】

代表的な形質導入方法は例えば、ウイルスベクターを使用する感染（例えば、米国特許第 4, 405, 712 号及び第 4, 650, 764 号参照）、リン酸カルシウムトランスフェクション（米国特許第 4, 399, 216 号及び第 4, 634, 665 号）、硫酸デキストラントランスフェクション、電気穿孔、リポフェクション（例えば、米国特許第 4, 394, 448 号及び第 4, 619, 794 号参照）、サイトフェクション、粒子ビーズボンバードメント、などである。ヘテロログス核酸は場合によっては、染色体外（即ち、エピソーム）維持が可能な配列を含んでもよく、または、ヘテロログス核酸が宿主のゲノムに組み込まれるドナー核酸でもよい。次に、組換え細胞を、（1つまたは複数の）DNA によってコードされた MAPKAP-2 キナーゼが発現する条件下で培養する。好ましい細胞は、哺乳類細胞（例えば、HEK293、CHO 及び Lt k⁻ 細胞）、酵母細胞（例えば、*Pichia pastoris* のようなメチル親和性酵母細胞）、細菌細胞（例えば、大腸菌）、などである。

【0193】

本発明を行うために使用される発現ベクターは、クローン化 DNA の転写を指令し得るプロモーターと転写ターミネーターとを含むであろう。

【0194】

発現ベクターは更に、当該コーディング配列の下流に位置するポリアデニル化シグナルを含む。ポリアデニル化シグナルとしては、SV40 に由来の初期または後期ポリアデニル化シグナル（Kaufman and Sharp, 前出）、アデノウイルス 5 E1B 領域に由来のポリアデニル化シグナル及びヒト成長ホルモン遺伝子ターミネーター（Denotora, Nuc. Acid Res. 9:3719-3730, 1981）がある。発現ベクターは、プロモーター部位と RNS スプライス部位との間に位置する非コーディング性のウイルスリーダー配列、例えば、アデノウイルス 2 の 3 分節系リーダーを含んでもよい。好ましいベクターはまた、SV40 エンハンサー及びマウス μ エンハンサー（Gillies, Cell 33:717-718, 1983）のようなエンハンサー配列を含み得る。発現ベクターはまた、アデノウイルス VA RNA をコードする配列を含み得る。

【0195】

適当な発現ベクターは当業界で公知であり、例えば、このような DNA の発現を調節し得るプロモーター領域のような調節配列に作動可能に連結された DNA を発現し得るベクターがある。従って、発現ベクターという用語は、プラスミド、ファージ、組換えウイルスのような組換え DNA または RNA 構築物を包含し、あるいはその他にも、適当な宿主細胞に導入されたときに挿入された DNA を発現させるベクターを包含する。適当な発現ベクターは当業者に公知であり、真核細胞及び／または原核細胞中で複製可能なベクター、及び、エピソームに維持されるベクター、または、宿主細胞ゲノムに組み込まれるベクターがある。

【0196】

原核細胞である大腸菌を形質転換させる代表的な発現ベクターは、pET 発現ベクター（Novagen, Madison, Wis., 米国特許第 4, 952, 496 号参照）、例えば、T7 プロモーターと T7 ターミネーターと大腸菌の lac 誘導オペレーターと lac リプレッサー遺伝子とを含む pET11a、及び、T7 プロモーターと T7 ターミネ

ーターと大腸菌のompT分泌シグナルとを含むpET12a-cである。別のこのようなベクターは、pIN-III ompA2であり(Duffaudら, Meth. in Enzymology, 153:492-507, 1987参照)、これは、lppプロモーターとlacUV5プロモーターオペレーターとompA分泌シグナルとlacリプレッサー遺伝子とを含んでいる。

【0197】

代表的な真核細胞発現ベクターは、pSV-2gpt系(Mulliganら, 1979, Nature, 277:108-114); Okayama-Berg系(Mol. Cell Biol., 2:161-170)のような真核細胞カセット、及び、Genetics Institute(1985, Science, 228:810-815)によって記載された発現クロニングベクターである。これらのプラスミドベクターの各々は、該当する本発明のキメラタンパク質の発現を促進し得る。 10

【0198】

また、細胞内で機能性の転写領域と、本文に開示されたMAPKAP-2キナーゼ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と、適当な宿主細胞内で機能性の転写終結領域とを含む(1つまたは複数の)核酸分子が提供される。

【0199】

多くの様々な転写及び翻訳の調節配列を宿主の性質に依存して使用し得る。転写及び翻訳の調節シグナルは、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、などのようなウイルスソースに由来し得る。このようなソースでは調節シグナルが高レベル発現を有している特定の遺伝子配列に付随する。あるいは、アクチン、コラーゲン、ミオシンなどのような哺乳類発現産物からのプロモーターを使用してもよい。遺伝子配列の発現を調節できるような抑制または活性化を行う転写開始調節シグナルを選択してもよい。温度を変更することによって発現を抑制または開始できるような温度感受性の調節シグナルを使用するかまたは化学物質(例えば代謝産物)の調節作用を受ける調節シグナルが有利である。 20

【0200】

従って、1つの実施態様は、本文中に開示された本発明のMAPKAP-2キナーゼを組換え的に発現する形質転換宿主細胞を提供する。

【0201】

本文中では、細胞が遺伝子操作によって正常には産生しないかまたは正常にはもっと低いレベルで産生するタンパク質を産生できるようになったとき、細胞が“所望のペプチドを発現するように変異された”という。当業者は、ゲノム、cDNAまたは合成配列を真核細胞または原核細胞に導入し発現させる手順を容易に応用し得る。 30

【0202】

DNAのような核酸分子は、転写及び翻訳の調節情報を含むヌクレオチド配列を含むとき、ポリペプチドを“発現することが可能な”と言われる。また、このような配列はポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に“作動可能に連結された”と言われる。作動可能な連鎖は、調節DNA配列と発現させたいDNA配列とが遺伝子配列を発現できるように連結された連鎖を意味する。遺伝子配列の発現に必要な調節配列の詳細な種類は生物毎に異なるであろうが、一般に原核細胞中では、プロモーター(RNA転写の開始を指令する)と、RNAに転写されたときに合成開始のシグナルを与えるDNA配列との双方を含むプロモーター領域を含む。このような領域は通常は、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列、などのような転写及び翻訳の開始に関与する5'-非コーディング配列を含むであろう。 40

【0203】

所望ならば、MAPKAP-2遺伝子をコードする配列の3'の非コーディング領域が上述の方法によって得られる。この領域は、終結及びポリアデニル化のような転写終結調節配列として保持される。従って、MAPKAP-2キナーゼをコードするDNA配列に本来的に隣接している3'領域を保持することによって転写終結シグナルが提供される。発 50

現宿主細胞中で転写終結シグナルが十分に機能性でないときは、宿主細胞中で機能性の3'領域が代替し得る。

【0204】

2つのDNA配列（例えばプロモーター領域配列とMAPKAP-2コーディング配列）は、2つのDNA配列間の連鎖が、（1）フレームシフト突然変異を導入させない、（2）MAPKAP-2コーディング遺伝子配列の転写を指令するプロモーター領域配列の能力を妨害しない、または、（3）プロモーター領域配列によって転写されるMAPKAP-2コーディング遺伝子配列の能力を妨害しない連鎖であるときは、“作動可能に連結された”と言われる。従って、プロモーターがDNA配列の転写を行うことができるならば、プロモーター領域はDNAに作動可能に連結されている。

10

【0205】

対照配列、発現ベクター、形質転換方法、などの選択は、遺伝子を発現させるために使用される宿主細胞の種類に依存する。本文中で使用された“細胞”、“細胞系”及び“細胞培養物”という用語は互換的に使用されており、いずれの呼称もそれらの後代を含意する。

【0206】

“形質転換体”または“形質転換細胞”という用語は、初代被験細胞及び転移回数にかかわらず該細胞に由来する培養物を意味する。また、計画的なまたは偶発的な突然変異が原因ですべての後代のDNAが正確に等しい内容ではないことも理解されよう。しかしながら、定義したように、突然変異した後代は出発形質転換細胞と同じ機能性を有している。

20

【0207】

本発明のヒトMAPKAP-2キナーゼのコーディング遺伝子を発現させるためには、適正宿主によって認識される転写及び翻訳のシグナルが必要である。本発明は、原核細胞または真核細胞のいずれかにおけるMAPKAP-2キナーゼコーディング遺伝子（またはその機能性誘導体）の発現を包含する。

【0208】

本発明の発現系に使用し得る宿主細胞は、本発明の新規なヒトMAPKAP-2キナーゼの発現に使用されるのに適している限り、厳密に制約されない。適当な宿主はしばしば真核細胞である。

30

【0209】

本発明の実施に使用し得る適当な宿主細胞の代表例は、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス及び枯草菌（*Bacillus subtilis*）細胞のような細菌細胞；酵母細胞及びコウジカビ（*Aspergillus*）細胞のような菌類細胞；ショウジョウバエ（*Drosophila*）S2及びヨトウガ（*Spodoptera*）のSf9細胞のような昆虫細胞；CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293及びBowes黒色腫細胞のような動物細胞；及び、植物細胞である。

【0210】

酵母種（例えば、*Saccharomyces*, spp.、特に*S. cerevisiae*、*Schizosaccharomyces* spp.）または糸状菌類（例えば、*Aspergillus* spp.、*Neurospora* spp.）のような菌類細胞は本発明の範囲内で宿主細胞として使用できる。本発明で使用し得る適当な酵母ベクターは、YRp7（Struhlら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:1035-1039, 1978）、YEpl3（Broachら、Gene 8:121-133, 1979）、POTベクター（Kawasakiら、米国特許第4,931,373号、該特許は参照によって本発明に含まれるものとする）、pJDB249及びpJDB219（Beggs, Nature 275:104-108, 1978）及びそれらの誘導体である。このようなベクターは一般に選択可能マーカースを含み、該マーカースは、優性表現型を示す任意数の遺伝子で1つでよく、該優性表現型に基づいて形質転換

40

50

体を選択できるような表現型アッセイが存在する。好ましい選択可能マーカーは、宿主細胞の栄養要求性を補完し、抗生物質耐性を与えるか、または、細胞に特定炭素源を利用させるようなマーカーであり、例えば、LEU2 (Broachら, 前出)、URA3 (Bottsteinら, Gene 8:17, 1979)、HIS3 (Struhlら, 前出) またはPOT1 (Kawasakiら, 前出) がある。別の適当な選択可能マーカーは、酵母細胞にクロラムフェニコール耐性を与えるCAT遺伝子である。

【0211】

プロモーターを取り込む酵母遺伝子配列発現系シリーズのいずれかを利用でき、酵母をグルコースに富む培地中で増殖させるときに有効に発現された解糖酵素をコードする遺伝子配列から終結エレメントが大量に産生される。既知の解糖遺伝子配列も極めて効率的な転写コントロールシグナルを供給できる。 10

【0212】

酵母は転写後ペプチド修飾もできるという重要な利点を有している。強力プロモーター配列と高コピー数プラスミドとを利用する多くの組換えDNA戦略が存在し、酵母中で所望のタンパク質を産生するために利用できる。酵母は、クローン化された哺乳類遺伝子配列産物の上でリーダー配列を認識し、リーダー配列を含むペプチド (即ち、プレペプチド) を分泌する。哺乳類宿主に関しては、複数の可能なベクター系をMAPKAP-2キナーゼの発現に利用し得る。

【0213】

様々な高等真核細胞が本発明のポリペプチドを発現する宿主細胞として役立つが、すべての細胞系が受容体を細胞の第二メッセンジャー系に機能的に結合させることができるとは言えない。BHK、CHO、Y1 (Shapiroら, TIPS Suppl. 43-46 (1989))、NG108-15 (Dawsonら, Neuroscience Approached Through Cell Culture, Vol. 2, pages 89-114 (1989))、N1E-115 (Lilesら, J. Biol. Chem. 261:5307-5313 (1986))、PC12及びCOS-1 (ATCC CRL 1650) のような培養哺乳類細胞が好ましい。好ましいBHK細胞系はtk⁻ts13 BHK細胞系 (Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110 (1982)) 及びBHK570細胞系 (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. に登録番号CRL 10314で寄託) である。tk⁻ BHK細胞系はATCCから登録番号CRL 1632で入手できる。 20 30

【0214】

原核細胞宿主は一般に、組換えタンパク質の産生を極めて効率的にかつ簡便に行うことができ、従って、MAPKAP-2キナーゼのコーディング遺伝子を発現させる好ましい発現系の1種である。

【0215】

多くの場合、原核細胞は大腸菌の種々の菌株によって代表される。しかしながら、別の細菌株のような別の微生物菌株も使用できる。原核細胞系では、宿主に適合性の種に由来する複製部位とコントロール配列とを含むプラスミドベクターを使用するとよい。適当なプラスミドベクターの例は、pBR322、pUC-118、pUC119などである。適当なファージまたはバクテリオファージベクターは γ gt10、 γ gt11などである。適当なウイルスベクターはpMAM-neo、pKRCなどである。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中で複製能力を有している。 40

【0216】

認知されている原核細胞宿主としては、大腸菌 (E. coli)、桿菌 (Bacillus)、Streptomyces、Pseudomonas、Salmonella、Serratiaなどのような細菌がある。しかしながらこのような条件下でペプチドはグリコシル化しないであろう。原核細胞宿主は発現プラスミド中のレプリコン及びコントロ 50

ール配列に適合性でなければならない。

【0217】

原核細胞中でMAPKAP-2キナーゼ（またはその機能性誘導体）を発現させるためには、MAPKAP-2をコードするヌクレオチド配列を機能性原核細胞プロモーターに作動可能に連結する必要がある。このようなプロモーターは構成性でもよいが、より好ましくは調節可能（即ち、誘導可能または脱抑制可能（*derepressible*））である。構成プロモーター及び誘導プロモーターの例は当業者に公知である。原核性プロモーターはCenatiempo（*Biochimie* 68:505-516（1986））；及びGottesman（*Ann. Rev. Genet.* 18:415-442（1984））に概説されている。原核細胞中の適正発現にはまた、遺伝子配列のコーディング配列の上流にリボソーム結合部位が存在することが必要である。このようなリボソーム結合部位は、例えば、Goldら、*Ann. Rev. Microbiol.* 35:365-404（1981）に開示されている。

【0218】

本文中で使用された“プロモーター”という用語は、該プロモーターに作動可能に連結されている選択されたDNA配列の発現を調節し、該選択されたDNA配列を細胞中で発現させるポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列を意味する。この用語は“組織特異的”プロモーター、即ち、選択されたDNA配列を特定細胞（例えば特定組織の細胞）中でのみ発現させるプロモーターを含意する。この用語はまた、選択されたDNAの発現を主として1つの組織中で調節するが別の組織中でも発現を生じさせるいわゆる“漏出”プロモーターも包含する。この用語はまた、組織非特異的プロモーター、及び、構成的に発現するかまたは誘導性である（即ち発現レベルをコントロールできる）プロモーターも含意する。

【0219】

MAPKAP-2キナーゼをコードする核酸分子及び作動可能に連結されたプロモーターを非複製性DNA（またはRNA）分子としてレシピエント原核細胞または真核細胞に導入する。非複製性分子は直鎖状分子でもよいが好ましくは共有結合した閉環状分子である。このような分子は自立複製ができないので、遺伝子の発現は導入された配列の一過性発現を介して生じる。あるいは、導入されたDNA配列を宿主染色体に組み込むことによって恒久的発現を生じさせてもよい。

【0220】

1つの実施態様では、所望の遺伝子配列を宿主細胞の染色体に組み込むことができるベクターを使用する。導入されたDNAがそれらの染色体に安定に組み込まれた細胞は、発現ベクターを含む宿主細胞を選択できる1つまたは複数のマーカーを導入することによっても選択できる。該マーカーは栄養要求性宿主に対して原栄養性、生物致死剤耐性例えば抗生物質または重金属例えば銅などに対する耐性を与える。選択可能マーカー遺伝子配列は発現されるべきDNA遺伝子配列に直接連結されてもよく、または、コトランスフェクションによって同じ細胞に導入されてもよい。一本鎖の結合用タンパク質mRNAの最適合成には追加の元素も必要であろう。これらの元素としては、スプライスシグナル、転写プロモーター、エンハンサー及び終結シグナルがある。このような元素を取り込んだcDNA発現ベクターとしては、Okayama, *Molec. Cell. Biol.* 3:280（1983）によって記載されたベクターがある。

【0221】

好ましい実施態様においては、導入された核酸分子がレシピエント宿主中で自立複製し得るプラスミドまたウイルスベクターに取り込まれるであろう。多様な種類のベクターのいずれかをこの目的に使用し得る。特定プラスミドまたはウイルスベクターの選択における重要な要因は、ベクターを含むレシピエント細胞をベクターを含まないレシピエント細胞から容易に識別して選択できるか、特定宿主中で望ましいベクターのコピー数が得られるか、及び、異なる種の宿主細胞間でベクターを“シャトル”できるのが望ましいか、などである。

【0222】

好ましい原核性ベクターは、大腸菌中で複製できるプラスミド、例えば、pBR322、ColE1、pSC101、pACYC184、 π VXのようなプラスミドである。このようなプラスミドは例えば、Sambrookによって開示されている（cf. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, Sambrook, Fritsch & Maniatis編, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)）。Bacillus プラスミドとしてはpC194、pC221、pT127などがある。このようなプラスミドはGryczanによって開示されている（The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, N. Y. (1982), pp. 307-329）。適当なStreptomyces プラスミドはp1J101（Kendallら, J. Bacteriol. 169: 4177-4183 (1987)）、及び、 ϕ C31のようなStreptomyces バクテリオファージである。（Chaterら, : Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54）。Pseudomonas プラスミドはJohnら（Rev. Infect. Dis. 8: 693-704 (1986)）及びIzaki（Jpn. J. Bacteriol. 33: 729-742 (1978)）に概説されている。

10

【0223】

上記に指摘したように、真核細胞宿主中のMAPKAP-2キナーゼの発現には真核細胞調節領域の使用が必要である。このような領域は一般に、RNA合成の開始を指令するために十分なプロモーター領域を含むであろう。好ましい真核細胞プロモーターは例えば、マウスのメタロチオネインI遺伝子配列のプロモーター（Hamerら, 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ら, Nature (London) 290: 304-310 (1981)）；酵母gal4遺伝子配列プロモーター（Johnstonら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 6971-6975 (1982)）；Silverら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 5951-5955 (1984)）である。

20

30

【0224】

広く知られているように、真核細胞mRNAの翻訳は第一メチオニンをコードするコドンで開始される。このため、真核細胞プロモーターとMAPKAP-2キナーゼ（またはその機能性誘導体）をコードするDNA配列との間の連鎖がメチオニンをコードし得る介在コドン（即ちAUG）を全く含まないことを確保するのが好ましい。このようなコドンが存在すると、融合タンパク質が形成されるか（AUGコドンがMAPKAP-2コーディング配列と同じ読み枠に存在するとき）、または、フレームシフト突然変異（AUGコドンがMAPKAP-2コーディング配列と同じ読み枠に存在しないとき）が生じる。

【0225】

好ましい真核細胞プラスミドとしては例えば、BPV、ワクシニア、SV40、2-ミクロンサークルなど、またはそれらの誘導体がある。これらのプラスミドは当業界で公知である（Botsteinら, 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, N. Y., p. 445-470 (1981)；Broach, Cell 28: 203-204 (1982)；Bollonら, J. Clin. Hematol. Oncol. 10: 39-48 (1980)；Maniatis: Cell Biology: A Comprehensive Treatise, V

40

50

ol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, N. Y., pp. 563-608 (1980)。

【0226】

(1つまたは複数の)構築物を含有する発現用のベクターまたは核酸分子を調製した後、(1つまたは複数の)DNA構築物を、形質転換、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、電気穿孔、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、などのような種々の適当な手段のいずれかによって適当な宿主細胞に導入し得る。ベクターの導入後、レシピエント細胞を、ベクター含有細胞の増殖を選択する選択培地で増殖させる。(1つまたは複数の)クローン化遺伝子の発現の結果、本文に開示されたMAPKAP-2キナーゼまたは生物学的に活性のそのフラグメントが産生される。これは、形質転換させただけの細胞中で行われてもよく、または、(例えば、神経芽細胞腫などにプロモデオキシウラシルを投与することによって)これらの細胞の分化を誘発した後で行われてもよい。

【0227】

本発明のペプチドを形成するために様々なインキュベーション条件を使用できる。最も好ましい条件は生理的条件の模擬条件である。

【0228】

本発明のMAPKAP-2キナーゼの調製手段の一例は、当業界で公知の方法を使用して細菌細胞、酵母細胞、両生類細胞(即ち、卵母細胞)または哺乳類細胞のような適当な宿主細胞中でMAPKAP-2キナーゼをコードする核酸を発現させ、発現されたポリペプチドを同じく公知の方法を使用して回収することである。

【0229】

ノーザンブロットまたはスロットブロット分析のような方法を使用して、MAPKAP-2キナーゼのコーディングDNAまたはRNAを含有するトランスフェクト細胞を選択できる。また、トランスフェクト細胞を分析してMAPKAP-2キナーゼを発現する細胞を同定できる。分析は例えば、機能性受容体を伴う公知のスクリーニングアッセイのいずれかを使用し、得られた値を対照である非トランスフェクト細胞に比較し、MAPKAP-2キナーゼに応答する細胞膜電流を電気生理学的にモニターするなどによって行うことができる。(1つまたは複数の)MAPKAP-2キナーゼは、MAPKAP-2キナーゼまたはそのフラグメント/部分をコードする核酸を含む発現ベクターによって形質転換させた細胞から直接的に単離できる。

【0230】

核酸分子は細胞に安定に取り込まれてもよく、または、当業界で公知の方法で一過性に導入されてもよい。安定にトランスフェクトされた哺乳類細胞は、MAPKAP-2キナーゼをコードするヌクレオチド配列を選択可能マーカー遺伝子(例えば、チミジンキナーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、ネオマイシン耐性、など)と共に含む発現ベクターを細胞にトランスフェクトし、マーカー遺伝子が発現する細胞選択条件下でトランスフェクト細胞を増殖させることによって作製するとよい。一過性トランスフェクタントを作製するために、トランスフェクション効率をモニターするリポーター遺伝子(例えば、大腸菌のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子)を哺乳類細胞にトランスフェクトする。MAPKAP-2キナーゼをコードするDNAの正確な量及び比率は実験的に決定し、特定の細胞及びアッセイ条件に最適化する。一過性トランスフェクションでは、トランスフェクタントが典型的には選択条件下で増殖しないこと、及び、通常はトランスフェクション後数日以内に分析されることを理由として、典型的には選択可能マーカー遺伝子を使用しない。

【0231】

クローン化DNAが組み込まれた細胞を同定するために、通常は選択可能マーカーを当該遺伝子またはcDNAと一緒に細胞に導入する。培養した哺乳類細胞に使用し得る好ましい選択可能マーカーとしては、ネオマイシン、ヒグロマイシン及びメソトレキセートのような薬物に耐性を与える遺伝子がある。選択可能マーカーは増幅できる選択可能マーカーでもよい。好ましい増幅できる選択可能マーカーは、DHFR遺伝子及びネオマイシン耐性遺

伝子である。選択可能マーカーに関してはThilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA、これは参照によって本発明に含まれるものとする) によって概説されている。選択可能マーカーは平均的な当業者のレベルで十分に選択できる。

【0232】

選択可能マーカーは独立のプラスミドによって当該遺伝子と同時に細胞に導入されてもよく、または、同じプラスミドによって導入されてもよい。同じプラスミドによる場合、選択可能マーカーと当該遺伝子とは異なるプロモーターのコントロール下に維持されてもよくまたは同じプロモーターのコントロール下に維持されてもよい。後者の編制は二シストロンメッセージ (dicistronic message) を生じる。この種の構築物は当業界で公知である (例えば、Levinson and Simonsen, 米国特許第4, 713, 339号)。また、細胞に導入される混合物に“キャリアーDNA”として知られる追加のDNAを加えるのが有利であろう。

【0233】

特に好ましい特徴によれば、ヘテロログスDNAを含有する真核細胞はこのようなDNAを発現し、組換えMAPKAP-2キナーゼを形成する。より好ましい特徴によれば、組換えMAPKAP-2キナーゼ活性は、非トランスフェクト宿主細胞には存在しない種類の活性なので容易に検出できる。

【0234】

ヘテロログスDNAはエピソームエレメントとして細胞中に維持されてもよく、または、細胞の染色体DNAに組み込まれてもよい。得られた組換え細胞を次に培養するかまたはこのような培養物もしくはその継代培養物から継代培養 (哺乳類の場合は継代) し得る。組換え細胞をトランスフェクション、インジェクション及び培養する方法は当業者に公知である。また、(1つまたは複数の) MAPKAP-2キナーゼを、当業者に公知のタンパク質精製方法を使用して精製し得る。例えば、MAPKAP-2キナーゼのアフィニティ精製には、MAPKAP-2キナーゼに特異的に結合する抗体またはその他のリガンドを使用するとよい。

【0235】

本文中で使用された“ヘテロログスまたは外来DNA及び／またはRNA”という表現は互換的に使用されており、それらが存在する細胞のゲノムの一部として天然に発生しないDNAもしくはRNAまたはゲノム中で天然に生じる場所とは異なる1つまたは複数の場所に見いだされるDNAもしくはRNAを意味する。典型的には、ヘテロログス又は外来DNA及びRNAは、宿主細胞に内因性でなく、細胞に人工的に導入されたDNAまたはRNAを表す。ヘテロログスDNAの例としては本文中に開示されたDNAがある。

【0236】

別の実施態様では、MAPKAP-2キナーゼをコードするDNAのin vitro転写によってmRNAが産生され得る。このmRNAを次にアフリカツメガエルの卵母細胞に注入すると、そこでRNAがMAPKAP-2キナーゼの合成を指令する。あるいは、本発明のコーディングDNAを卵母細胞に直接的に注入して機能性MAPKAP-2キナーゼを発現させてもよい。トランスフェクトした哺乳類細胞または注入された卵母細胞を次に本発明で提供される薬物スクリーニング方法に使用し得る。

【0237】

あるいは、本発明のDNA配列をRNAに転写し、該RNAを次に両生類細胞にトランスフェクトしてタンパク質に翻訳させることもできる。適当な両生類細胞としてはアフリカツメガエル卵母細胞がある。

【0238】

II. 実質的に純粋なMAPKAP-2ポリペプチド

本発明はまた、MAPKAP-2と命名された実質的に純粋なシグナル伝達キナーゼポリペプチドを提供する。このポリペプチドはヒト起原である。このポリペプチドは適当な任意の方法で作製できる。本発明のポリペプチドは、組換えによって産生されたポリペプチ

ド、合成的に産生されたポリペプチド、または、これらの方法の併用によって産生されたポリペプチドを包含する。

【0239】

本発明のMAPKAP-2キナーゼは配列番号2で表される配列によって定義されるポリペプチド（特に、成熟ポリペプチド）、及び、配列番号2のポリペプチドまたは対応部分に少なくとも80%の一致、より好ましくは配列番号2に少なくとも85%の一致、更に好ましくは少なくとも90%の一致、もっと好ましくは少なくとも95%の一致を有するポリペプチドを包含する。

【0240】

“MAPKAP-2ポリペプチド”、“MAPKAP-2タンパク質”、“本発明のポリペプチド”、“MAPKAP-2キナーゼ”という用語はすべて互換的に使用されており、配列番号2で示されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含むキナーゼポリペプチドとそのホモログを包含し、アゴニスト及びアンタゴニストポリペプチドを含む。 10

【0241】

“ポリペプチド”または“ペプチド”または“タンパク質”という用語は、アミノ酸残基の重合体及びその変異体と合成類似体とを意味しており、本文中で互換的に使用されている。従って、これらの用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が合成の非天然アミノ酸、例えば対応する天然アミノ酸の化学的類似体から成るようなアミノ酸重合体、及び、天然に発生するアミノ酸重合体にも使用される。本発明のポリペプチドとしては、実質的に配列番号2で表される配列を有しているポリペプチド即ちMAPKAP-2キナーゼが好ましい。 20

【0242】

“アミノ酸”は、重合してタンパク質を形成するサブユニットであり、タンパク質中に普遍的に見出される20種類のアミノ酸が存在する。アミノ酸の一般式は $H_2N-CH(R)-COOH$ であり、式中のR基は水素原子（アミノ酸グリシン中）から複合環（アミノ酸トリプトファン中）までのいかなる基でもよい。

【0243】

“タンパク質”という用語は、ペプチド結合によって互いに接合された5-50個またはそれ以上のアミノ酸から形成された化合物を意味する。

【0244】

“リポーター”分子は、特定のヌクレオチドまたはアミノ酸配列に会合し、それらの存在を確認し、それらを定量し得る放射性核種、酵素、蛍光物質、化学発光物質または色原性物質である。 30

【0245】

“一致”は当業界で公知のように、それぞれ2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列について、配列比較によって決定された配列間の関係である。当業界では“一致”という用語はまた、それぞれポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列について、このような配列の鎖の適合度（マッチ）によって決定された配列近縁度を意味する。

【0246】

本発明のポリペプチドMAPKAP-2（配列番号2）に関する“一致”または“相同”という用語は、候補配列と配列番号2とを位置合せし必要ならば相同パーセントが最大になるようにギャップを導入した後で候補配列中に存在する配列番号2の残基に等しいアミノ酸残基のパーセンテージであると定義される。保存性置換は配列一致部分とは考えない。N-またはC-末端の延長、欠失、挿入が一致または相同の程度を下げるとは全く考えられない。 40

【0247】

ポリペプチド配列比較用パラメーターとしては以下のパラメーターがある：

(1) アルゴリズム：Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-453 (1970) 比較マトリックス：BLOSSUM62, Hen 50

t i k o f f a n d H e n t i k o f f , P r o c . N a t l . A c a d . S c i .
U S A . 8 9 : 1 0 9 1 5 - 1 0 9 1 9 (1 9 9 2)

ギャップペナルティ：12

ギャップ長ペナルティ：4

これらのパラメーターに役立つプログラムは“ギャップ”プログラムとしてG e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , M a d i s o n W i sから公的に入手可能である。上記のパラメーターはペプチド比較用デフォルトパラメーターである（エンドギャップに対してペナルティ無し）。

【0248】

ポリペプチドの実施態様は更に、配列番号2の基準ポリペプチドに少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の一致を有するポリペプチドから成る単離ポリペプチドを含む。この場合、ポリペプチド配列は配列番号2の基準配列に等しくてもよく、または、基準配列に比べて整数個のアミノ酸変異を含んでいてもよく、この変異は少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換（保存性及び非保存性の置換を含む）または挿入から成るグループから選択されており、これらの変異は基準ポリペプチド配列のアミノもしくはカルボキシー末端位置で生じるかまたはこれらの末端位置間の任意の位置で基準配列中のアミノ酸間に個々に散在したり基準配列内に1つまたは複数の連続グループとして散在しており、アミノ酸変異の数は、配列番号2のアミノ酸の総数に一致パーセントを100で除算した整数を乗算し、得られた積を配列番号2のアミノ酸の総数から減算することによって算出される。即ち、式：

$$N a = X a - (X a Y)$$

で算出され、

式中の、Naはアミノ酸変異の数、Xaは配列番号2のアミノ酸の総数、Yは50%ならば0.50、60%ならば0.60、70%ならば0.70、80%ならば0.80、85%ならば0.85、90%ならば0.90、95%ならば0.95、97%ならば0.97、100%ならば1.00であり、乗算演算子を表す記号である。XaとYとの積が整数でないときは、Xaから減算する前に最も近い整数になるよう端数を切り捨てる。

【0249】

本文中で使用された本発明のポリペプチドの“変異体”という用語は、本発明のポリペプチドの配列に比較して1つまたは複数のアミノ酸の置換、挿入及び／または欠失をもつアミノ酸配列を有しているポリペプチドを意味する。一般に差異は、基準配列（本発明のポリペプチド）と変異体とが全体的に極めて類似しており、多くの領域で一致するという程度の限定された差異である。このような変異体は一般に生物学的に活性であり、該当ポリペプチドに対する配列一致は必然的に100%未満である。

【0250】

好ましい実施態様では、生物学的に活性の変異体は本発明のポリペプチドに少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%、更に好ましくは少なくとも約85%、いっそう好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列一致を有している。アミノ酸置換は好ましくは単一アミノ酸残基の置換である。

【0251】

本発明のポリペプチド（基準タンパク質）の“フラグメント”という用語は、野生型即ち基準タンパク質の完全アミノ酸配列の一部を含むタンパク質分子を表すことを意味する。

【0252】

本発明の好ましいポリペプチド及びポリヌクレオチドは、特にそれらにホモロガスなポリペプチド及びポリヌクレオチドと同様の生物学的機能／特性を有していると予測される。更に、本発明の好ましいポリペプチド及びポリヌクレオチドは少なくとも1つのMAPKAP-2近縁活性を有している。

【0253】

10

20

30

40

50

本文中で使用された本発明のMAPKAP-2キナーゼ（配列番号2）の活性という表現は、本発明の特徴的な活性を意味する。このような活性は典型的には1つまたは複数の *in vitro* 方法によって測定され、多くの場合に本発明の *in vivo* 活性に対応する。このような活性は例えば、第二メッセンジャー活性を測定するアッセイまたはリン酸化アッセイのような当業者に公知の任意の方法によって測定し得る。

【0254】

本発明のポリペプチド及び生物学的に活性のそれらのフラグメント及びそれらの機能的等価物はまた化学合成によって製造できる。例えば、製造業者によって提案された化学作用を使用する *Applied Biosystems, Inc. Model 430A* または *431A* の全自動ペプチドシンセサイザー（*Foster City, Calif.*）を使用して合成ポリペプチドを製造し得る。 10

【0255】

本発明はまた、許容される担体と共に、単離及び精製された本発明のポリペプチド、その活性フラグメント、精製された成熟タンパク質、その活性フラグメントのいずれかが単独でまたは互いに組合せて含まれている組成物を提供する。これらのポリペプチドまたはタンパク質は組換えによって得られてもよく、化学合成されてもよく、または、天然ソースから精製されてもよい。

【0256】

本発明のポリペプチドは“成熟”タンパク質の形態でもよく、または、融合タンパク質のようなもっと大きいタンパク質の一部であってもよい。多数のヒスチジン残基のような精製を助ける配列または組換え産生中の安定性に有利な追加の配列を含ませるのがしばしば有利である。 20

【0257】

本発明の組換えMAPKAP-2キナーゼは、発現系を含む遺伝子操作された宿主細胞から当業界で公知のプロセスによって作製できる。従って、別の特徴によれば、本発明は、1つまたは複数の本発明のポリヌクレオチドを含む発現系、このような発現系で遺伝子操作された宿主細胞、及び、組換え技術による本発明のMAPKAP-2キナーゼの産生に関する。本発明のDNA構築物に由来のRNAを使用してこのようなタンパク質を産生させるために無細胞翻訳系も使用できる。 30

【0258】

また、本発明のMAPKAP-2キナーゼの生物学的に活性のフラグメントまたは変異体も包含される。フラグメントは、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有している上記ポリペプチドのアミノ酸配列に部分的には全く同じであるが全体としては同じでないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。生物学的に活性のフラグメントは、成熟または天然型MAPKAP-2キナーゼに付随するキナーゼ活性を、類似の活性または改善された活性または望ましくない活性の低減も含めて仲介するフラグメントである。活性は、天然基質のリン酸化だけでなく合成基質のリン酸化も含む。 30

【0259】

本発明のMAPKAP-2キナーゼによって活性化（リン酸化）される有効な基質の一部を以下の表に示す。 40

公知のHsp-27（熱ショックタンパク質-27）の完全タンパク質配列。

2) Hsp-27に基づくペプチド

a) LCB-YSRALSRQL-NH₂

b) LCB-LLRGPSWD PFR-NH₂

c) LCB-RALSRQLSSGV-NH₂

Hsp-25

グリコーゲンシンターゼに基づくペプチド

a) LCB-KKLNRTL SVA-NH₂

4) CREBに基づくペプチド

a) LCB-KRREILSRRP SYRK

ここに、LCB＝長鎖ビオチン、及び、NH₂＝遊離アミン。

本発明で提供される配列に基づいて、公知の方法を使用して追加の基質を同定及び設計できる。

【0260】

本発明のMAPKAP-2ポリペプチドと同様に、フラグメントは“独立”フラグメントでもよく、または、もっと大きいポリペプチド内部に含まれて一部または一領域を形成してもよく、最も好ましくは単一連続領域として含まれていてもよい。

【0261】

好ましいフラグメントは例えば、開示されたMAPKAP-2ポリペプチドと実質的に同じアミノ酸配列を有しているが、アミノ末端を含む連続残基シリーズまたはカルボキシ末端を含む連続残基シリーズ、または、一方がアミノ末端を含み他方がカルボキシ末端を含む2つの連続残基シリーズが欠失している末端欠損ポリペプチドである。

10

【0262】

好ましくは、これらのポリペプチドのすべてが、本文中に開示されたポリペプチドの生物活性をそのキナーゼ活性も含めて保持している。従って、本発明のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも80%一致するアミノ酸配列を有するポリペプチド、または、該ポリペプチドのフラグメントであって配列番号2の対応フラグメントに少なくとも85%一致するフラグメントを包含する。

【0263】

上記に定義した配列及びフラグメントの変異体もこのグループに包含される。好ましい変異体は、保存性アミノ酸置換によって、即ち、1つの残基が類似特性をもつ別の残基で置換されることによって基準配列から変異した変異体である。このような置換の典型としては、それぞれ、Ala, Val, LeuとIle、SerとThr、酸性残基AspとGlu、AsnとGln、塩基性残基LysとArg、または、芳香族残基PheとTyrの間で生じる置換がある。数個、5-10個、1-5個または1-2個のアミノ酸が何らかの組合せで置換、欠失または付加された変異体が特に好ましい。

20

【0264】

III. ペプチド核酸即ち“PNA”

また別の実施態様では、本発明の核酸分子は、分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは溶解度を改善するために、塩基部分、糖部分またはリン酸塩主鎖で修飾され得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸塩主鎖はペプチド核酸を産生するように修飾され得る(Hyrup B. ら(1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1): 5-23参照)。本文中で使用された“ペプチド核酸”または“PNA”という用語は、デオキシリボースリン酸塩主鎖がプソイドペプチド主鎖で置換され4つの天然ヌクレオ塩基だけが保持されている核酸模擬体、例えば、DNA模擬体を意味する。PNAの中性主鎖は低イオン強度条件下でDNA及びRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを許容することが判明していた。PNAオリゴマーの合成はHyrup B. ら(1996)前出; Perry-O'Keefeら, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670-675に記載されているような標準固相ペプチド合成プロトコルを使用して行うことができる。

30

40

【0265】

新規なMAPKAP-2コーディング核酸分子のPNSは治療及び診断の用途に使用できる。例えば、転写もしくは翻訳の中断を誘発したりまたは複製を阻害することによって遺伝子発現の配列特異的調節を生じさせるアンチセンス薬剤またはアンチジーン薬剤としてPNAを使用できる。本発明の核酸分子のPNAはまた、遺伝子内部の単一塩基対の突然変異を(例えばPNA特異的PCRクランピングによって)分析するために使用でき、別の酵素(例えばS1ヌクレアーゼ(Hyrup B. ら(1996)前出)と併用するときには“人工制限酵素”として使用でき、または、DNAの配列決定用もしくはハイブリダイゼーション用のプローブもしくはプライマーとして使用できる(Hyrup B. ら(1996)前出; Perry-O'Keefe前出)。

50

【0266】

別の実施態様においては、本発明のPNAが、（例えばそれらの安定性または細胞による取り込みを増進するために）、親油性もしくは別のヘルパー基をPNAに付着させることによって、PNA-DNAキメラを形成することによって、または、リポソームもしくは当業界で公知の別の薬物デリバリー技術を使用することによって修飾され得る。例えば、本発明の核酸分子のPNA-DNAキメラは、PNAとDNAとの有利な特性を併せて有するように作製できる。

【0267】

このようなキメラでは、DNA認識酵素（例えばRNAアーゼH及びDNAポリメラーゼ）がDNA部分と相互作用でき、PNA部分は高い結合親和性及び特異性を与える。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、ヌクレオ塩基間の結合数及び配向に基づいて選択された適正長さのリンカーを使用して結合できる（Hyrup B. (1996) 前出）。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup B. (1996) 前出及びFinn P. J. ら, (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (17): 3357-63に記載された手順で行うことができる。例えば、標準ホスホラミダイト結合法を使用して固体支持体の上でDNA鎖を合成し、修飾したヌクレオシド類似体、例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシチミジンホスホラミダイト、をPNAとDNAの5'末端との中間に使用できる（Mag, M. ら (1988) *Nucleic Acid Res.* 17: 5973-88）。次に、PNAモノマーを段階的に結合させて5' PNAセグメントと3' DNAセグメントとをもつキメラ分子を作製する（Finn, P. J. ら (1996) 前出）。あるいは、5' DNAセグメントと3' PNAセグメントとを有するキメラ分子を合成してもよい（Peterser, K. H. ら (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5: 1119-11124）。

【0268】

別の実施態様では、オリゴヌクレオチドが、ペプチド（例えば、宿主細胞受容体をin vivoでターゲティングするため）、または、細胞膜透過促進剤（例えば、Letsinger ら, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556; Lemaître ら, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 648-652; PCT公開No. WO88/09810参照）、または、血液脳関門通過促進剤（例えば、PCT公開No. WO89/10134参照）のような別の付加基を含んでもよい。更に、オリゴヌクレオチドが、ハイブリダイゼーションに起動される開裂剤（例えば、Krol ら, (1988) *Bio-Techiques* 6: 958-976）またはインターカレート剤（例えばZon, (1988) *Pharm. Res.* 5: 539-549）で修飾されてもよい。このために、オリゴヌクレオチドを別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションに起動される架橋剤、輸送剤、または、ハイブリダイゼーションに起動される開裂剤）にコンジュゲートしてもよい。

【0269】

IV. 組成物

本発明はまた、シグナル伝達経路にMAPKAP-2キナーゼが含まれているとき、該シグナル伝達経路の異常を軽減する方法を提供する。MAPKAP-2キナーゼが関与する個々の成分の活性及び／またはレベルの調節を含む障害、例えば、細胞増殖障害、造血細胞障害、並びに、炎症及びリウマチ様関節炎のような免疫系の障害を治療する組成物及び方法、また、このような治療薬の同定方法が本発明の範囲に包含される。更に、このような障害の予知方法及び予知用組成物も記載されている。

【0270】

このような障害の治療方法及び治療用組成物に関しては、このような方法及び組成物の非限定例は、MAPKAP-2キナーゼとMAPKAP-2ターゲットまたは天然結合相手（NBP）との間の相互作用を抑制または阻害し得る薬剤を含む。これらは、MAPKA

P-2をリン酸化する（1つまたは複数の）上流キナーゼも包含する。あるいは、NB PがMAPKAP-2基質、例えばHsp-25などでもよい。MAPKAP-2の天然型または組換えポリペプチドとその結合相手との間の相互作用の活性及び／またはレベルを調節し得る薬剤はチロシンホスファターゼの脱リン酸化活性を阻害または抑制する薬剤を包含する。このような薬剤はまた、活性化MAPKAP-2のリン酸化活性を増進または刺激し、従って、天然基質例えばHsp-25または人工基質との相互作用をもたらす薬剤を包含する。

【0271】

このような薬剤の同定方法も記載されている。これらの方法は例えば、複合体（例えばMAPKAP-2：NB P複合体）の成分間の相互作用を破壊または阻害または促進し得る薬剤を同定するアッセイを包含し、また、このような複合体を破壊及び／または阻害及び／または促進し得る薬剤を合理的に設計する範例及び戦略を包含する。 10

【0272】

MAPKAP-2：NB P複合体が関与する障害は、例えば、このような複合体の存在が正常なシグナル伝達イベントの異常な阻害を生じさせることが原因で発症する。このような症例では、複合体の破壊によって正常なシグナル伝達イベントが回復するであろう。更に、異常な複合体は、変異した亜細胞性アダプタータンパク質の局在化を惹起し、その結果として例えば機能不全の細胞イベントが生じる。この症例では、複合体の阻害によって正常な細胞構造が回復されて維持され得る。また、複合体の破壊を惹起する1つまたは複数の薬剤は複合体の別の潜在的な成分間の相互作用の破壊を惹起し得る。 20

【0273】

上述の抗体は、1つの複合体またはそのエピトープを特異的に認識するように作製されてもよく、または、複合体の成分のいずれかに存在するエピトープ、特に成分が複合体から離れて独立に存在するときには抗体によって認識されないようなエピトープを特異的に認識する抗体であってもよい。このような抗体は例えば、生物サンプル中の複合体の検出に使用されてもよく、あるいは、複合体形成の阻害方法として、従って障害の発症を阻害するために使用されてもよい。一般に、MAPKAP-2に対する抗体に関する上述の技術は複合体（MAPKAP-2：NB P）に対する抗体に対しても使用でき、その逆も可能である。

【0274】

V. 抗-MAPKAP-2抗体及びその使用 30

本発明の別の目的は抗体に関する。例えば、（1つまたは複数の）本発明のポリペプチド、そのフラグメントまたはcDNA配列に基づくその類似体由来の免疫原を使用することによって、抗タンパク質／抗ペプチド抗血清、または、モノクローナル抗体を、標準プロトコルによって作製できる（例えば、Antibodies：A Laboratory Manual, Harlow and Lane編（Cold Spring Harbor Press：1988）参照）。これらの抗体はまた、（1つまたは複数の）ハイブリドーマを作製するため、医薬組成物を同定するため、及び、DNA／タンパク質相互作用を研究するために使用できる。

【0275】

“免疫特異的”という用語は、抗体が本発明のポリペプチドに対して従来技術の別の近縁ポリペプチドに対するよりも大きい親和性を有していることを意味する。 40

【0276】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、これらの抗体のフラグメント、及び、ヒト化形態を包含する。

【0277】

例えば、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、例えばHarlow and Lane, Antibodies：A Laboratory Manual（Cold Spring Harbor Laboratory（1988）に記載されているような当業界で公知の方法によって産生させ得る。該文献は参照によって本発明に含まれる 50

ものとする。本発明のポリペプチドはこのような抗体を産生させるときに免疫原として使用できる。あるいは、合成ペプチドを（市販のシンセサイザーを使用して）作製し、免疫原として使用することもできる。アミノ酸配列が対応ポリペプチドの疎水性ドメインをコードするかまたは親水性ドメインをコードするかを判断するためにこれらのアミノ酸配列を当業界で公知の方法によって分析できる。キメラ、ヒト化、CDRグラフトまたは二機能性の抗体のような変形抗体も当業界で公知の方法によって生産できる。このような抗体はまた、例えば、Sambrookら、前出及びHarlow and Lane、前出に記載されたハイブリドーマ、化学合成または組換え方法によって産生させ得る。抗ペプチド抗体及び抗融合タンパク質抗体も使用できる。（例えば、Bahouthら、Trends Pharmacol. Sci. 12:338 (1991)；Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, N. Y. (1989) 参照、これらは参照によって本発明に含まれるものとする）。 10

【0278】

ポリクローナル抗体は、複合体またはその抗原機能性誘導体のような抗原によって免疫感作された動物の血清から得られた抗体分子の不均一集団である。

【0279】

1つの特定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中の連続細胞系によって抗体分子を産生させる任意の技術によって得ることができる。これらの技術の非限定例は、Kohler and Milstein (Nature 256:495-497, 1975) 及び米国特許第4,376,110号のハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kosborら、Immunology Today 4:72, 1983；Coleら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030, 1983)、及び、EBV-ハイブリドーマ技術 (Coleら、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96) である。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びその任意のサブクラスを包含する任意の免疫グロブリンクラスのものでよい。本発明のmAbを産生するハイブリドーマはin vitroまたはin vivoで培養し得る。この方法は高い抗体価のmAbをin vivoで産生できるので、現在の好ましい生産方法である。 20 30

【0280】

ポリクローナル抗体を産生させるために、ウサギ、マウス、ラットなどを非限定例とする種々の宿主動物を複合体の注射によって免疫する。免疫応答を増進するために、宿主の種に従って種々のアジュバントを使用し得る。アジュバントの非限定例は、フロインド（完全及び不完全）アジュバント、リゾレシチンのようなミネラルゲル、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、ジニトロフェノール、及び、BCG (bacille Calmette-Guérin) 及びCorynebacterium parvumのような潜在的に有効なヒトアジュバントである。

【0281】

抗体を産生することが判明している動物（マウス、ウサギなど）は選択されたポリペプチドによって免疫感作できる。免疫感作方法は当業界で公知である。このような方法としては、ポリペプチドの皮下または腹腔内注射がある。免疫感作に使用するポリペプチドの量を免疫感作する動物の種類、ポリペプチドの抗原性及び注射部位に基づいて変更することは当業者に理解されよう。 40

【0282】

ペプチド抗原性を増強するためにポリペプチドを修飾してもよく、または、アジュバントに入れて投与してもよい。ポリペプチドの免疫原性を増強する方法は当業界で公知である。このような手順は、抗原とヘテロログスタンパク質（例えば、グロブリンまたはβ-ガラクトシダーゼ）との結合、または、免疫感作中のアジュバントの混在を含む。モノクロ 50

ーナル抗体については、免疫動物の脾細胞を摘出し、S P 2 / 0 - A g 1 4 骨髓腫細胞のような骨髓腫細胞に融合させ、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞にする。

【0283】

モノクローナル抗体を製造するために、連続細胞系培養物によって産生される抗体を供給する任意の技術を使用し得る。例としては、ハイブリドーマ技術 (K o h l e r , G . a n d M i l s t e i n , C . , N a t u r e (1 9 7 5) 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7) 、 トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (K o z b o r ら , I m m u n o l o g y T o d a y (1 9 8 3) 4 : 7 2) 及びEBV-ハイブリドーマ技術 (C o l e ら , M O N O C L O N A L A N T I B O D I E S A N D C A N C E R T H E R A P Y , p p . 7 7 - 9 6 , A l a n R . L i s s , I n c . , 1 9 8 5) がある。抗体の活性フラグメントは“抗体”の定義に包含される。 10

【0284】

慣用の技術によって新規なMAPKAP-2抗原に対するヒトモノクローナル抗体を作製することは容易ではないので、ヒト以外の抗体の抗原結合領域例えばF (a b ') ₂ または超可変領域を組換えDNA技術によってヒトの定常領域 (F c) または骨格領域に移して実質的にヒトの分子を作製するのが望ましい。このような方法は当業界で広く知られており、例えば、米国特許第4, 816, 397号、欧州特許公開173, 494及び239, 400に記載されている。これらの文献は参照によって本発明に含まれるものとする。あるいは、参照によって該文献に含まれるH u s e ら , S c i e n c e , 2 4 6 : 1 2 7 5 - 1 2 8 1 (1 9 8 9) に概説された汎用プロトコルに従って、ヒトB細胞からDNAライブラリーをスクリーニングし次いで所望の特異性の抗体 (または結合フラグメント) をコードする配列をクローニングし増幅することによって、ヒトのポリペプチドに特異的に結合するヒトのモノクローナル抗体またはその部分をコードするDNA配列を単離してもよい。 20

【0285】

抗体フラグメントもまた本発明の範囲内に包含される。これらは公知の技術によって作製し得る。例えば、このようなフラグメントの非限定例は、抗体分子のペプシン消化によって産生できるF (a b ') ₂ フラグメント、及び、F (a b ') ₂ フラグメントのジスルフィドブリッドを還元することによって作製し得るF a b フラグメントである。あるいは、P T K / アダプター複合体に対する所望の特異性をもつモノクローナルF a b フラグメントを迅速かつ容易に同定できるようにF a b 発現ライブラリーを構築してもよい (H u s e ら , 1 9 8 9 , S c i e n c e , 2 4 6 : 1 2 7 5 - 1 2 8 1) 。 30

【0286】

フラグメントはまた、一本鎖抗体、抗イディオタイプ (a n t i - I d) 抗体、及び、上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを包含する。一本鎖抗体の産生技術 (米国特許第4, 946, 778号) は本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体の産生にも応用できる。あるいは、一本鎖抗体を産生するために記載された技術 (米国特許第4, 946, 778号; B i r d , S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 - 4 2 6 , 1 9 8 8 ; H o u s t o n ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3 , 1 9 8 8 ; 及びW a r d ら , N a t u r e 3 3 4 : 5 4 4 - 5 4 6 , 1 9 8 9) を複合体特異的一本鎖抗体の産生に応用できる。一本鎖抗体は、アミノ酸ブリッジを介してF c 領域のH鎖フラグメントとL鎖フラグメントとを連結して一本鎖ポリペプチドとすることによって形成される。 40

【0287】

“ヒト化抗体”もまたキメラ抗体として本発明の範囲に包含される。“ヒト化抗体”の作製技術は公知であり、当業者の技術の範囲内である。本発明の抗体のヒト化形態は、キメラ化またはCDRグラフト化のような当業界で公知の手順を使用して作製し得る。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス、または、別の哺乳類を含む別の生物を使用し得る。抗体は好ましくは、免疫原性を最小にするために“実質的にヒト 50

の”であり、実質的に純粋な形態である。“実質的にヒトの”という用語は、一般には少なくとも約70%のヒト抗体配列、好ましくは少なくとも約80%のヒト抗体配列、最も好ましくはヒト体内の免疫原性を最小にするために少なくとも約90-95%またはそれ以上のヒト抗体配列を含有することを意味する。

【0288】

適正な抗原特異性をもつマウス抗体分子から得られた遺伝子を適正な生物活性をもつヒトの抗体分子と共にスプライシングすることによって“キメラ抗体”を産生するように開発された技術(Morrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855, 1984; Neubergerら, Nature, 312: 604-608, 1984; Takedaら, Nature, 314: 452-454, 1985)を使用できる。キメラ抗体は、ネズミのmAbに由来の可変領域とヒトの免疫グロブリン定常領域とを有する分子のように異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。

【0289】

別の実施態様において、本発明はサンプル中のMAPKAP-2キナーゼを検出する方法に関する。方法は、(a)サンプルを免疫複合体が形成される条件下で上述の抗体に接触させる段階と、(b)ポリペプチドに結合した上記抗体の存在を検出する段階とから成る。より詳細には、方法が、被験サンプルを1つまたは複数の本発明の抗体と共にインキュベートする段階と、抗体が被験サンプルに結合したか否かを検定する段階とを含む。サンプル中のMAPKAP-2レベルが正常レベルに比べて変化しているとき、この変化は筋疾患を示す指標となる。抗体を被験サンプルと共にインキュベートする条件は固定されていない。インキュベーション条件は、アッセイに使用されるフォーマット、使用される検出方法、並びに、アッセイに使用される抗体の種類及び特性に依存する。、常用の免疫アッセイフォーマット(例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムリンクトイムノソルベントアッセイ、拡散に基づくオクタロニー法、または、ロケット免疫蛍光アッセイなど)のいずれかを本発明の抗体が使用できるように容易に修正できることは当業者に理解されよう。こ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ら, “Techniques in Immunocytochemistry,” Academic Press, Orlando, Fla. 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)に見出すことができる。

【0290】

本発明の免疫アッセイの被験サンプルは、細胞、細胞のタンパク質抽出物もしくは膜抽出物、または、血液、血清、血漿もしくは尿のような生物体液を包含する。上述の方法に使用される被験サンプルは、アッセイフォーマット、検出方法及びアッセイサンプルとして使用される組織、細胞もしくは抽出物の種類に基づいて変更される。細胞のタンパク質抽出物または膜抽出物の調製方法は当業界で公知であり、使用システムに合うサンプルが得られるように容易に修正できる。

【0291】

別の実施態様では、本発明は上述のモノクローナル抗体またはその結合性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し得る不死化した細胞系である。一般に、モノクローナル抗体及びハイブリドーマの製造方法は当業界で公知である(Campbell, “Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,” Elsev

ier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1984); St. Grothら, J. Immunol. Methods 35: 1-21 (1980))。

【0292】

当業界で公知の多数の方法のいずれか1つを使用して所望の特徴をもつ抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定できる。これらの方法は、ELISAアッセイ、ウェスタンブロット分析またはラジオイムノアッセイによるハイブリドーマのスクリーニングを含む(Lutzら, 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、当業界で公知の手順を使用してクラス及びサブクラスを決定する(Campbell, Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 前出(1984))。ポリクローナル抗体については、上述の手順の1つを使用して、抗体含有抗血清を免疫動物から単離し、所望の特異性をもつ抗体の存在についてスクリーニングする。

【0293】

代替的な実施態様では、上述の抗体を検出可能に標識することが考察される。例えば、検出可能なマーカーを直接または間接に抗体に付着させる。有用なマーカーは例えば、放射性同位体、アフィニティラベル(例えば、ビオチン、アビジン、など)、酵素ラベル(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、など)、蛍光ラベル(FITCまたはローダミンなど)、常磁性原子などである。このような標識を行う手順は当業界で公知であり、例えば、Stembergerら, J. Histochem. Cytochem. 18: 315 (1979); Bayerら, Meth. Enzym. 62: 308 (1979); Engvalら, Immunot. 109: 129 (1972); Goding, J. Immunol. Meth. 13: 215 (1976)を参照し得る。本発明の標識抗体は、特異的ペプチドを発現する細胞または組織を同定するためのin vitro、in vivo及びin situアッセイで使用できる。

【0294】

従って、本文中では、細胞の表面で新規なポリペプチドの存在を検出する方法を考察する。1つのアッセイフォーマットでは、標識抗体、好ましくは、hMAKPAP-2を高レベル発現することが判明している体組織と反応するモノクローナル抗体を使用し、抗体に対する特異的結合を測定することによって本発明のポリペプチドを同定及び／または定量する。このアッセイは典型的には免疫複合体の形成に導く条件下で行う。非標識の第一抗体を第一抗体に反応性のラベルと組合せて使用して受容体を検出できる。例えば、第一抗体を特異的に検出できるようにした標識第二抗体によって第一抗体を間接的に検出してもよい。あるいは、抗-MAKPAP-2抗体を上述のように直接的に標識できる。放射性核種、粒子(例えば、金、フェリチン、磁気粒子、赤血球)、フルオロホア、化学発光物質、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素インヒビター、リガンド(特にハプテン)などのような多くの様々なラベルを使用し得る。

【0295】

本発明の別の実施態様では、上述の抗体を固体支持体に固定する。このような固体支持体の例は、ポリカーボネートのようなプラスチック、アガロース及びセファロースのような複合糖質、ポリアクリルアミドのようなアクリル樹脂、ラテックスビーズである。このような固体支持体に抗体を結合する技術は当業界で公知である(Weirら, "Handbook of Experimental Immunology" 4th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Chapter 10 (1986); Jacobyら, Meth. Enzym. 34 Academic Press, N. Y. (1974))。本発明の固定化抗体はin vitro、in vivo及びin situアッセイ並びにイムノクロマトグラフに使用できる。

【0296】

本発明のポリペプチドの“（１つまたは複数の）免疫活性フラグメント”も本発明に包含される。このようなフラグメントは、ターゲット免疫系（例えばネズミまたはウサギ）中でM A P K A P-2 特異的抗体を誘発し得るか、または、本発明のポリペプチド特異的抗体への結合に関して天然型M A P K A P-2 と競合し得、従って、生物サンプル中のM A P K A P-2 キナーゼの存在を検出するイムノアッセイに有用なタンパク質である。このような免疫活性フラグメントの最小サイズは典型的には8-11個の連続アミノ酸から成る。

【0297】

更に、合理的に設計された抗ペプチドペプチドを産生すべく特異的ペプチド配列に結合し得るペプチドを作製するために、当業者は、現在入手可能な手順、並びに、抗体に関して 10
上記に開示された技術、方法及びキットを容易に修正し得る。例えば、Hurbyo, “Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides”, In Synthetic Peptides, A User's Guide, W. H. Freeman, N. Y., pp. 289-307 (1992) 及びKaspaczakら, Biochemistry 28:9230-8 (1989) 参照。

【0298】

抗ペプチドペプチドは多くの方法のいずれか1つによって作製し得る。補足的に説明すると、抗ペプチドペプチドは、M A P K A P-2 キナーゼ配列中に見出される塩基性アミノ酸残基を酸性残基で置換し、疎水性及び非電荷の極性基は維持することによって産生できる。例えば、リシン、アルギニン及び／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換し、グルタミン酸残基をリシン、アルギニンまたはヒスチジンで置換する。 20

【0299】

このような抗体はまた、本発明のポリペプチドのイムノアフィニティまたはアフィニティクロマトグラフィーに使用できる。このように産生される抗体はまた、特に、哺乳類、好ましくはヒトの組織のような身体サンプル中に存在する（１つまたは複数の）本発明のポリペプチドのレベルを検出する診断方法及びシステムに使用できる。このようなポリペプチドの検出に関しては、抗体をin vitro 診断方法またはin vivo イメージング方法に使用できる。 30

【0300】

サンプル中の本発明のポリペプチドのin vitro 検出に有用な免疫手順は、検出可能な抗体を使用するイムノアッセイを包含する。このようなイムノアッセイは例えば、競合アッセイ、サンドイッチアッセイ、などを包含する。これらは例えば米国特許第4,642,285号、第4,376,110号、第4,016,043号、第3,879,262号、第3,852,157号、第3,850,752号、第3,839,153号、第3,791,932号、及び、Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, N. Y. (1988) に概説されている。これらの文献は参照によって本発明に含まれるものとする。またPandexマイクロ蛍光アッセイ、凝集アッセイ、フローサイトメトリー、血清診断アッセイ及び免疫組織化学染色手順も包含される。これらも当業界で公知である。 40

【0301】

従って、抗M A P K A P-2 抗体（例えばモノクローナル抗体）は、アフィニティクロマトグラフィーまたは免疫沈降のような標準技術によって天然M A P K A P-2 を単離するために使用できる。抗M A P K A P-2 抗体は細胞から得られた天然M A P K A P-2 の精製、及び、宿主細胞中で発現された組換え産生M A P K A P-2 の精製を促進する。更に、抗M A P K A P-2 抗体は、M A P K A P-2 タンパク質の量及び発現パターンを評価するために（例えば、細胞溶解液または細胞上清中の）M A P K A P-2 タンパク質を検出するために使用できる。抗M A P K A P-2 抗体は、例えば所与の治療計画の効果を 50

判定するための臨床試験手順の一部として、組織中のタンパク質レベルをモニターするために診断用に使用できる。検出は、抗体を検出可能な物質に結合（即ち、物理的に連結）させることによって促進され得る。検出可能な物質の例は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質及び放射性物質である。適当な酵素の例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼである。適当な補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンである。適当な蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンである。発光物質の例は、ルミノールである。生物発光物質の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンである。適当な放射性物質の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H である。 10

【0302】

サンプル中のポリペプチドの検出に抗体を使用できる平均的な当業者に公知の様々なアッセイフォーマットが存在する。例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988参照。例えば、抗体がサンプルのポリペプチドに結合しサンプルからポリペプチドを除去するように抗体を固体支持体に固定化し得る。次に、検出可能なリポーター基を有しており抗体／ペプチド複合体に結合する第二抗体を使用して結合ポリペプチドを検出し得る。あるいは、競合アッセイを使用してもよい。競合アッセイでは、固定化抗体に結合するポリペプチドをリポーター基で標識し、抗体とサンプルとのインキュベーション後に固定化抗体に結合させる。サンプルの成分による標識ポリペプチドと抗体との結合阻害の程度がサンプル中のポリペプチドのレベルを表す指標となる。これらの方法で使用し得る適当なリポーター基の非限定例は、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシターゼ）、基質、補因子、インヒビター、染料、放射性核種、発光基、蛍光基及びビオチンである。 20

【0303】

本発明の別の実施態様においては、上述のような検出方法を行うために必要なすべての試薬を含有するキットが提供される。キットは、（i）上述の抗体を収容している第一の容器手段と、（ii）該抗体の結合相手とラベルとから成るコンジュゲートを収容している第二の容器手段とから成る。 30

【0304】

代替実施態様では、キットが更に、1つまたは複数の以下の成分を収容している1つまたは複数の別の容器を含む：洗浄用試薬、及び、結合抗体の存在を検出し得る試薬。検出用試薬の非限定例は、標識第二抗体であるか、あるいは、第一抗体が標識されているときは、標識抗体と反応し得るクロモホア試薬、酵素試薬、抗体結合試薬である。核酸プローブキットに関して上述したような区画化キットでもよい。

【0305】

本発明に記載された抗体を当業界に公知の既成のキットフォーマットの1つに容易に組み込めることは当業者に容易に理解されよう。

【0306】

VI. 本発明の使用及び方法

本発明の（1つまたは複数の）ポリペプチド（キナーゼポリペプチド）は哺乳類宿主に遍在性であると仮定され、多くの病態も含めた多くの生物機能の一因である。従って、一方では本発明ポリペプチドを刺激する化合物または薬物、他方では本発明ポリペプチドの機能を阻害し得る化合物または薬物を見出すことが望ましい。

【0307】

より特定的には、本文中に記載した核酸分子、タンパク質、タンパク質ホモログ及び抗体は以下の方法の1つまたは複数に使用できる：（a）スクリーニングアッセイ；（b）予測医学、即ち、診断アッセイ、予知アッセイ、モニター用臨床試験；及び、（c）治療方法、即ち、治癒及び予防。 40

【0308】

本発明の核酸は例えば、本発明のポリペプチドを発現させるため、MAPKAP-2 mRNAまたはMAPKAP-2コーディング遺伝子中の遺伝子変異を検出するため、及び、MAPKAP-2活性を調節するために後述するように使用できる。MAPKAP-2キナーゼは、MAPKAP-2キナーゼもしくはその天然基質の過少発現もしくは過剰発現またはMAPKAP-2キナーゼ特異的インヒビターもしくはアゴニストの産生を特徴とする障害を治療するために使用できる。また、本発明のポリペプチドは、天然産生MAPKAP-2基質をスクリーニングするため、MAPKAP-2活性を調節する治療薬もしくは化合物をスクリーニングするため、または、野生型MAPKAP-2と比較して活性低下もしくは活性異常を示すMAPKAP-2キナーゼを産生させるために使用し得る。更に、抗MAPKAP-2抗体は、MAPKAP-2キナーゼの検出及び単離、MAPKAP-2ポリペプチドの造影及び体内利用効率の調節、並びに、MAPKAP-2活性の調節に有用であろう。“MAPKAP-2ポリペプチドまたはキナーゼ”という用語が好ましくは、実質的に配列番号2で表される配列を有するポリペプチドであることを理解されたい。

10

【0309】

A. スクリーニングアッセイ

本文中に記載されたシグナル伝達キナーゼ、即ち、本発明のポリペプチドまたはMAPKAP-2キナーゼ、その免疫原性フラグメントもしくはオリゴペプチドは、様々な薬物スクリーニング技術のいずれかで治療用化合物をスクリーニングするために使用できる。このような試験で使用するフラグメントは溶液中に遊離していてもよく、固体支持体に固着されていてもよく、細胞表面に支持されてもよく、または、細胞内に局在してもよい。

20

【0310】

細胞ベースのアッセイ

細胞ベースのアッセイは、MAPKAP-2キナーゼに結合するか、例えばMAPKAP-2発現もしくはMAPKAP-2活性を刺激もしくは阻害する効果を有しているか、または、例えばMAPKAP-2基質の発現もしくは活性を刺激もしくは阻害する効果を有しているモジュレーターを同定するため、即ち、モジュレーターの候補となるかもしくはモジュレーターとして試験される化合物もしくは薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模擬体、小分子またはその他の薬物）を同定するために使用できる。

30

【0311】

本文中で使用された本発明のポリペプチドの“活性を調節する”化合物またはシグナルという表現は、化合物またはシグナルの存在下で本発明のポリペプチドが化合物またはシグナルの非存在下とは異なる活性を示すように本発明のポリペプチドの活性を変更する化合物またはシグナルを表す。より特定的には、このような化合物またはシグナルはアゴニスト及びアンタゴニストである。このような活性は一般に、本文中に記載した慣用のアッセイを使用して検出される。

【0312】

分子ライブラリーの合成方法の例は、当業界で例えばDeWittら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:6909 (1993); Zuckermanら, J. Med. Chem. 37:2678 (1994)に見出される。

40

【0313】

化合物のライブラリーは溶液中（例えば、Houghten Biotechniques 13:412-421 (1992)、または、ビーズ上（Lam, Nature 354:82-84 (1991)）、チップ（Fodor Nature 364:555-556 (1993)）、細菌（米国特許第5,223,409号）、胞子（米国特許第5,223,409号）、プラスミド（Cullら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869 (1992)）またはファージ（Scott and Smith, Science 249:386-390 (1990)）に与えられる。

50

【0314】

従って、組換えまたは天然のMAPKAP-2キナーゼをコードするDNAまたはRNAの発現、並びに、本発明のポリペプチドの機能を*in vivo*で調節する化合物のスクリーニング方法は本発明の範囲内に包含される。これらの活性を調節する化合物は、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質または非タンパク質性有機分子である。化合物は、新規なシグナル伝達キナーゼポリペプチドをコードするDNAもしくはRNAの発現またはその機能を増進または減退させることによって調節し得る。本発明のポリペプチドをコードするDNAもしくはRNAの発現またはポリペプチドの機能を調節する化合物は様々なアッセイによって検出し得る。

【0315】

アッセイは、発現または機能の変化の有無を判定する簡単な“イエス／ノー”アッセイでもよい。被験サンプルの発現または機能を標準サンプルの発現または機能のレベルに比較することによってアッセイを定量的にしてもよい。

【0316】

従って、本発明の実施態様として、シグナル伝達キナーゼポリペプチドの活性を調節する化合物の同定方法を期待し得る。該方法は、シグナル伝達キナーゼ活性のモジュレーターであると推測される候補化合物を、実質的に配列番号2で表される配列を有するシグナル伝達キナーゼに組合せる段階と、キナーゼ活性に対するモジュレーター候補化合物の効果、すなわち、Hsp-27のようなMAPKAP-2基質をリン酸化するMAPKAP-2の能力を測定する段階とから成る。

【0317】

従って、1つの目的によれば、本発明は、MAPKAP-2キナーゼ活性を調節する試薬の同定方法であって、MAPKAP-2キナーゼを被験試薬と共にインキュベートする段階と、MAPKAP-2基質をリン酸化するMAPKAP-2キナーゼの能力に対する被験試薬の効果を測定する段階とから成る方法を提供する。

【0318】

あるいは、シグナル伝達キナーゼの活性を調節する化合物の同定方法が、シグナル伝達キナーゼ活性のモジュレーター候補化合物と実質的に配列番号2で表される配列を有するシグナル伝達キナーゼ分子を発現する宿主細胞とを組合せる段階と、キナーゼ活性に対するモジュレーター候補化合物の効果を測定する段階とから成る。キナーゼのインヒビターに関する好ましい細胞アッセイはほぼ2種類、即ち、(1)キナーゼ活性の直接測定、及び、(2)シグナル伝達カスケードの下流イベントの測定、に大別される。これらの方法は、内因性キナーゼまたは過剰発現した組換えキナーゼを使用できる。従って、MAPKAP-2シグナル伝達経路の活性化は、³²P取り込み速度の定量によって測定されるような、基質例えばHsp-27のリン酸化速度によるMAPKAP-2キナーゼ活性の測定を含み得る。Hsp-27または別の適当なMAPKAP-2基質は宿主細胞によって同時に発現されてもよく、または代替的には、基質が外部から添加されてもよい。

【0319】

本文中で使用された“MAPKAP-2基質”という用語は、MAPKAP-2基質、例えば、Hsp-27、Hsp-25のような天然基質を意味してもよく、当業者に公知の人工基質を意味してもよい。

【0320】

“MAPKAP-2活性の調節”という用語は、阻害効果または刺激効果を包含する。本発明は、MAPKAP-2活性を阻害する試薬のスクリーニングに特に有用である。このような試薬は、MAPKAP-2に仲介される障害、例えば、炎症及び酸化性損傷の治療または予防に有効である。

【0321】

ポリペプチド変異体及び本文中で検討したその他の薬剤を評価するために使用されるMAPKAP-2キナーゼアッセイは、Hsp-27または別のMAPKAP-2基質をリン酸化し、これによってMAPKAP-2を活性にする（即ち、Hsp-27のような基質

10

20

30

40

50

を *in vivo* リン酸化し得る) 化合物の能力を評価する任意のアッセイを包含する。このような方法に使用し得る MAPKAP-2 キナーゼは、内因性タンパク質またはその変異体でもよく、精製タンパク質または組換えタンパク質でもよく、平均的な当業者に明らかな様々な技術のいずれかを使用して製造し得る。

【0322】

例えば、MAPKAP-2 をコードする cDNA は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 及び平均的な当業者に公知の方法を使用して適当なヒト cDNA ライブラリーから PCR 増幅によってクローニングし得る。MAPKAP-2 は、公表された配列に基づくプライマーを使用してクローニングし得る (Derijard ら, Science 267: 682-685, 1995)。MAPKAP-2 cDNA を次に細菌性発現ベクターにクローニングし、標準技術を使用して大腸菌のような細菌中でタンパク質を産生させるとよい。細菌性発現ベクターは、組換えタンパク質が N-末端または C-末端にエピトープを含むようにグルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質 (GST) のようなエピトープをコードする DNA を含んでいてもよいが、必ずしも含んでいなくてもよい。

10

【0323】

MAPKAP-2 ターゲット分子/基質をリン酸化する MAPKAP-2 の能力は例えば *in vitro* キナーゼアッセイによって測定できる。簡単に説明すると、MAPKAP-2 基質分子、例えば免疫沈降した MAPKAP-2 基質分子 (例えば、Hsp-27) を、このような分子を発現している細胞系から採取し、MAPKAP-2 キナーゼ及び放射性 ATP 例えば [γ - ^{32} P] ATP と共に、50 mM の HEPES pH 8、10 mM の MgCl₂、1 mM の DTT、100 μ M の ATP を含有する適当なバッファ中、30°C で 60 分間インキュベートできる。一般には、約 50 ng-1 μ g のポリペプチド及び 50 ng の組換え MAPKAP-2 を 2-7 cpm/fmol [γ - ^{32} P] ATP と共に使用すれば十分である。インキュベーション後、免疫沈降した MAPKAP-2 基質分子を還元条件下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、膜例えば PVDF 膜に移し、オートラジオグラフにかける。オートラジオグラフ上に検出可能バンドが出現するとき、これは、MAPKAP-2 基質、即ち、Hsp-27 がリン酸化されたことを示す指標となる。

20

【0324】

MAPKAP-2 ターゲット基質への [γ - ^{32} P] リン酸塩の取り込みは、ホスファイメージャー (phosphorimager) を使用する技術のような平均的な当業者に公知の技術を使用して定量し得る。ポリペプチド変異体の基質特異性を評価するためには、Hsp-27 に代えて別の MAPKAP-2 基質を使用する以外は上述とほぼ同様にしてキナーゼアッセイを行うとよい。

30

【0325】

また、MAPKAP-2 基質のどの残基がリン酸化されたかを判定するためにリン酸化基質のホスホアミノ酸解析を行うことができる。簡単に説明すると、放射性リン酸化タンパク質バンドを SDS ゲルから切り出し、部分的酸加水分解処理する。次に生成物を表面的 (one-dimensional) 電気泳動によって分離し、例えば、ホスホイメージャー (phosphorimager) で解析し、ニンヒドリン染色したホスホアミノ酸標準に比較する。

40

【0326】

キナーゼの細胞活性を測定するためのソースは、標準プロテアーゼインヒビターの存在下で 1-3 回の冷凍-解凍サイクルを行って調製した全細胞溶解液でよい。あるいは、標準タンパク質精製法によってキナーゼを部分的または完全に精製してもよい。最後に、本文中に記載した C 末端調節ドメインに特異的な抗体を使用するアフィニティクロマトグラフィーによってまたはやはり本文中に記載した組換えキナーゼに組み込んだエピトープタグに特異的なリガンドによってキナーゼを精製し得る。次に、キナーゼ調製物を従来技術に記載の活性アッセイにかける。

【0327】

50

M A P K A P - 2 がリン酸化によって活性化されるか否かを判断するために、エピトープタグを添付したかまたは不添付のM A P K A P - 2 の基質、例えばH s p - 2 7 を使用して、結合 i n v i t r o キナーゼアッセイを行うこともできる。代替バッファを使用でき、このようなバッファの組成はキナーゼ活性の有意な変化を伴うことなく変更できることに注目されたい。反応物をS D S - P A G E によって分離し、オートラジオグラフィーによって可視化し、様々な公知技術のいずれかを使用して定量する。このようなアッセイを使用すると、活性化M A P K A P - 2 はバックグラウンドを少なくとも5 % 上回るレベルでH s p - 2 7 をリン酸化し得るであろう。

【0328】

M A P K A P - 2 基質リン酸化の特異性は、H s p - 2 7 の活性化測定によって試験できるだけでなく、M A P K A P - 2 リン酸化部位の欠失した突然変異H s p - 2 7 を代わりに使用することによって試験できる。対照値に比べた基質のリン酸化の変化は、M A P K A P - 2 シグナル伝達経路の変化、及び、被験者の体内でM A P K A P - 2 仲介障害の危険性が増大していることを示す指標となる。

【0329】

本発明の1つの実施態様は、イムノキナーゼアッセイを使用するサンプル中の活性M A P K A P - 2 キナーゼの検出に関する。簡単に説明すると、標準技術を使用してM A P K A P - 2 キナーゼの非反復配列に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を誘発する。細胞抽出物のような被験サンプルを抗M A P K A P - 2 抗体と共にインキュベートしてM A P K A P - 2 キナーゼを免疫沈降させ、免疫沈降した物質を次に基質（例えばH s p - 2 7 ）と共に、基質リン酸化に適した条件下でインキュベートする。基質リン酸化のレベルは一般に、本文中に記載したような様々なアッセイのいずれかを使用して測定できる。

【0330】

シグナル伝達キナーゼの生物活性を調節する化合物の同定方法も好ましい。該方法は、シグナル伝達キナーゼ活性のモジュレーター候補化合物と実質的に配列番号2で表される配列をもつシグナル伝達キナーゼとを組合せる段階と、合成、機能または活性のような生物活性に対するモジュレーター候補化合物の効果を測定する段階とから成る。

【0331】

1つの実施態様では、スクリーニングアッセイは、M A P K A P - 2 プロモーターに作動可能に連結されたりポーター遺伝子がトランスフェクトされた細胞を被験化合物に接触させる段階と、リポーター遺伝子の発現レベルを測定する段階とから成る。リポーター遺伝子は例えば、色、蛍光、発光、細胞生存率、細胞栄養要求の軽減、細胞増殖及び薬物耐性のような検出可能シグナルを生じさせる遺伝子産物をコードし得る。例えばリポーター遺伝子は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼ及びアルカリホスファターゼから成るグループから選択される遺伝子産物をコードし得る。

【0332】

シグナル伝達キナーゼの薬理活性を調節する化合物の同定方法も好ましい。方法は、シグナル伝達キナーゼ活性のモジュレーター候補化合物と実質的に配列番号2で表される配列を有するシグナル伝達キナーゼとを組合せる段階と、薬理活性に対する候補化合物の効果を測定する段階とから成る。

【0333】

サンプル中のM A P K A P - 2 キナーゼ活性の検出に加えて、サンプル中のM A P K A P - 2 のレベルを検出する方法も提供される。M A P K A P - 2 キナーゼまたはポリヌクレオチドのレベルは一般に、M A P K A P - 2 キナーゼ、D N A またはm R N A に結合する試薬を使用して測定され得る。

【0334】

代表的な細胞ベースのアッセイは、M A P K A P - 2 の活性を調節する被験化合物の能力の測定に基づく。この場合、M A P K A P - 2 の活性を調節する被験化合物の能力を測定

する段階は、例えば、実質的に配列番号2で表される配列を有するシグナル伝達キナーゼ分子が被験化合物または試薬に結合または相互作用する能力を測定することによって行う。MAPKAP-2キナーゼを検出するための試薬は典型的には抗体であり、抗体は本文中に記載の手順で調製し得る。

【0335】

1つの好ましい実施態様では、MAPKAP-2ターゲット分子に結合または相互作用するMAPKAP-2の能力の測定は、ターゲット分子の活性を測定することによって行う。例えば、ターゲット分子（基質）の活性は、ターゲットの細胞性第二メッセンジャー（例えば、細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、 IP_3 、など）の誘発を検出するか、ターゲット及び適当な基質の触媒／酵素活性を検出するか、リポーター遺伝子（検出可能マーカー、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする核酸に作動可能に連結されたターゲット応答性調節エレメントから成る）の誘発を検出するか、または、ターゲットに調節された細胞応答を検出することによって測定できる。

10

【0336】

一般に、実質的に配列番号2で表される配列のシグナル伝達分子の生物活性及び／または薬理活性を調節するための、本文中に記載され、考察され、引用された方法に従って同定される化合物は本発明の特に好ましい実施態様である。

【0337】

別の実施態様は、シグナル伝達キナーゼポリペプチドまたはそのフラグメントに対する特異的結合アフィニティに基づいて複数の化合物をスクリーニングする方法を提供する。方法は、

20

（i）複数の化合物を準備する段階と、

（ii）本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントと複数の化合物の各々とを、適当な条件下で結合し得るに十分な時間組合せる段階と、

（iii）複数の化合物の各々に対するキナーゼポリペプチドまたはそのフラグメントの結合を検出し、これによってシグナル伝達キナーゼポリペプチドに特異的に結合する化合物を同定する段階と、から成る。

【0338】

本発明のまた別の実施態様は、MAPKAP-2活性のアゴニストまたはアンタゴニストの検出方法を提供する。方法は、実質的に配列番号2で表される配列を有するポリペプチドを発現する細胞を化合物の存在下でインキュベートする段階と、ポリペプチド活性レベルの変化を検出する段階とから成る。このようにして同定された化合物は、化合物の存在の指標となる活性変化を生じさせるであろう。好ましい実施態様では、化合物が複合混合物、例えば、血清、体液または細胞抽出物中に存在する。化合物が同定された後、当業界で公知の技術を使用して化合物を単離できる。

30

【0339】

好ましい実施態様では、方法が、（a）（i）実質的に配列番号2で表される配列を有するポリペプチドと、（ii）MAPKAP-2結合相手／基質と、（iii）被験化合物とを含む反応混合物を形成する段階と、（b）ポリペプチドと結合相手との間の相互作用を検出する段階から成る。被験化合物の非存在下に比した被験化合物の存在下のポリペプチドと結合相手との間の相互作用の統計的に有意な変化（相乗または阻害）は、被験化合物がMAPKAP-2生物活性の潜在的なアゴニスト（模擬体または相乗剤）またはアンタゴニスト（インヒビター）であることを示す指標となる。反応混合物は、無細胞タンパク質調製物、例えば、再構成タンパク質混合物または細胞溶解液でもよく、または、MAPKAP-2結合相手を組換え的に発現するヘテロログス核酸を含む組換え細胞でもよい。

40

【0340】

好ましい実施態様では、MAPKAP-2とMAPKAP-2結合相手との間の相互作用を検出する段階は競合結合アッセイである。別の好ましい実施態様では、MAPKAP-2ポリペプチド及びMAPKAP-2結合相手の少なくとも一方が検出可能ラベルを含み

50

、M A P K A P - 2 とM A P K A P - 2 結合相手との間の相互作用は複合体中のラベルを検出することによって定量される。検出可能ラベルは例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子である。別の実施態様では、複合体をイムノアッセイによって検出する。

【0341】

別の実施態様においては、本発明は哺乳類のM A P K A P - 2 付随活性を作動させる（刺激する）かまたは該活性に拮抗する方法を提供する。方法は、実質的に配列番号で表される配列を有するアゴニストまたはアンタゴニストを、作動または拮抗の効果を生じさせるに十分な量で該哺乳類に投与する段階から成る。

【0342】

本発明の好ましい実施態様は、配列番号2のような本文中に記載のヒトシグナル伝達ポリペプチドによって仲介される状態の治療を要する患者の治療方法である。方法は、本発明で考察される方法で実質的に配列番号2で表される配列を使用して薬理学的ターゲットとして同定されたヒトシグナル伝達調節化合物を有効量で投与する段階から成る。

【0343】

好ましい実施態様では、本発明は、リウマチ様関節炎のような哺乳類の炎症関連疾患をM A P K A P - 2 活性のアゴニストまたはアンタゴニストで治療する方法に関する。方法は、M A P K A P - 2 付随機能を作動させるかまたは該機能に拮抗するために十分な量のアゴニストまたはアンタゴニストを哺乳類に投与する段階から成る。

【0344】

無細胞アッセイ

M A P K A P - 2 キナーゼまたはその結合相手または基質と相互作用し得る化合物を同定し、これによってポリペプチドまたは結合相手の活性を修飾するために無細胞アッセイも使用できる。このような化合物は、ポリペプチドの活性に対して効果を有し得る。無細胞アッセイはまた、M A P K A P - 2 キナーゼとその天然の結合相手／ターゲット分子／基質、即ちH s p - 2 7 との間の相互作用を調節する化合物を同定するために使用できるであろう。

【0345】

代表的な無細胞スクリーニングアッセイは、M A P K A P - 2 キナーゼポリペプチドまたはその機能性フラグメントと被験化合物または被験化合物のライブラリーとを両者間の複合体の形成に有利な条件下で接触させる段階と、複合体の形成を検出する段階とを含む。検出目的でポリペプチドを特定マーカで標識し、被験化合物または被験化合物のライブラリーを異なるマーカで標識できる。被験化合物とM A P K A P - 2 キナーゼまたはそのフラグメントのような結合相手との相互作用は、インキュベーション段階及び洗浄段階後の2つのラベルのレベルを測定することによって検出できる。洗浄段階後の2つのラベルの存在が相互作用を示す指標となる。

【0346】

別の実施態様では、アッセイが、M A P K A P - 2 キナーゼポリペプチドまたはその生物活性部分とM A P K A P - 2 キナーゼに結合する既知の化合物とを接触させてアッセイ混合物を形成させる段階と、アッセイ混合物を被験化合物に接触させる段階と、M A P K A P - 2 キナーゼと相互作用する被験化合物の能力を測定する段階とを含み、ポリペプチドと相互作用する被験化合物の能力を測定する段階は、被験化合物が既知化合物に比べてM A P K A P - 2 キナーゼポリペプチドまたはその生物活性部分に優先的に結合するという能力の測定から成る。

【0347】

代替的な無細胞アッセイでは、M A P K A P - 2 キナーゼポリペプチドまたはその生物活性部分を被験化合物に接触させ、M A P K A P - 2 キナーゼまたはその生物活性部分の活性を調節（刺激または阻害）する被験化合物の能力を測定する。M A P K A P - 2 キナーゼの活性を調節する被験化合物の能力の測定は例えば、上述のような直接結合測定方法の1つによってM A P K A P - 2 ターゲット分子（基質）に結合するM A P K A P - 2 キナ

10

20

30

40

50

ーゼの能力を測定することによって行うことができる。

【0348】

MAPKAP-2 ターゲット分子に結合するMAPKAP-2 キナーゼポリペプチドの能力の測定はまた、リアルタイムの生体分子相互作用分析 (Biomolecular Interaction Analysis (BIA)) のような技術を使用して行うことができる。Sjolander, S. and Urbaniczky, C., Anal. Chem. 63: 2338-2345 (1991)。本文中で使用された“BIA”という用語は、いずれの相互作用体 (例えばBIACore) も標識することなくリアルタイムの生体特異的相互作用を研究する技術である。表面プラスモン共鳴 (surface plasmon resonance (SPR)) の光学的現象を生物分子間のリアルタイム反応の指標として使用できる。 10

【0349】

いずれの相互作用体も標識することなくMAPKAP-2 キナーゼとそのターゲット分子との間の相互作用を調節する化合物の能力を測定する代替的实施態様では、MAPKAP-2 とそのターゲット分子との相互作用を検出するためにマイクロ生理機能測定計 (microphysiometer) の使用が提案される。マイクロ生理機能測定計はMAPKAP-2 及びそのターゲット分子のいずれをも標識することなく相互作用を検出するために役立つ。McConnell, H. M. O., (1992) Science 257: 1906-1912。本文中で使用された“マイクロ生理機能測定計” (例えば細胞センサ) という用語は、光アドレス可能な電位差測定センサ (light-addressable potentiometric sensor (LAPS)) を使用して細胞がその周囲環境を酸性化する速度を測定する分析用計器である。この酸性化速度の変化を化合物と結合相手との間の相互作用の指標として使用できる。 20

【0350】

上述のような本発明のアッセイ方法の2つ以上の実施態様においては、複合体化した形態のタンパク質が複合体化しない形態のタンパク質から容易に分離できまたアッセイの全自動化に適応するようにMAPKAP-2 キナーゼまたはそのターゲット分子を固定化するのが望ましい。被験化合物とMAPKAP-2 キナーゼとの結合、または、候補化合物の存在下及び非存在下のMAPKAP-2 キナーゼとターゲット分子との相互作用は、反応体の収容に適した任意の容器で行わせることができる。このような容器の例は、マイクロタイタープレート、試験管、微量遠心管である。1つの実施態様では、一方または双方のタンパク質をマトリックスに結合させ得るドメインを付加する融合タンパク質を供給し得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/MAPKAP-2 融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/ターゲット融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着させ、次いで、被験化合物と合せるかまたは被験化合物及び非吸着ターゲットタンパク質もしくはMAPKAP-2 キナーゼと合せて、複合体の形成に導く条件下 (例えば、生理的条件の塩及びpH) で混合物をインキュベートする。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートのウェルを洗浄して未結合成分を除去し、またビーズの場合には固定化マトリックスも除去し、例えば上述の手順で複合体を直接または間接に測定する。あるいは、複合体をマトリックスから解離させ、MAPKAP-2 キナーゼ結合活性のレベルを標準技術を使用して測定することもできる。 30 40

【0351】

タンパク質をマトリックスに固定化する別の技術も本発明のスクリーニングアッセイに使用できる。例えば、ビオチンとストレプトアビジンとのコンジュゲーションを利用してMAPKAP-2 キナーゼまたはMAPKAP-2 ターゲット分子を固定化できる。ビオチニル化MAPKAP-2 キナーゼまたはターゲット分子は、当業界で公知の技術 (例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill) を使用してビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) から調製し、ストレ 50

プトアビジンをコートした96ウェルのプレート(Pierce Chemical)に固定化する。

【0352】

あるいは、MAPKAP-2キナーゼまたはターゲット分子に反応性であるがMAPKAP-2キナーゼとターゲット分子との結合を妨害しない抗体をプレートのウェルに誘導体化し、未結合のターゲットまたはMAPKAP-2キナーゼを抗体コンジュゲーションによってウェルに捕獲させてもよい。このような複合体検出方法としては、GST-固定化複合体に関して上述した方法以外にも、MAPKAP-2キナーゼまたはターゲット分子に反応性の抗体を使用する複合体の免疫検出、並びに、MAPKAP-2キナーゼまたはターゲット分子に付随する酵素活性の検出を利用するエンザイムリンクトアッセイがある 10

【0353】

本発明の範囲内に包含されるこのような方法の1つは、シグナル伝達経路障害を調節する被験薬剤の能力を同定する方法である。方法は、少なくとも1つの薬剤とMAPKAP-2キナーゼとを該薬剤が該タンパク質に結合し得る十分な時間接触させる段階と、未結合の薬剤を除去する段階と、タンパク質に結合した化合物の存在を測定し、これによってMAPKAP-2キナーゼ複合体が関与する障害を調節する被験薬剤の能力を同定する段階とから成る。

【0354】

代替的な実施態様では、MAPKAP-2キナーゼの活性を調節する被験化合物の能力の測定が、MAPKAP-2ターゲット分子(例えばMAPKAP-2仲介シグナル伝達経路成分、例えばHsp-27)の活性を更に調節するMAPKAP-2キナーゼの能力を測定することによって行われる。例えば、適正ターゲットに対するエフェクター分子の活性を測定するか、または、適正ターゲットに対するエフェクターの結合を上述のように測定できる。 20

【0355】

また別の実施態様では、MAPKAP-2発現のモジュレーターが、細胞を候補化合物に接触させ、細胞内のMAPKAP-2 mRNAまたはタンパク質の発現を測定する方法によって同定される。候補化合物の存在下のMAPKAP-2 mRNAまたはタンパク質の発現レベルを、候補化合物の非存在下のMAPKAP-2 mRNAまたはタンパク質の発現レベルに比較する。次に、比較に基づいて候補化合物をMAPKAP-2発現のモジュレーターとして同定する。例えば、MAPKAP-2 mRNAまたはポリペプチドの発現が候補化合物の存在下では非存在下よりも大きい(統計的に有意に大きい)とき、候補化合物はMAPKAP-2 mRNAまたはポリペプチド発現の刺激物質(アゴニスト)であると同定される。あるいは、MAPKAP-2 mRNAまたはポリペプチドの発現が候補化合物の存在下で非存在下よりも小さい(統計的に有意に小さい)とき、候補化合物はMAPKAP-2 mRNAまたはポリペプチド発現の阻害物質(アンタゴニスト)であると同定される。細胞内のMAPKAP-2 mRNAまたはポリペプチドの発現レベルは、本文中に記載のMAPKAP-2 mRNAまたはポリペプチドの検出方法によって測定できる。 30 40

【0356】

本発明のまた別の特徴によれば、MAPKAP-2キナーゼはツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイで、MAPKAP-2に結合するかまたは相互作用し(“MAPKAP-2-結合タンパク質”または“MAPKAP-2-bp”)MAPKAP-2活性に関与する別のタンパク質を同定するための“おとり(bait)タンパク質”として使用できる(例えば、米国特許第5,238,317号;Zervosら,Cel172:223-232(1993);及びBrent WO94/10300参照)。このようなMAPKAP-2結合タンパク質は、MAPKAP-2キナーゼまたは例えばMAPKAP-2仲介シグナル伝達経路の下流エレメントのようなMAPKAP-2ターゲットによるシグナルの伝播に関与するらしいと考えられる。あるいは、このよう 50

なM A P K A P-2結合タンパク質が、M A P K A P-2阻害物質であるらしいとも考えられる。

【0357】

ツーハイブリッドシステムは、多くの転写因子がモジュール性であることに基づく。転写因子は、分離可能なD N A結合ドメインと活性化ドメインとから構成されている。簡単に説明すると、アッセイは2つの異なるD N A構築物を利用する。1つの構築物中では、M A P K A P-2タンパク質をコードする遺伝子が既知の転写因子（例えば、G A L-4）のD N A結合ドメインをコードする遺伝子に融合している。別の構築物中では、D N A配列のライブラリーに由来し未同定のタンパク質（“獲物”または“サンプル”）をコードする1つのD N A配列が既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合している。“おとり”タンパク質及び“獲物”タンパク質がi n v i v o相互作用してM A P K A P-2依存性複合体を形成することができるならば、転写因子のD N A結合ドメインと活性化ドメインとが極めて近接する。この近接によって転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されているリポーター遺伝子（例えば、L a c Z）の転写が可能になる。リポーター遺伝子の発現を検出でき、機能性転写因子を含有する細胞コロニーを単離でき、M A P K A P-2キナーゼと相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を得るために使用できる。

【0358】

従って、本文中に記載のようにして同定した薬剤を適当な動物モデルに更に使用することも本発明の範囲内に包含される。例えば、本文中に記載のようにして同定された薬剤（例えば、M A P K A P-2調節剤、アンチセンスM A P K A P-2核酸分子、M A P K A P-2特異的抗体またはM A P K A P-2結合相手）は、このような薬剤による治療の効力、毒性または副作用を測定するために動物モデルに使用し得る。

【0359】

あるいは、本文中に記載のようにして同定された薬剤をこのような薬剤の作用メカニズムを判定するために動物モデルに使用できる。更に、本発明は、上述のようなスクリーニングアッセイによって同定された新規な薬剤を本文中に記載のような治療に使用することに関する。

【0360】

B. 検出アッセイ

本文中で同定されたc D N A配列（及び対応する完全遺伝子配列）の部分またはフラグメントは、ポリヌクレオチド試薬として多くの用途に使用できる。例えば、これらの配列は、（i）サンプル中のM A P K A P-2をコードするヌクレオチド配列を検出するため、（i i）染色体上でそれぞれの遺伝子をマップし、これによって遺伝病に関連する遺伝子領域の所在を検出するため、（i i i）少量の生物サンプルから個体を同定する（組織タイピング）ために使用できる。これらの用途は以下の項目に記載されている。遺伝子産物も本文中に記載のように使用できる。

【0361】

（i）サンプル中の検出

実質的に配列番号2で表される配列を有するポリペプチドをコードする核酸を検出するために、核酸プローブまたはP C Rプライマーを使用する標準ハイブリダイゼーション及び／またはP C R技術を使用するとよい。適当なプローブ及びプライマーは本文中に提供されM A P K A P-2 c D N A配列に基づいて平均的な当業者によって設計され得る。

【0362】

従って、M A P K A P-2の発現レベルの測定はノーザンブロット分析によって行うことができる。ポリアデニル化[ポリ(A)⁺] m R N Aを被験サンプルから単離する。m R N Aを電気泳動によって分画し、膜に転移させる。膜を標識M A P K A P-2 c D N Aによってプローブする。別の実施態様では、発現されたm R N Aに応用した定量的P C RによってM A P K A P-2発現を測定する。

【0363】

10

20

30

40

50

別の実施態様では、被験試薬とMAPKAP-2ポリヌクレオチド発現ベクターをトランスフェクトした細胞とを一緒にインキュベートし、MAPKAP-2転写に対する被験試薬の効果を上述のようにノーザンブロット分析によって測定する。

【0364】

別の実施態様では、被験サンプル中のMAPKAP-2の発現レベルを測定することによってMAPKAP-2シグナル伝達経路の活性化を測定する。特定実施態様では、MAPKAP-2の発現レベルをウェスタンブロット分析によって測定する。サンプル中に存在するタンパク質をゲル電気泳動によって分画し、膜に転移させ、MAPKAP-2に対する標識抗体でプローブする。

【0365】

MAPKAP-2ターゲット分子に結合または相互作用するMAPKAP-2キナーゼの能力の測定は、直接結合の測定によって行う。MAPKAP-2ターゲット分子に結合または相互作用するMAPKAP-2キナーゼの能力の測定を行うために、例えば、MAPKAP-2キナーゼを放射性同位体または酵素ラベルに結合すると、複合体中の標識MAPKAP-2キナーゼを検出することによってMAPKAP-2ターゲット分子に対するMAPKAP-2キナーゼの結合を測定できる。例えば、MAPKAP-2分子、特にMAPKAP-2キナーゼを¹²⁵I、³⁵S、¹⁴Cまたは³Hによって直接または間接に標識し、放射性同位体を放射線放出の直接カウンティングまたはシンチレーションカウンティングによって検出する。

【0366】

あるいは、MAPKAP-2キナーゼ分子を、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはルシフェラーゼによって酵素標識し、適当な基質から生成物への変換を測定することによって酵素ラベルを検出してよい。

【0367】

(i i) 染色体マッピング

本発明の核酸分子は染色体の同定にも有効であろう。(1つまたは複数の)配列は個々のヒト染色体の特定位置に特異的にターゲットされ、該位置とハイブリダイズする。本発明に従って染色体に適正配列をマッピングすることは、配列と遺伝子関連疾患との相関関係を知るための重要な第一歩である。配列を正確な染色体位置にマッピングすると、染色体上の配列の物理的位置と遺伝子地図データとの相関関係がわかる。(このようなデータは例えば、Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手し得るV. McKusick, Mendelian Inheritance in Manに見出される)。次に、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾病との関係を、例えばEgeland, Jら, Nature, 325:783-787(1987)に記載された連鎖分析(物理的に隣接の遺伝子の同時遺伝(co-inheritance))によって同定できる。病気に罹った個体と罹っていない個体との間のcDNAまたはゲノム配列の違いも決定できる。1つの突然変異が罹患個体の幾つかまたは全部に観察されるが正常個体には全く観察されないとき、該突然変異が疾病の原因因子である可能性が大きい。

【0368】

例えば、1つの配列(または該配列の一部)を単離したとき、この単離配列は染色体上の遺伝子の位置をマップするために使用できる。このプロセスは染色体マッピングと呼ばれる。従って、本文中に記載されたMAPKAP-2をコードする(1つまたは複数の)ヌクレオチド配列(配列番号1)の部分またはフラグメントは染色体上のMAPKAP-2コーディング遺伝子の位置をマップするために使用できる。

【0369】

一例として、MAPKAP-2コーディング遺伝子は、本文中に開示したMAPKAP-2ヌクレオチド配列からPCRプライマー(好ましくは15-25塩基対の長さ)を調製することによって染色体にマップできる。MAPKAP-2配列のコンピューター解析は、ゲノムDNA中の2個以上のエクソンにまたがるため増幅プロセスを複雑にするという

10

20

30

40

50

ことのないプライマーを予測するために使用できる。その後、これらのプライマーを個々のヒト染色体を含有する体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングに使用できる。MAPKAP-2配列に対応するヒト遺伝子を含有するハイブリッドだけが増幅フラグメントを生じるであろう。

【0370】

体細胞ハイブリッドは、種々の哺乳類（例えばヒト及びマウスの細胞）に由来の体細胞を融合させることによって調製する。ヒト及びマウスの細胞のハイブリッドは増殖及び分裂に伴って、ヒト染色体を無作為順序で次第に失うがマウス染色体は保持する。特定酵素が欠失しているのでマウス細胞は増殖できないがヒト細胞は増殖できる培地を使用することによって、必要な酵素をコードする遺伝子を含む1つのヒト染色体が保持されるであろう。種々の培地を使用することによってハイブリッド細胞系のパネルを作製し得る。パネル中の各細胞は単一のヒト染色体または少数のヒト染色体とマウス染色体の全セットとを含み、個々の染色体を特定のヒト染色体に容易にマッピングできるであろう（D'Eustachio P. ら（1983）Science 220：919-924）。 10

【0371】

また、転位及び欠失のあるヒト染色体を使用することによってヒト染色体のフラグメントだけを含有する体細胞ハイブリッドも作製できる。体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは特定の配列を特定の染色体に対応させる迅速な手順である。1個のサーマルサイクラーを使用して1日あたり3つ以上の配列に対応させることができる。オリゴヌクレオチドプライマーを設計するためにMAPKAP-2ヌクレオチド配列を使用し、特定染色体に由来のフラグメントのパネルによって詳細な位置決定（sublocalization）を行うことができる。別のマッピング戦略としては、in situハイブリダイゼーション（Fan, Y. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87：6223-27（1990）に記載）、標識され流動選別（flow-sorting）された染色体によるプレスクリーニング、及び、染色体へのハイブリダイゼーションによる予備選択がある。 20

【0372】

中期染色体分布（spread）に対するDNA配列の蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）は更に、正確な染色体位置を1段階で与えるために使用できる。染色体分布は紡錘体を破壊するコルセミドのような化学物質によって中期の分裂が阻止された細胞を使用して作製できる。 30

【0373】

染色体はトリプシンで簡単に処理でき、次いでギムザ染色できる。各染色体上に明暗バンドのパターンが現われ、それによって染色体を個々に同定できる。FISH技術では500または600塩基という短いDNA配列を使用できる。しかしながら、1,000塩基よりも大きいクローンのほうが非反復染色体位置に十分なシグナル強度で結合し易いので、検出が容易である。妥当な時間内に好結果が得られるクローンの長さは好ましくは1,000塩基、より好ましくは2,000塩基で十分であろう。この技術の概要に関しては、Vermaら, Human Chromosomes：A Manual of Basic Techniques（Pergamon Press, New York 1988）を参照されたい。 40

【0374】

単一染色体または該染色体上の単一部位をマークするために染色体マッピング用試薬を個々に使用でき、または、多数部位及び／または多数染色体をマークするために試薬パネルを使用できる。実際には、マッピング目的には遺伝子の非コーディング領域に対応する試薬が好ましい。コーディング配列は遺伝子ファミリー中に保存され易い配列であり、従って染色体マッピング中のクロスハイブリダイゼーションの機会が多い。

【0375】

更に、MAPKAP-2コーディング遺伝子に関連する疾病に罹患した個体と罹患していない個体との間のDNA配列の違いを決定し得る。1つの突然変異が罹患個体の幾つかま 50

たは全部で観察されるが非罹患個体では観察されないならば、該突然変異が該疾病の原因因子である可能性が高いと推測してもよい。罹患した個体と非罹患の個体との比較は一般に、染色体分布から観察できるかまたはDNA配列に基づくPCRを使用して検出できる欠失または転位のような構造変化染色体中で探す段階を含む。最終的には、複数の個体から得られた遺伝子の完全な配列決定を行って、突然変異の存在を確認したり突然変異を多型性から識別したりすることができる。

【0376】

(iii) 組織タイピング

本発明のMAPKAP-2配列はまた微量生物サンプルから個体を同定するために使用できる。例えば米軍は個人の身元確認に制限断片長多型(restriction fragment length polymorphism (RFLP))を使用することを考察している。この技術では、個人のゲノムDNAを1つまたは複数の制限酵素によって消化し、サザンブロットでプローブして身元確認用の非反復バンドを生じさせる。この方法では、消失したり切り離されたりまたは奪われたりするので確実な身元確認が難しい現行の“Dog Tags”の欠点が解消される。本発明の配列はRFLPに対する追加のDNAマーカーとして役立つ(米国特許第5,272,057号に記載)。

【0377】

更に、本発明の配列は、個人のゲノムの選択された部分の実際のDNA配列を1塩基ずつ決定する代替的技術を提供するために使用できる。即ち、本文中に記載されたMAPKAP-2ヌクレオチド配列は、該配列の5'端及び3'端から2つのPCRプライマーを調製するために使用できる。次にこれらのプライマーを使用して個人のDNAを増幅し、引き続いて該DNAを配列決定することができる。

【0378】

この方法で作製した個人に対応するDNA配列のパネルはその人だけの身元確認手段を提供する。対立遺伝子が異なるので各人が有しているこのようなDNA配列のセットは一つしかないからである。本発明の配列は、個人及び組織からこのような身元確認用配列を得るために使用できる。本発明のMAPKAP-2ヌクレオチド配列はヒトゲノムの部分を一つだけ表す。

【0379】

これらの配列のコーディング領域ではある程度までの対立遺伝子変異が生じ、非コーディング領域ではもっと高い程度の対立遺伝子変異が生じる。一人の人間で対立遺伝子変異は500塩基毎にほぼ一回の頻度で生じると推測される。本文中に記載の配列の各々は、身元確認の目的で個人のDNAを比較するための標準としてある程度まで使用できる。何故なら、非コーディング領域に生じる多型の数が多いほど個人の識別に必要な配列の数が少ないからである。

本文中に記載のMAPKAP-2ヌクレオチド配列から得られた試薬パネルを個人のその人だけの身元確認用データベースの作製に使用するならば、後でその人の組織を同定するためにも同じ試薬を使用できる。その人だけの身元確認用データベースを使用すると、極めて少ない組織サンプルから生死にかかわらず個人の身元確認を確実に行うことができる。

【0380】

本文中に記載のMAPKAP-2ヌクレオチド配列は更に、脳組織のような特定組織の同定に例えばin situハイブリダイゼーション技術で使用する標識プローブまたは標識可能プローブのようなポリヌクレオチド試薬を提供するために使用できる。

【0381】

同様にして、上記に引用したプローブまたはMAPKAP-2プライマーはまた、組織培養物を汚染に基づいてスクリーニングする(即ち、培養物中の異なるタイプの細胞の混合物の存在をふるいにかける)ために使用できる。

【0382】

C. 予測医薬

10

20

30

40

50

本発明はまた予測医学に関する。個体を予防的に治療するために予知（予測）目的で使用する診断用アッセイ、予知アッセイ、及び、臨床試験のモニタリングなどは少なくとも部分的には、新規なMAPKAP-2遺伝子の同定、及び、該遺伝子でコードされたMAPKAP-2キナーゼの被験者体内における発現レベル及び／または機能に影響を及ぼすような遺伝子及び関連経路の遺伝子中の変化に基づく。

【0383】

機能不全に関連するヒトMAPKAP-2コーディング遺伝子の突然変異形態は、ヒトMAPKAP-2キナーゼの過少発現、過剰発現または変質発現の結果として生じる疾病の診断または疾病に対する感受性の診断を強化または確定するための診断用ツールを提供するであろう。MAPKAP-2のコーディング遺伝子に突然変異を含む個体はDNAレベルで様々な技術によって検出し得る。 10

【0384】

本文中に記載の診断用アッセイを使用して得られた情報は（単独でまたは同じ疾病の一因となる別の遺伝子欠陥に関する情報と共に）、被験者が炎症関連障害の発症の原因となるかまたは一因となる遺伝子欠陥（例えば、MAPKAP-2遺伝子の欠陥またはMAPKAP-2遺伝子の発現を調節する遺伝子の欠陥）を有することを予知、診断または確認するために役立つ。予知情報に基づいて医師は個体のMAPKAP-2遺伝子の異常発現を特徴とする病理状態の発症を予防または延期するために有効な養生法（例えば食事及び運動）または治療プロトコルを推薦できる。

【0385】

更に、個体に（1つまたは複数の）MAPKAP-2遺伝子またはタンパク質の欠陥または欠損を生じさせる1つまたは複数の特定の変異に関する情報（MAPKAP-2遺伝子プロフィール）は、単独でまたは炎症関連障害の一因となる別の遺伝子欠陥に関する情報と共に、個体の遺伝子プロフィールに合わせて個別の療法を設計するという“薬理遺伝子学（pharmacogenomics）”の目標に到達し得る。例えば、医師は個体のMAPKAP-2遺伝子プロフィールに基づいて、（1）潜んでいるMAPKAP-2関連障害に対する薬物をいっそう効果的に処方でき、また、（2）特定個体に対する特定薬物の適正用量をより賢明に決定し得る。 20

【0386】

例えば、MAPKAP-2キナーゼタンパク質の発現レベルは、単独でまたは同じ疾患の一因となることが判っている別の遺伝子の発現レベルと共に、多くの患者で疾病の様々な時期に測定でき、該疾病の転写または発現プロフィールを作成し得る。個々の患者の発現パターンを次に該疾病の発現プロフィールに比較して、患者に投与すべき適正な薬物及びその用量を決定し得る。 30

【0387】

MAPKAP-2または疾病の遺伝子プロフィールに基づいて最も高い臨床効果を示すと予想される集団をターゲットすることができれば、（1）市場実績がよくない市販薬物の地位回復、（2）安全性及び薬効が患者サブグループ特異的であるという制約の結果として臨床開発が中断されている薬物候補の救済、及び、（3）薬物候補及びもっと最適な薬物の標識のいっそう速くかつ廉価な開発（例えば、MAPKAP-2をマーカーとして使用することは最適な有効用量を知るために役立つ）が可能になる。 40

【0388】

従って、本発明の1つの目的は、生物サンプル（例えば、血液、血清、細胞、組織）に関してMAPKAP-2キナーゼ及び／または核酸の発現並びにMAPKAP-2の活性を測定し、これによって個体が疾病もしくは障害に罹患しているかまたはMAPKAP-2の異常な発現もしくは活性に関連する疾患を発症する危険があるか否かについて判定する診断アッセイに関する。

【0389】

本発明は更に、個体がMAPKAP-2キナーゼ、核酸の発現または活性に関連する障害を発症する危険があるか否かを判定する予知（または予測）アッセイを提供する。例えば 50

、生物サンプル中でM A P K A P－2 遺伝子の突然変異を検定できる。このようなアッセイは予知または予測目的で使用され、これによってM A P K A P－2 キナーゼ、核酸の発現または活性を特徴とするまたは関連する障害の発症よりも前に個体を予防的に治療することができる。本発明の別の目的は、臨床試験中のM A P K A P－2 の発現または活性に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響のモニタリングに関する。

【0390】

上記及びその他の薬剤を以下の項でより詳細に説明する。

【0391】

（i）診断用アッセイ

本発明は、被験者が、免疫関連の炎症性障害を発症させるようなM A P K A P－2 の異常活性、例えばM A P K A P－2 タンパク質の異常レベルまたは異常生物活性に関連する疾病、状態または障害を発症しているか（診断）または発症の危険があるか（予測）を判定する手段を提供する。 10

【0392】

従って、本発明の1つの目的は、被験者が免疫関連障害を発症しているかまたは発症し易いことを判定する方法を提供する。方法は、M A P K A P－2 遺伝子またはタンパク質のレベル、M A P K A P－2 の生物活性のレベル及び／またはM A P K A P－2 遺伝子中の突然変異もしくは特定の多型変異体の存在を測定する段階からなる。

【0393】

1つの実施態様では、方法は、被験者がM A P K A P－2 の異常なm R N A及び／またはタンパク質レベルを示すか否かを、ノーザンブロット分析、逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応（R T－P C R）、i n s i t u ハイブリダイゼーション、免疫沈降、ウェスタンブロットハイブリダイゼーションまたは免疫組織化学などによって判定する段階を含む。 20

【0394】

該方法によれば、被験者から細胞を採取し、M A P K A P－2 タンパク質またはm R N A レベルを測定し、健康な被験者のM A P K A P－2 タンパク質またはm R N A レベルに比較する。M A P K A P－2 キナーゼまたはm R N A の異常レベルはM A P K A P－2 の異常活性を示す指標となり得る。

【0395】

別の実施態様では、方法が、M A P K A P－2 の少なくとも1つの活性を測定する段階を含む。例えば、M A P K A P－2 遺伝子の発現の調節を例えば本文中に記載の手順で測定する。得られた結果と健康な被験者のM A P K A P－2 タンパク質に対して行った同様の分析の結果との比較は、被験者がM A P K A P－2 の異常活性を示すか否かに関する指標となる。 30

【0396】

本発明の別の実施態様は、生物サンプル中のM A P K A P－2 キナーゼまたは核酸の有無を検出するために、被験者から生物サンプルを採取する段階と、生物サンプルをM A P K A P－2 キナーゼまたはM A P K A P－2 キナーゼをコードする核酸（例えば、m R N A、ゲノムD N A）を検出し得る化合物または薬剤に接触させて、生物サンプル中のM A P K A P－2 キナーゼまたは核酸の存在を検出する段階から成る方法を提供する。好ましくは、M A P K A P－2 m R N A またはゲノムD N A を検出するために使用される薬剤は、サンプル中に存在し得るM A P K A P－2 m R N A またはゲノムD N A にハイブリダイズし得る標識核酸プローブである。核酸プローブは例えば、配列番号1の核酸のようなヒトM A P K A P－2 核酸、または、好ましくはサンプル中に存在すると推測されるM A P K A P－2 m R N A またはゲノムD N A に緊縮条件下で特異的にハイブリダイズすべく十分な長さのその一部分でよい。本発明の診断用アッセイに使用し得る別の適当なプローブは本文中に記載されている。 40

【0397】

あるいは、薬剤が配列番号1の遺伝子産物、即ち、ヒトM A P K A P－2 キナーゼに特異的な抗体のような標識ラベルでもよい。抗体はポリクローナルでもよいが、より好ましく 50

はモノクローナルである。完全形の抗体またはそのフラグメント（例えば、F a bまたはF（a b'）₂）を使用できる。前述のように、プローブまたは抗体に関する“標識された”という用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体に結合させる（即ち、物理的に連結する）ことによって行うプローブまたは抗体の直接標識、並びに、直接標識されている別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を包含する。

【0398】

間接標識の例は、蛍光標識第二抗体を使用する第一抗体の検出、及び、蛍光標識ストレプトアビジンで検出できるようなビオチンによるDNAの末端標識を包含する。

【0399】

“生物サンプル”という用語は、被験者から単離された組織、細胞及び生物流体並びに被験者の体内に存在する組織、細胞及び流体を包含する。即ち、本発明の検出方法は、*in vitro*及び*in vivo*の生物サンプル中のMAPKAP-2 mRNA、タンパク質またはゲノムDNAを検出するために使用できる。MAPKAP-2 mRNAを検出するための*in vitro*技術としてはノーザンハイブリダイゼーション及び*in situ*ハイブリダイゼーションがある。サンプル中のMAPKAP-2 キナーゼまたはそのフラグメントの有無を検出する*in vitro*技術としては、エンザイムリンクトイムノソルベントアッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降及び免疫蛍光がある。また、MAPKAP-2ゲノムDNAを検出する*in vitro*技術としては、サザンハイブリダイゼーションがある。

【0400】

従って、本発明の1つの実施態様は、サンプル中のMAPKAP-2の存在を検出する方法であって、（a）該サンプルを上述の核酸プローブにハイブリダイゼーションが生じる条件下で接触させる段階と、（b）該核酸分子に結合した該プローブの存在を検出する段階とから成る方法に関する。当業者は上述のような当業者に公知の技術に従って核酸プローブを選択し得る。被験サンプルの非限定例はヒト組織のRNAサンプルである。

【0401】

別の実施態様では、方法が更に、対照被験者から対照生物サンプルを採取する段階と、対照サンプルをMAPKAP-2 キナーゼ、mRNAまたはゲノムDNAに、MAPKAP-2 キナーゼ、mRNAまたはゲノムDNAが生物サンプル中で検出されるように接触させる段階と、対照サンプル中のMAPKAP-2 キナーゼ、mRNAまたはゲノムDNAの存在と被験サンプル中のMAPKAP-2 キナーゼ、mRNAまたはゲノムDNAの存在とを比較する段階とを含む。

【0402】

MAPKAP-2 キナーゼを検出する*in vivo*技術は、被験者体内に標識抗MAPKAP-2 キナーゼ特異的抗体を導入する段階を含む。例えば、被験者の体内でその存在及び位置を標準造影技術によって検出できる放射性マーカーで抗体を標識できる。

【0403】

生物サンプル中のヒトMAPKAP-2 キナーゼの有無を検出するキットも提供される。例えば、キットは生物サンプル体内のMAPKAP-2 キナーゼまたはmRNAを検出し得る標識化合物または薬剤、サンプル中のMAPKAP-2の量を測定する手段、及び、サンプル中のMAPKAP-2の量を標準に比較する手段とを含み得る。化合物または薬剤は適当な容器に包装できる。キットは更に、MAPKAP-2 キナーゼまたは核酸を検出するためのキットの使用説明書を含む。

【0404】

（ii）予知アッセイ

本文中に記載の予知方法は更に、MAPKAP-2の異常な発現または活性に関連する疾病または障害を発症しているかまたは発症の危険がある患者を同定するために利用できる。例えば、前述の診断用アッセイまたは後述するアッセイのような本文中に記載のアッセイは、MAPKAP-2 キナーゼ、核酸の発現または活性に関連する障害を発症しているかまたは発症の危険がある患者を同定するために利用できる。

【0405】

その結果として、MAPKAP-2キナーゼの異常な発現または活性に関連する疾病または障害の同定方法が提供される。方法は、被験者から被験サンプルを採取し、MAPKAP-2キナーゼまたは核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出する段階から成り、サンプル中にMAPKAP-2キナーゼまたは核酸が存在するとき、被験者がMAPKAP-2の異常な発現または活性に関連する疾病または障害を発症しているかまたは発症の危険があると診断する。

【0406】

本文中で使用された“被験サンプル”という用語は、該当被験者から採取した生物サンプルを意味する。例えば、被験サンプルは生物体液（例えば、血清）、細胞サンプルまたは組織である。

【0407】

更に、本文中に記載の予知アッセイはまた、MAPKAP-2の異常な発現または活性に関連する疾病または障害を治療するために1つの薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模擬体、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、またはその他の薬剤候補）を患者に投与できるか否かを判断するために使用できる。

【0408】

上記に従って、MAPKAP-2の異常な発現または活性に関連する障害に対して1つの薬剤で患者を効果的に治療できるか否かを判断する方法が提供される。方法は、MAPKAP-2の異常な発現または活性に関連する病的状態が発症する危険があると推測される被験者から被験サンプルを採取し、次いでMAPKAP-2キナーゼまたは核酸の発現または活性を検出する段階を含み、多量のMAPKAP-2キナーゼまたは核酸の発現または活性が検出されたときは患者であると診断し、このような患者に対しては、MAPKAP-2の異常な発現または活性に関連する疾病の治療薬を投与できる。

【0409】

上述したような本発明の方法はまた、MAPKAP-2遺伝子中の遺伝子変化を検出し、遺伝子変化が生じた被験者にMAPKAP-2遺伝子に関連する疾病の危険があるか否かを判断するために使用できる。好ましい実施態様ではこの方法は、被験者の細胞サンプル中で、MAPKAP-2ポリペプチドをコードする遺伝子の完全性またはMAPKAP-2遺伝子のミス発現に影響を与える変化の少なくとも1つを特徴とする遺伝子変化の有無を検出する段階を含む。

【0410】

このような遺伝子変化は、（1）MAPKAP-2のコーディング遺伝子からの1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、（2）MAPKAP-2遺伝子に対する1つまたは複数のヌクレオチドの付加、（3）MAPKAP-2遺伝子の1つまたは複数のヌクレオチドの置換、（4）MAPKAP-2遺伝子の染色体転位、（5）MAPKAP-2遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルの変化、（6）ゲノムDNAのメチル化パターンのようなMAPKAP-2遺伝子の異常修飾、（7）MAPKAP-2遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、（8）MAPKAP-2ポリペプチドの非野生型レベル、（9）MAPKAP-2遺伝子の対立遺伝子の消滅、及び、（10）MAPKAP-2ポリペプチドの不適正な翻訳後修飾、の少なくとも1つの存在を確認することによって検出できる。

【0411】

その他のMAPKAP-2関連疾病またはその異常発現に付随する病的状態は、患者から採取したサンプルからMAPKAP-2発現の異常な減少または増加レベルを判断する方法によって診断できる。発現の減少または増加は、例えばPCR、RT-PCR、RNAアーゼ保護、ノーザンブロット法及びその他のハイブリダイゼーション方法のような当業界で公知のポリヌクレオチド定量方法のいずれかを使用してRNAレベルで測定できる。宿主から採取したサンプル中の実質的に配列番号2で表される配列を有するポリペプチドのレベルを測定するために使用できるアッセイ技術は当業者に公知である。このようなアッ

10

20

30

40

50

セイ方法としては、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析及びELISAアッセイがある。

【0412】

代表的な実施態様では、変化の検出が、アンカーPCRもしくはRACE PCRのようなポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(例えば、米国特許第4,683,195号及び第4,683,202号参照)、あるいは、結合連鎖反応(LCR)(例えばLandegranら(1988)Science 241:1077-1080;及びNakazawaら(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364参照)におけるプローブ/プライマーの使用を包含する。後者の反応はMAPKAP-2遺伝子の点突然変異の検出に特に有効である(Abravayaら(1995)Nucleic Acids Res. 23:675-682参照)。この方法は、患者から細胞のサンプルを収集する段階と、サンプルの細胞から核酸(例えば、ゲノム、mRNAまたは双方)を単離する段階と、MAPKAP-2遺伝子(存在するならば)のハイブリダイゼーション及び増幅が生じるような条件下でMAPKAP-2コーディング遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つまたは複数のプライマーに核酸サンプルを接触させる段階と、増幅産物の有無を検出するかまたは増幅産物のサイズを検出し、その長さを対照サンプルに比較する段階とを含み得る。PCR及び/またはLCRは予備増幅段階として、本文中に記載の突然変異検出に使用される技術のいずれかと共に使用されるのが望ましい。

【0413】

代替的な増幅方法は、自立配列複製(Guatelli, J. C. ら, (1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅系(Kwoh, D. Y. ら, (1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-ベータレプリカーゼ(Lizardi, P. M. ら(1988)Bio-Technology 6:1197)、または、その他の任意の核酸増幅方法、次いで当業者に公知の技術を使用する増幅分子の検出を含む。これらの検出スキームは特に、核酸分子が極めて少ない数で存在する場合にこのような核酸分子を検出するために有効である。

【0414】

サンプル細胞中のMAPKAP-2遺伝子の突然変異はまた制限酵素開裂パターンの変化によって同定できる。例えば、サンプル及び対照のDNAを単離し、(場合によっては)増幅し、1つまたは複数の制限エンドヌクレアーゼによって消化し、フラグメント長サイズをゲル電気泳動によって測定し比較する。サンプル及び対照のDNA間のフラグメント長サイズの違いは、サンプルDNA中の突然変異を示す指標となる。更に、リボザイム開裂部位の発達または消滅によって特異的突然変異の存在数を算定するために配列特異的リボザイムを使用できる(例えば、米国特許第5,498,531号参照)。

【0415】

別の実施態様では、MAPKAP-2コーディング遺伝子中の遺伝子突然変異は、サンプル及び対照の核酸、例えばDNAまたはRNAを数百また数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイにハイブリダイズさせることによって同定できる(Cronin, M. T. ら(1996)Human Mutation 7:244-255; Kozai, M. J. ら, (1996)Nature Medicine 2:753-759)。

【0416】

例えば、MAPKAP-2の遺伝子突然変異は、Cronin, M. T. ら, 前出、に記載のような発光DNAプローブを含有する二次元アレイ中で同定できる。簡単に説明すると、第一のハイブリダイゼーションプローブアレイを使用してサンプル及び対照中のDNAの長い鎖部分を走査し、順次にオーバーラップするプローブの直線状アレイによって配列間の塩基変化を同定する。この段階で点突然変異を同定し得る。この段階後の第二のハイブリダイゼーションアレイでは、検出されたすべての変異または突然変異に相補的なもっと小さい専用プローブアレイを用いて特異的突然変異を特性決定できる。突然変異アレ

イの各々は、一方が野生型遺伝子に相補的であり他方が突然変異遺伝子に相補的である平行プローブセットから構成される。

【0417】

また別の実施態様では、当業界で公知の様々な配列決定反応のいずれかを使用してMAPKAP-2コーディング遺伝子を直接的に配列決定し、サンプルMAPKAP-2の配列と対応する野生型（対照）配列とを比較することによって突然変異を検出できる。配列決定反応の例は、Maxam and Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560 (1977) または Sanger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977) によって開発された技術に基づく反応である。また、診断用アッセイ (Biotechniques 19:448, (1995)) を行うときには、質量分析法による配列決定のような様々な全自動配列決定手順のいずれかを利用できると考えられる（例えば、PCT国際公開No. WO94/16101; Cohenら, Adv. Chromatogr. 36:127-162 (1996); 及びGriffinら, Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159 (1993) 参照）。 10

【0418】

MAPKAP-2 遺伝子中の突然変異を検出する別の方法は、RNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロ二本鎖中のミスマッチ塩基を検出するために開裂剤からの保護を使用する方法である (Myersら, Science 230:1242, (1995))。一般に、“ミスマッチ開裂”の技術では、先ず、野生型MAPKAP-2配列を含有する（標識した）RNAまたはDNAと組織サンプルから得られた突然変異体の可能性があるRNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成されたヘテロ二本鎖を準備する。二重鎖にした二本鎖を、対照鎖とサンプル鎖との間の塩基対ミスマッチが原因で二本鎖中に存在するような一本鎖領域を開裂する試薬によって処理する。例えば、RNA/DNA二本鎖をRNAアーゼで処理し、DNA/DNAハイブリッドをS1ヌクレアーゼで処理すると、ミスマッチ領域を酵素消化できる。別の実施態様では、ミスマッチ領域を消化するためにDNA/DNAまたはRNA/DNA二本鎖をヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムとピペリジンとによって処理できる。ミスマッチ領域の消化後、得られた物質を次に変性用ポリアクリルアミドゲル上でサイズ分離して突然変異部位を決定する。例えば、Cottonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397 (1988); Saleebaら, Methods Enzymol. 217:286-295 (1992) 参照。好ましい実施態様では、対照DNAまたはRNAを検出用に標識できる。 20 30

【0419】

更に別の実施態様では、ミスマッチ開裂反応で、所定の系における二重鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する1つまたは複数のタンパク質（いわゆる“DNAミスマッチ修復酵素”）を使用し、細胞のサンプルから得られたMAPKAP-2 cDNA中の点突然変異を検出しマッピングする。例えば、大腸菌のmut Y酵素はG/AミスマッチでAを開裂し、HeLa細胞のチミジンDNAグリコシラーゼはG/TミスマッチでTを開裂する (Hsuら, Carcinogenesis 15:1657-1662 (1994))。代表的な実施態様によれば、MAPKAP-2配列、例えば野生型MAPKAP-2配列に基づくプローブを（1つまたは複数の）被験細胞から得られたcDNAまたは別のDNA産物にハイブリダイズさせる。二本鎖をDNAミスマッチ修復酵素で処理し、開裂産物があれば、これを電気泳動プロトコルなどによって検出できる。例えば、米国特許第5,459,039号参照。 40

【0420】

別の実施態様では、電気泳動移動度の変化を使用してMAPKAP-2コーディング遺伝子中の突然変異を同定してもよい。

【0421】

別の方法は、突然変異核酸と野生型核酸との電気泳動移動度の差異を検出するために一本 50

鎖コンホメーション多型 (single strand conformation polymorphism (SSCP)) を使用する (Oritaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 86: 2766 (1989), Hayashi, Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79 (1992))。サンプル及び対照のMAPKAP-2核酸の一本鎖DNAフラグメントを変性させ、次いで再生させる。一本鎖核酸の二次構造は配列に応じて違っており、生じた電気泳動移動度の変化からたった1つの塩基変化であっても検出できる。DNAフラグメントを標識プローブによって標識または検出してもよい。アッセイの感度は、(DNAでなく)RNAを使用することによって強化される。RNAのほうが配列変化に対する二次構造の感度が高いからである。好ましい実施態様では、本発明の方法が、二重鎖ヘテロ二本鎖分子を電気泳動移動度の変化に基づいて分離するヘテロ二本鎖分析を利用する (Keenら, Trends Genet. 7: 5 (1991))。 10

【0422】

また別の実施態様では、変性用勾配ゲル電気泳動 (denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)) を使用して、変性剤の勾配を含むポリアクリルアミドゲル中の突然変異フラグメントまたは野生型フラグメントの移動を検定する (Myersら, (1985) Nature 313: 495)。分析方法としてDGGEを使用するとき、例えば約40bpのGCに富む高融点DNAのGCクランプをPCRで付加することによってDNAが完全には変性しないことを確保するためにDNAを修飾する。別の実施態様では、対照DNAとサンプルDNAとの移動度の差異を同定するために変性用勾配に代えて温度勾配を使用する (Rosenbaum and Reissner, Biophys. Chem. 265: 12753 (1987))、米国特許US6, 146, 841。 20

【0423】

点突然変異を検出する別の技術の非限定例は、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または、選択的プライマー延長である。例えば、既知の突然変異が中央に配置されたオリゴヌクレオチドプライマーを調製し、次に、完全なマッチが見出されたときだけハイブリダイゼーションできるような条件下でターゲットDNAにハイブリダイズさせる (Saikiら, (1986) Nature 324: 163); Saikiら, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230 30) 。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドはPCR増幅したターゲットDNAにハイブリダイズするか、または、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に結合し標識されたターゲットDNAにハイブリダイズするときは複数の異なる突然変異にハイブリダイズする。

【0424】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅テクノロジーを本発明と共に使用してもよい。特異的増幅用プライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、該当突然変異を、(増幅が差別的ハイブリダイゼーションに依存するように) 分子の中央に含んでもよく (Gibbsら, Nucleic Acids Res. 17: 2437-2448 (1989))、または、1つのプライマーの3'末端に含んでもよい。後者の場合には、適正条件下でミスマッチがポリメラーゼ延長を防止または抑制できる。Prossnerら, Tibtech 11: 238 (1993) 参照。更に、開裂に基づく検出が可能になるように突然変異の領域に新しい制限部位を導入することが望ましい (Gaspariniら, Mol. Cell Probes 6: 1 (1992))。幾つかの実施態様ではまた、増幅用にTaqリガーゼを使用して増幅を行ってもよい。Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189 (1991) 参照。このような場合、5'配列の3'末端に完全なマッチが存在するときだけに結合が生じるので、増幅の有無を探索することによって特異的部位の既知の突然変異の存在を検出することが可能になる。 40

【0425】

本文中に記載の方法は例えば、本文中に記載された少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む予めパッケージされた診断用キットを利用することによって行うことができる。このようなキットは、MAPKAP-2遺伝子が関与する疾病または疾患の症状または家族履歴を示す患者を診断するための臨床診断手順で簡便に使用できる。

【0426】

更に、本文中に記載の予知アッセイにはMAPKAP-2が発現している任意の細胞型または組織を利用し得る。

【0427】

(iii) アンチセンス分子／遺伝子治療

アンチセンス分子

過剰発現及び／または過剰活性のMAPKAP-2キナーゼまたは核酸の発現または活性の細胞レベル及び／または活性を低下させる薬剤は様々な治療計画に使用できるであろう。MAPKAP-2の細胞レベル及び／または活性を低下させる技術の非限定例は、アンチセンスまたはリボザイム法、及び／または、遺伝子療法であり、これらの各々は当業界で公知である。

【0428】

本文中では、mRNAの翻訳を阻止するために配列番号2のMAPKAP-2キナーゼをコードするmRNAのどこかの部分に特異的に結合し得るヌクレオチド配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドが提供される。アンチセンスオリゴヌクレオチドが本発明のMAPKAP-2キナーゼをコードするcDNAの配列のどこかの部分に特異的に結合し得る配列を有していてもよい。

【0429】

本発明の別の実施態様では、本文中で提供される配列番号1のcDNA配列が、アンチセンス構築物を使用して内因性遺伝子をノックアウトすることによって、細胞中、特に造血系に由来の細胞中の新規なヒトシグナル伝達キナーゼの生理的な適性を研究するために使用され得る。

【0430】

提案されたアンチセンス試薬をデリバリーする幾つかの方法としては、(1) リボソームによる封入、(2) レトロウイルスベクターによる形質導入、(3) 殆どの核タンパク質に見出される核ターゲティング部位を利用する核区画への局在化、(4) 細胞にex vivoでトランスフェクションし次いでトランスフェクト細胞の再移植または投与、及び、(5) DNA運搬系の利用、がある。

【0431】

従って、MAPKAP-2をコードするmRNAの翻訳を阻害すべく機能するアンチセンスRNA及びDNA分子及びリボザイムのようなオリゴヌクレオチドが本発明の範囲に包含される。アンチセンスRNA及びDNA分子は、ターゲットとなるmRNAに結合しタンパク質への翻訳を妨げることによってmRNAの翻訳を直接的に阻止すべく作用する。アンチセンスDNAに関しては、翻訳開始部位、例えば、該当するヌクレオチド配列の-10から+10までの領域に由来するオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0432】

リボザイムは、RNAの特異的開裂を触媒し得る酵素性RNA分子である。リボザイムの作用メカニズムには、相補的ターゲットRNAに対するリボザイム分子の配列特異的相互作用、次いでエンドヌクレアーゼによる開裂が含まれる。本発明の範囲内で、タンパク質複合体成分をコードするRNA配列のエンドヌクレアーゼ開裂を特異的にかつ効率的に触媒するハンマーヘッド型またはその他のモチーフのリボザイム分子が設計される。

【0433】

最初に、潜在的なRNAターゲットの内部の特異的リボザイム開裂部位を同定するために、ターゲット分子を以下の配列、即ち、GUA、GUU及びGUCを含むリボザイム開裂部位について走査する。同定後、開裂部位を含むターゲット遺伝子の領域に対応する15-20ヌクレオチドの短いRNA配列を、オリゴヌクレオチド配列を不適正にする二次構

10

20

30

40

50

造のような予測した構造的特徴について評価する。また、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用し、ターゲット候補と相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション容易性を試験することによってターゲット候補の適性を評価してもよい。D r a p e r , P C T W O 9 3 / 2 3 5 6 9 参照。

【0434】

本発明のアンチセンスRNA及びDNA分子とリボザイムとの双方は当業界で公知の任意のRNA分子合成方法によって調製し得る。D r a p e r、前出参照。該文献は参照によって本発明に含まれるものとする。これらの方法には、例えば、固相ホスホアミダイト化学合成のような当業界で公知のオリゴデオキシリボヌクレオチドの化学合成技術がある。あるいは、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列の *i n v i t r o* 及び *i n v i v o* 転写によってRNA分子を作製してもよい。このようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターのような適当なRNAポリメラーゼプロモーターを取り込んでいる多様な種類のベクターに組み込むことができる。あるいは、使用されるプロモーター次第ではアンチセンスRNAを構成的または誘導的に合成するアンチセンスcDNA構築物を細胞系に安定に導入することもできる。

【0435】

細胞内安定性を増加させかつ半減期を延長させる手段としてDNA分子に様々な修飾を導入し得る。可能な修飾の非限定例としては、分子の5'及び／または3'末端にリボまたはデオキシヌクレオチドのフランキング配列を付加する修飾、または、オリゴデオキシリボヌクレオチド主鎖内部でホスホジエステラーゼ連鎖でなくホスホロチオエートまたは2'-O-メチルを使用する修飾がある。

【0436】

本発明の実施には、12-21ヌクレオチドのオリゴマー、特に12-18ヌクレオチドのオリゴマーが最も好ましい。オリゴ類は原則として、転写物の翻訳阻害に有効であり、本文中に記載の効果を誘発し得る。開始コドン部位またはその近傍の部位でmRNAを阻止することによって翻訳が最も有効に阻害される。従って、ヒトのキナーゼmRNA転写物の5'末端領域に相補的なオリゴヌクレオチドが好ましい。この領域ではハイブリダイゼーションを妨害するような二次構造及び三次構造が最も少ない。更に、3'方向で開始部位からあまりにも遠い配列は、“読み過し”現象が生じてリボソームがアンチセンス／センス二本鎖をほどいてメッセージが翻訳され得ると考えられるのでmRNA転写物のハイブリダイゼーション効率が落ちる。ヒトのシグナル伝達キナーゼmRNAのどこかの部分に相補的またはハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドは治療に使用することを考察できる。

【0437】

1997年6月17日に付与された米国特許第5,639,595号、I d e n t i f i c a t i o n o f N o v e l D r u g s a n d R e a g e n t s, は、*i n v i v o* 活性を示すオリゴヌクレオチド配列の同定方法を教示している。既知のポリヌクレオチドに由来のランダムオリゴヌクレオチドを含有する発現ベクターを細胞に形質転換／トランスフェクトする。次に、細胞についてオリゴヌクレオチドの所望の活性から生じた表現型を検定する。所望の表現型をもつ細胞を同定した後、所望の活性を有しているオリゴヌクレオチドの配列を同定できる。ベクターを回収することによって、または、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅及び挿入された核酸材料を含む領域の配列決定によって同定を完了し得る。

【0438】

記載されたポリヌクレオチド配列をコードする新規なシグナル伝達キナーゼポリペプチドに相補的なヌクレオチド配列をアンチセンス療法用に合成できる。これらのアンチセンス分子はDNAでもよく、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのようなDNAの安定な誘導体でもよく、RNAでもよく、2'-O-アルキルRNAのようなRNAの安定な誘導体でもよく、または別のオリゴヌクレオチド模擬体でもよい。1997年7月29日に付与された米国特許第5,652,355号、H y b r i d O l i g o n u c l

eotide Phosphorothioates、及び、1997年7月29日に付与された米国特許第5,652,356号、Inverted Chimeric and Hybrid Oligonucleotidesは、生理的に安定なアンチセンス分子の合成及び効果を記載しており、これらの特許は参照によって本発明に含まれるものとする。シグナル伝達キナーゼアンチセンス分子は、マイクロインジェクション、リポソーム封入またはアンチセンス配列を担うベクターからの発現、などによって細胞に導入できる。アンチセンス療法は、シグナル伝達キナーゼ活性の抑制が効果的である疾病の治療に特に役立つであろう。

【0439】

遺伝子療法

本文中に記載のシグナル伝達キナーゼは遺伝子療法によって患者に投与し得る。更に、本発明のポリペプチドはこのようにしてターゲット器官の細胞にデリバリーし得る。逆に、ターゲット器官の細胞中のポリペプチド発現を抑制するためにはシグナル伝達キナーゼアンチセンス遺伝子療法を使用し得る。Miller, Nature 357:455-460 (1992) 参照。Millerによれば、技術はヒトの遺伝子療法の実用化が望めるような顕著な初期結果が得られるまで進歩した。

【0440】

最も簡単な形態では、微量のDNAをマイクロインジェクションの方法によって細胞の核に注入するだけで遺伝子導入を行うことができる。Capecci, MR, Cell 22:479-88 (1980)。組換え遺伝子がいったん細胞に導入されると、細胞は組換え遺伝子の転写及び翻訳の正常なメカニズムを認識でき、遺伝子産物が発現されるであろう。

【0441】

DNAをもっと多数の細胞に導入する別の方法も試験された。これらの方法には、DNAをCaPO₄で沈降させピノサイトーシスによって細胞に取り込ませるトランスフェクション(Chen C. and Okayama H, Mol. Cell Biol. 7:2745-52 (1987))；細胞に大きい電圧パルスを作動させて膜に開孔を設ける電気穿孔((Chu G. ら, Nucleic Acids Res., 15:1311-26 (1987))；ターゲット細胞と融合する脂肪親和性小胞にDNAをパッケージするリポフェクション/リポソーム融合(Felgner PL. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7 (1987))；及び小さい入射粒子に結合したDNAを使用する粒子衝撃(Yang NS. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9568-72 (1990))、がある。DNAを細胞に導入する別の方法は化学的に修飾されたタンパク質にDNAを結合する方法である。

【0442】

また、アデノウイルスタンパク質がエンドソームを不安定化し細胞によるDNAの取り込みを増進し得ることも証明された。DNA複合体を含有する溶液にアデノウイルスを混合するか、または、タンパク質架橋剤を使用してアデノウイルスに共有結合したポリリシンにDNAを結合させると、組換え遺伝子の取り込み及び発現が実質的に改善される。Curriel DTら, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 6:247-52 (1992)。

【0443】

本文中で使用された“遺伝子導入”という用語は、外来核酸分子を細胞に導入するプロセスを意味する。遺伝子導入を行う一般的な目的は、遺伝子によってコードされた特定産物を発現可能にすることである。産物は、タンパク質、ポリペプチド、アンチセンスDNAもしくはRNA、または、酵素活性RNAなどである。遺伝子導入は培養細胞中で行うこともでき、または、動物体内への直接投与によって行うこともできる。一般的に遺伝子導入は、非特異的相互作用または受容体介在相互作用によって核酸をターゲット細胞に接触させ、膜経由でまたはエンドサイトーシスによって核酸を細胞に取り込み、形質膜またはエンドソームから細胞質内に核酸を放出するプロセスを含む。発現は更に、細胞の核内

10

20

30

40

50

に核酸を移動させ適正な転写用核因子に結合させることを必要とする。

【0444】

本文中に使用された“遺伝子療法”という用語は、遺伝子導入の1つの形態であり、本文中で使用された遺伝子導入の定義に包含され、より特定的には *in vivo* または *in vitro* で細胞から治療用産物を発現させるための遺伝子導入を意味する。細胞に *ex vivo* で遺伝子導入し次いで患者に移植してもよく、または、核酸または核酸-タンパク質複合体を患者に直接的に投与して遺伝子導入を行ってもよい。

【0445】

MAPKAP-2 キナーゼのコーディング領域は、レシピエント宿主細胞の感染によってキナーゼポリペプチドDNAの導入に介在するウイルスベクターに結合できる。適当なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルスなどがある。例えば、1997年4月29日に付与された米国特許第5,624,820号, Episomal Expression Vector for Human Gene Therapy、参照。本発明の核酸コーディング領域を有効な真核細胞発現ベクターに組み込ませ、この発現ベクターを遺伝子治療される体細胞に直接的に投与または導入する(また、コーディング領域好ましくはmRNA転写物を含む核酸フラグメントを体細胞に直接投与するかまたは導入してもよい)。例えば、1996年12月31日に付与された米国特許第5,589,466号参照。このような核酸及びベクターはエピソードとして維持されてもよく、または、遺伝子融合シグナルと真核細胞の適正な転写及び翻訳のシグナル、即ち、実効的に配置された転写開始部位の5'のRNAポリメラーゼプロモーター、遺伝子融合のATG翻訳開始コドン、(1つまたは複数の)終結コドン、及び、コーディング領域の3'に実効的に配置された転写物ポリアデニル化シグナルを含むプロウイルスまたはその一部分として宿主染色体DNAに取り込まれてもよい。

10

20

【0446】

あるいは、本発明のポリペプチドをコードするDNAを、リガンド-DNAコンジュゲートまたはアデノウイルス-リガンド-DNAコンジュゲートを使用するターゲット化DNAの受容体介在性導入、リポフェクション膜融合または直接マイクロインジェクションのような非ウイルス技術によって遺伝子治療用細胞に導入してもよい。これらの手順及びその変形は、当業界で確立した方法に従って、*ex vivo* 及び *in vivo* のヒトのシグナル伝達キナーゼポリペプチドによる遺伝子治療 (Chowdhuryら, Science 254:1802-1805, 1991及びWilson, Hum. Gene Ther. 3:179-222, 1992参照)、並びに、本文中に開示されたMAPKAP-2核酸配列を導入するように修飾し、動物に再移植できる *ex vivo* の方法に適している。。

30

【0447】

MAPKAP-2核酸配列を細胞にデリバリーするために、裸のDNAの直接摂取(例えば、Wolffら, Science 247:1465-1468 (1990))、例えば肝のアシアロ糖タンパク質受容体によって取り込まれるアシアロオロソムコイドに結合したDNAを使用する受容体介在DNA取り込み(Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)、及び、リポソーム介在デリバリー(Kanedaら, Expt. Cell Res. 173:56-69 (1987)及びKanedaら, Science 243:375-378 (1989))のような別の非ウイルス技術を使用できる。これらの物理的方法の多くは、互いに組合せてもよく、または、ウイルス技術に組合せてもよい。例えば、受容体介在DNA取り込みはアデノウイルスと共に使用することによって増進される(Currielら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8850-8854 (1991))。

40

【0448】

MAPKAP-2キナーゼまたはMAPKAP-2キナーゼをコードする核酸はまた、増殖する細胞の支持体を提供する埋め込みデバイス経由で投与し得る。従って、細胞は埋め

50

込みデバイス中に維持され、本発明の有効な治療薬を供給する。

【0449】

代表的な1つの実施態様では、MAPKAP-2コーディング配列（配列番号1）を含む発現ベクターを細胞に挿入し、細胞を *in vitro* で増殖させ、次いで多数の細胞を患者体内に注入する。別の好ましい実施態様では、好ましいプロモーター（例えば強いプロモーター）を含むDNAセグメントを、内因性MAPKAP-2遺伝子を含む細胞に、プロモーターセグメントが内因性MAPKAP-2遺伝子の発現を増進させるように導入する（例えば、プロモーターセグメントを細胞に、該セグメントが内因性MAPKAP-2遺伝子に直結するように導入する）。

【0450】

ターゲット細胞集団（例えば、免疫系の細胞）は、このような細胞の活性を調節するためにMAPKAP-2の変異形態を導入することによって修飾し得る。

10

【0451】

別の好ましい実施態様では、遺伝子置換の方法が示されている。本文中で使用された“遺伝子置換”という用語は、動物体内で *in vivo* で発現されることができこれによって動物体内に欠如または欠失している内因性遺伝子の機能を提供または増強する核酸配列を供給することを意味する。

【0452】

PCR診断

核酸配列、そのオリゴヌクレオチド、フラグメント、部分またはアンチセンス分子は、新規なヒトシグナル伝達キナーゼ分子の発現レベルを検出するための体液または生検組織の診断アッセイに使用できる。例えば、配列番号1で表されるcDNA配列から設計された配列または配列番号2に含まれている配列は患者体内のmRNA転写物の存在を検出するため、または、治療中の転写物の調節をモニターするために使用できる。

20

【0453】

ターゲット核酸配列を増幅するためまたは後でハイブリダイゼーションアッセイによって分析するための1つの方法はポリメラーゼ連鎖反応（“PCR”）またはPCR技術として知られている。PCR技術は、互いから離れて存在し、例えば本文中に配列番号1で表される遺伝子配列に基づくオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、疑わしいサンプル中で本発明の配列を検出するように応用できる。プライマーは二重鎖DNA分子のそれぞれの対応する鎖に相補的であり、典型的には約50-450ヌクレオチド以上（通常は2000ヌクレオチド以下）離れている。この方法は、特異的オリゴヌクレオチドプライマーを調製し、次いで、ターゲットDNAの変性とプライマー結合とDNAポリメラーゼによる延長とのサイクルを反復してプライマー間隔に基づいて予測された長さのDNAフラグメントを得るという段階を含む。ターゲット配列の増幅度は、実行するサイクル回数によってコントロールされ、理論的には簡単な式 2^n によって算出され、式中の n はサイクル回数を表す。例えば、Perkin Elmer, PCR Bibliography, Roche Molecular System, Branchburg, N. J. ; CLONTECH products, Palo Alto, Calif. ; 1997年5月13日に付与された米国特許第5,629,158号, Solid Phase Diagnosis of Medical Conditions 参照。

30

40

【0454】

臨床試験中の効果のモニタリング

MAPKAP-2または疾病の遺伝子プロファイルに基づいて最も高い臨床効果を示すと予測された集団をターゲットできれば、（1）市場実績のよくない市販薬物の復権、（2）安全性または有効性が患者サブグループに特異的であるという制約を示した結果として臨床開発が断念されていた薬物候補の救済、及び、（3）薬物候補のもっと迅速でもっと廉価な開発及びもっと最適な薬物標識（例えば、MAPKAP-2をマーカーとして使用することは最適な有効用量を知るために役立つので）、が可能になる。

【0455】

50

M A P K A P - 2 治療薬による個体の治療は、M A P K A P - 2 タンパク質のレベルまたは活性、M A P K A P - 2 m R N A のレベル、及び／またはM A P K A P - 2 の転写レベルのようなM A P K A P - 2 の特性値を測定することによってモニターできる。この測定値は、治療が有効であるか、または、治療の調節もしくは最適化が必要であることを示す指標となるであろう。従って、M A P K A P - 2 は臨床試験中の薬物の効力に関するマーカーとして使用できる。

【0456】

M A P K A P - 2 キナーゼの発現または活性に対する薬剤（例えば、薬物または化合物）の影響をモニターすることも本発明によって考察され、基本薬物のスクリーニングだけでなく、臨床試験にも応用できる。例えば、上述のようなスクリーニングアッセイによってM A P K A P - 2 遺伝子発現及びタンパク質レベルの増加またはM A P K A P - 2 活性の正の調節が測定される薬剤の有効性は、M A P K A P - 2 遺伝子発現及びポリペプチドレベルの低下またはM A P K A P - 2 の負の調節を示す被験者の臨床試験でモニターできる。あるいは、スクリーニングアッセイによってM A P K A P - 2 遺伝子発現及びポリペプチドレベルの低下またはM A P K A P - 2 活性の負の調節が測定される薬剤の有効性は、M A P K A P - 2 遺伝子発現及びポリペプチドレベルの増加またはM A P K A P - 2 活性の正の調節を示す被験者の臨床試験でモニターできる。このような臨床試験で、M A P K A P - 2 遺伝子及び好ましくは障害に関与したその他の遺伝子の発現または活性を特定細胞の表現型の“リードアウト”またはマーカーとして使用できる。

【0457】

例えば非限定的に説明すると、（例えば、本文中に記載のようなスクリーニングアッセイで同定された）M A P K A P - 2 活性を調節する薬剤（例えば化合物、薬物または小分子）で治療することによって調節されるM A P K A P - 2 のような遺伝子を細胞中で同定できる。従って、M A P K A P - 2 関連障害に対する薬剤の効果を例えば臨床試験で検査するためには、細胞を単離し、R N A を調製し、M A P K A P - 2 及びM A P K A P - 2 関連障害に関与する別の遺伝子のそれぞれの発現レベルを分析する。遺伝子発現のレベル（例えば、遺伝子発現パターン）を本文中に記載のようにノーザンブロット分析またはR T - P C R によって、あるいは、本文中に記載の方法の1つでポリペプチドの産生量を測定することによって、あるいは、M A P K A P - 2 もしくは別の遺伝子の活性レベルを測定することによって定量できる。このようにして、遺伝子発現パターンが薬剤に対する細胞の生理的応答を表すマーカーとして役立つ。従って、この応答状態を、薬剤による個体の治療開始前及び治療中の種々の時点で測定するとよい。

【0458】

好ましい実施態様では、本発明は薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模擬体、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子またはその他の本文中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される薬物候補）による患者の治療の有効性をモニターする方法を提供する。方法は、（i）薬剤投与前の患者から投与前サンプルを採取する段階と、（i i）投与前サンプル中のM A P K A P - 2 キナーゼ、m R N A またはゲノムD N A の発現レベルを検出する段階と、（i i i）患者から1つまたは複数の投与後サンプルを採取する段階と、（i v）投与後サンプル中のM A P K A P - 2 キナーゼ、m R N A またはゲノムD N A の発現または活性のレベルを検出する段階と、（v）投与前サンプル中のM A P K A P - 2 キナーゼ、m R N A またはゲノムD N A の発現または活性のレベルを1つまたは複数の投与後サンプル中のM A P K A P - 2 キナーゼ、m R N A またはゲノムD N A の発現または活性のレベルに比較する段階と、（v i）これに応じて患者に対する薬剤の投与を変更する段階とから成る。

【0459】

例えば、M A P K A P - 2 の発現または活性を検出レベルよりも高いレベルに上げたいとき、即ち、薬剤の有効性を増加させたいときには薬剤の投与量を増加するのが望ましい。あるいは、M A P K A P - 2 の発現または活性を検出レベルよりも低いレベルに下げたいとき、即ち、薬剤の有効性を減少させたいときには薬剤の投与量を減少するのが望ましい

。このような実施態様によれば、観察可能な表現型応答が存在しないときであってもMAPKAP-2の発現または活性が薬剤の有効性を示す指標として使用され得る。

【0460】

また、有害かもしれない遺伝子の発現をMAPKAP-2治療薬が増加も減少もさせないことを検証するために、MAPKAP-2の投与前及び投与後に患者の細胞を採取してMAPKAP-2以外の遺伝子の発現レベルを検出することもできる。これは例えば転写プロファイリングの方法を使用することによって行うことができる。従って、MAPKAP-2治療薬に*in vivo*で接触させた細胞に由来のmRNA及びMAPKAP-2治療薬に接触させなかった同種細胞に由来のmRNAを逆転写し、多数の遺伝子に由来のDNAを含むチップにハイブリダイズさせ、これによってMAPKAP-2治療薬で処理した細胞中の遺伝子発現と未治療の細胞中の遺伝子発現とを比較する。例えば、MAPKAP-2治療薬が個体の体内で原ガン遺伝子の発現を開始させるならば、この特定のMAPKAP-2治療薬の使用は望ましくないと考えられる。

10

【0461】

繰り返すためには、生物組織を時間の経過に伴って繰り返し検定し、所望のパラメーター、例えばMAPKAP-2キナーゼまたはmRNAまたはDNAのレベルを時間の経過に伴って記録し、治療計画の有効性を評価するかまたは治療プロトコルの有効性を判定する。

【0462】

本発明の1つの実施態様は、MAPKAP-2キナーゼの異常発現を特徴とする状態を軽減するように設計された治療計画の経過を追跡する方法に関する。方法は、

20

(a) (i) 配列番号1のヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチド、(ii) 上記配列の縮重配列によってコードされたポリペプチド、(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、から成るグループから選択されたパラメーターのレベルを測定するために患者のサンプルをアッセイにかけける段階と、

(b) 前項(a)で選択されたパラメーターのレベルを第二時点で検定する段階と、

(c) 第二時点のレベルを(a)で測定したパラメーターのレベルに比較し、該治療計画の効果を判定する段階と、

から成る。

【0463】

30

機能不全性シグナル伝達を特徴とする病的障害の退縮、進行または発症を判定する方法は、このような障害のある患者から採取したサンプルを配列番号1の配列に実質的に相同のヌクレオチド配列をもつ相補的核酸ハイブリダイゼーションプローブと共にインキュベートする段階と、該サンプル中に相補的mRNAが存在するならば該相補的mRNAと該プローブとの結合を測定して、患者体内の病的障害の退縮、進行または発症の判定手段とする段階から成る。

【0464】

機能不全性シグナル伝達を特徴とする病的障害の退縮、進行または発症を判定する方法は、このような障害のある患者から採取したサンプルを、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を有する単離核酸分子の遺伝子産物に特異的な検出可能プローブに、プローブ/遺伝子産物複合体の形成に有利な条件下で接触させる段階から成り、この複合体の存在が患者体内の病的障害の退縮、進行または発症の指標となる。

40

【0465】

C. 治療方法

本発明はまた、MAPKAP-2の異常な発現または活性に関連する障害の危険がある（または罹患し易い）かまたは障害のある被験者の予防的及び治癒的な治療方法を提供する。予防的及び治癒的な治療方法に関しては、このような治療は薬理遺伝子学の分野から得られた知識に基づいて個別に作成または修正され得る。

【0466】

本文中で使用された“薬理遺伝子学”という用語は、遺伝子配列決定、統計的遺伝学、遺

50

伝子発現分析のような遺伝学のテクノロジーを臨床開発中または市販の薬物に応用することを意味する。より特定のにはこの用語は、患者の遺伝子が薬物に対するそれぞれの応答（例えば、患者の“薬物応答表現型”または“薬物応答遺伝子型”）をどのように決定するかに関する研究を意味する。

【0467】

上記に従って、本発明の（1つまたは複数の）MAPKAP-2キナーゼまたはMAPKAP-2モジュレーターによる個体の予防的または治癒的な治療を該個体の薬物応答遺伝子型に合わせて作成する方法が提供される。薬理遺伝子学に基づいて臨床医または医師は、予防的または治癒的な治療の対象を該治療によって最も効果が得られる患者に限定し、薬物関連の有害副作用が生じる患者の治療は避けるようにすることができる。

10

【0468】

（i）予防的方法

1つの特徴によれば、本発明は、MAPKAP-2キナーゼ（配列番号2）またはMAPKAP-2発現もしくは少なくとも1つのMAPKAP-2活性を調節する薬剤を被験者に投与することによって被験者の体内で異常なMAPKAP-2発現または活性に関連する疾病または状態を予防する方法を提供する。MAPKAP-2の異常な発現または活性によって生じるかまたはこれらがその一因となる疾病に罹る危険のある被験者は、例えば、本文中に記載した診断用アッセイまたは予知アッセイのいずれか1つまたはその組合せによって同定できる。予防薬の投与はMAPKAP-2異常の特徴的症状の出現よりも前に、疾病もしくは障害を予防するかあるいはその進行を遅らせるために投与できる。MAPKAP-2異常のタイプ次第で、被験者を治療するために、例えばMAPKAP-2、MAPKAP-2アゴニストまたはMAPKAP-2アンタゴニストとなる薬剤を使用できる。適切な薬剤は本文中に記載のスクリーニングアッセイに基づいて決定できる。

20

【0469】

（ii）治癒的方法

本発明の別の特徴は、治癒目的でMAPKAP-2の発現または活性を調節する方法に属する。その結果として、代表的な実施態様は、MAPKAP-2に細胞を接触させるか、または、MAPKAP-2キナーゼの細胞関連活性の1つまたは複数の活性を調節する薬剤に細胞を接触させる段階を含む調節方法を教示している。MAPKAP-2キナーゼ活性を調節する薬剤は、核酸またはポリペプチド、MAPKAP-2キナーゼの天然ターゲット分子（例えば、MAPKAP-2リン酸化基質-Hsp-27または別の天然型基質）、MAPKAP-2抗体、MAPKAP-2のアゴニストもしくはアンタゴニスト、MAPKAP-2のアゴニストもしくはアンタゴニストのペプチド模擬体、または、別の小分子のような本文中に記載の物質でよい。

30

【0470】

代表的な実施態様は、1つまたは複数のMAPKAP-2活性を刺激する薬剤に関する。このような刺激性薬剤の例は、活性MAPKAP-2キナーゼ、及び、細胞に導入された実質的に配列番号2で表される配列を有するMAPKAP-2キナーゼをコードする核酸分子である。

【0471】

別の実施態様では薬剤が1つまたは複数のMAPKAP-2活性を阻害する。

40

【0472】

このような阻害薬剤の例は、アンチセンスMAPKAP-2核酸分子、抗-MAPKAP-2抗体及びMAPKAP-2インヒビターである。これらの調節方法は、*in vitro*で（例えば細胞を薬剤と共に培養することによって）行ってもよく、あるいは、*in vivo*で（例えば薬剤を被験者に投与することによって）行ってもよい。従って本発明は、MAPKAP-2キナーゼまたは核酸分子の異常な発現または活性を特徴とする疾病または障害に苦しむ個体の治療方法を提供する。

【0473】

本発明の代表的な方法は、MAPKAP-2の発現もしくは活性を調節する（例えば正の

50

調節または負の調節を行う) 薬剤 (例えば、本文中に記載されたスクリーニングアッセイによって同定された薬剤) または薬剤の組合せを投与する段階を含む。別の実施態様では、方法が、MAPKAP-2の発現または活性の低下または異常を補償するための治療としてMAPKAP-2キナーゼまたは核酸分子を投与する段階を含む。

【0474】

MAPKAP-2が異常に負に調節されている状態及び/またはMAPKAP-2の活性増加が有益な効果を有すると考えられる状態ではMAPKAP-2活性の刺激が望ましい。例えば、MAPKAP-2が負に調節されている状態及び/またはMAPKAP-2の活性増加が有益な効果を有すると考えられる状態ではMAPKAP-2活性の刺激が望ましい。同様に、MAPKAP-2が異常に正に調節されている状態及び/またはMAPKAP-2の活性減少が有益な効果を有すると考えられる状態ではMAPKAP-2活性の阻害が望ましい。

10

【0475】

(iii) 薬理遺伝子学

薬理遺伝子学は、病人の薬物素因の変質及び異常作用に起因する臨床的に有意な遺伝性の薬物応答変化を取り扱う。例えば、Eichelbaum, M. ら, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23 (10-11): 983-985 (1996) 及びLinder, M. W. ら, Clin. Chem. 43 (2): 254-266 (1997) 参照。一般に、薬理遺伝子条件は2つのタイプに分類される。1つは身体に対する薬剤の作用の仕方を変化させる単一要因 (薬剤作用変化) として伝達される遺伝条件であり、いま1つは薬剤に対する身体的作用の仕方を変化させる単一要因 (薬剤代謝変化) として伝達される遺伝条件である。これらの薬理遺伝子条件は希有な遺伝欠陥として生じるかまたは天然多型として生じる。

20

【0476】

個体の体内のMAPKAP-2遺伝子またはタンパク質の欠陥または欠失を生じさせる1つまたは複数の特定の変化 (MAPKAP-2遺伝子プロファイル) に関して得られた情報を、単独で使用するかまたは同じ疾病の一因となる別の遺伝欠陥に関する情報と共に使用すると、個体の遺伝子プロファイルに基づいて特定の疾病に対する治療方法を個別に計画できる。これが“薬理遺伝子学”の到達目標である。

【0477】

例えば、MAPKAP-2遺伝子の特異的対立遺伝子をもつ被験者は、特定の疾病の症状を表すことも表さないこともあり、また、特定の疾病を発症し易い体質であったりする。更に、彼等が症状を表す患者であるときは、ある種の薬物、例えば特異的MAPKAP-2治療薬に応答することもあり、または、該薬物には応答しないが別の薬物には応答を示すこともある。従って、MAPKAP-2遺伝子及び/またはタンパク質の欠陥及び/または欠失が原因または一因となる疾病または状態の症状を示す患者集団からMAPKAP-2遺伝子プロファイル (例えば、リウマチ様関節炎の発症に関連するMAPKAP-2遺伝子の変化の分類) を作成し、個体のMAPKAP-2プロファイルを集団のプロファイルに比較すると、特定の患者または患者集団 (即ち、同じ遺伝子変化を有する患者群) に対して安全で有効であると予測される薬剤の選択または設計が可能である。

30

40

【0478】

例えば、MAPKAP-2遺伝子の欠陥または欠失が原因または一因となる疾病に罹った患者集団でMAPKAP-2プロファイル、例えばMAPKAP-2遺伝子の一致を判定することによってMAPKAP-2集団プロファイルを作成し得る。場合によっては更にMAPKAP-2集団プロファイルに、様々な方法のいずれかを使用して得られたMAPKAP-2治療薬に対する集団の応答に関する情報を加えることもできる。様々な方法としては、(1) MAPKAP-2関連疾患に付随する症状の重篤度、(2) MAPKAP-2遺伝子の発現レベル、(3) MAPKAP-2 mRNAのレベル、及び/または、(4) MAPKAP-2のタンパク質レベル、をモニタリングする方法、(iii) そのMAPKAP-2遺伝子またはMAPKAP-2経路遺伝子中に存在する1つまたは複数の特定

50

の遺伝子変化に基づいて集団を分割または分類する方法がある。MAPKAP-2 遺伝子集団プロファイルはまた場合によっては、特定の変化を生じた患者が特定の治療薬に応答したかまたは応答しなかったかを示す指標となり得る。従ってこの情報または集団プロファイルは、個体のMAPKAP-2 プロファイルに基づいて個体が特定の薬物に反応することを予測するために役立つ。好ましい実施態様では、MAPKAP-2 プロファイルが転写または発現レベルのプロファイルであり、段階 (i) はMAPKAP-2 タンパク質の発現レベルを単独でまたは同じ疾病の一因となることが判っている別の遺伝子の発現レベルと共に測定する段階から成る。多くの患者で疾病の様々な時期にMAPKAP-2 プロファイルを測定できる。

【0479】

薬理遺伝子学的研究はまた、トランスジェニック動物を使用して行うことができる。例えば、本文中に記載したようなMAPKAP-2 遺伝子の特異的対立遺伝子変異体を含むトランスジェニックマウスを作製し得る。これらのマウスは例えば、野生型MAPKAP-2 遺伝子をヒトMAPKAP-2 遺伝子の対立遺伝子で置換することによって作製できる。次に特異的MAPKAP-2 治療薬に対するこれらのマウスの応答を測定し得る。

【0480】

薬物応答を予測させる遺伝子を同定するための“全ゲノム対応 (genome-wide association)”として知られた1つの薬理遺伝子学的方法は主として、既知の遺伝子関連マーカーから成るヒトゲノムの高分解能マップ (例えば、各々が2つの変異体をもつヒトゲノムの60,000-100,000の多型または可変部位から成る“バイーアレリック”遺伝子マーカーマップ) に依存する。このような高分解能遺伝子マップをフェーズII/IIIの薬物治験に参加した統計的有意数の患者の各人のゲノムのマップに比較すると、特定の薬物について観察された応答または副作用に関連したマーカーを同定し得る。

【0481】

あるいは、ヒトのゲノム中の数千万の既知の単一ヌクレオチド多型 (SNP) の組合せからこのような高分解能マーカーを作成することもできる。本文中で使用した“SNP”という用語は、DNA鎖中の単一ヌクレオチド塩基に生じ易い変化である。例えば、SNPはDNAの1000塩基あたりに1回生じ得る。SNPは疾病のプロセスに関与することもあるが、大半は疾病関連性でない。このようなSNPの発生に基づく遺伝子マップが与えられると、個体はそれぞれのゲノム中のSNPの特定パターンに依存する遺伝子グループに分類できる。このようにして、遺伝的に類似の個体グループに合わせた治療計画を、このような遺伝的に類似の個体に共通の形質を考慮に入れて作成できる。

【0482】

あるいは、薬物応答を予測させる遺伝子を同定するために“候補遺伝子法 (candidate gene approach)”と呼ばれる方法を利用できる。この方法によれば、薬物ターゲットをコードする遺伝子 (例えば本発明のMAPKAP-2 キナーゼ) がわかっている場合、該遺伝子に生じ易いあるすべての変異体は集団中でかなり容易に同定でき、該遺伝子の1つの変形が特定の薬物応答に関連するか否かを別の変形に比べて判断できる。

【0483】

代表的な実施態様として、薬物代謝酵素の活性は薬物作用の強度及び持続の主要決定要因である。薬物代謝酵素 (例えばN-アセチルトランスフェラーゼ2 (NAT 2) 及びシトクロムP450 酵素CYP2D6 及びCYP2C19) の遺伝子多型の発見によって、安全な標準用量の薬物の摂取後に期待された薬物効果が得られない患者や過剰な薬物応答及び重篤な毒性を示す患者が何故生じるかという理由を説明できるようになった。これらの多型は集団中で2つの表現型、エキステンシブメタボライザー (EM) 及びプアーメタボライザー (PM) として発現される。異なる集団ではPMの発生率が異なっている。例えば、CYP2D6 をコードする遺伝子は極めて多型性であり、PM中で幾つかの突然変異が同定されたが、これらの突然変異はすべて機能性CYP2D6 の欠如に導く。CY

10

20

30

40

50

P2D6及びCYP2C19のプアーメタボライザーは標準用量で摂取されても過剰な薬物応答及び副作用を高頻度で生じる。代謝産物が有効治療部分である場合、PMは治療応答を全く示さない。これは、CYP2D6によって形成されるその代謝産物モルヒネによって介在されるコデインの解熱効果に関して証明される。別の極端は標準用量に応答しないいわゆる超高速メタボライザーである。最近では、超高速代謝の分子基盤がCYP2D6遺伝子増幅に因ることが同定された。

【0484】

また、薬剤応答を予測させる遺伝子を同定するために“遺伝子発現プロファイリング”と呼ばれる方法を使用できる。薬物（例えば、本発明のMAKAP-2キナーゼまたはMAKAP-2キナーゼモジュレーター）を投与した動物の遺伝子発現は、毒性に関連する遺伝子経路が起動されたか否かを示す指標となる。 10

【0485】

上記の薬理遺伝子学的方法の2つ以上から得られた情報を使用して、個体の予防的または治療的な治療を行うための適正薬用量及び治療計画を決定できる。上記から収集した知識を薬用量決定または薬物選択に使用すると、副反応や治療の失敗を避けることができ、従って、MAKAP-2キナーゼまたは本文中に記載の代表的スクリーニングアッセイの1つによって同定されモジュレーターのようなMAKAP-2モジュレーターで患者を治療するときの治療効率または予防効率を増進し得る。

【0486】

本発明のMAKAP-2キナーゼ、並びに、本文中に上述したスクリーニングアッセイによって同定されたMAKAP-2活性（例えば、MAKAP-2遺伝子発現）に対して刺激作用または阻害作用を有する本発明の薬剤またはモジュレーターは、異常なMAKAP-2活性に付随する障害（例えばうっ血性心不全のような心血管障害）を（予防的または治療的に）治療するために個体に投与できる。このような治療に関連した薬理遺伝子学（即ち、個体の遺伝子型と該個体の外来化合物または薬物に対する応答）も考察できる。治療薬の代謝の違いが薬理活性薬物の用量と血中濃度との関係を変化させることによって重篤な毒性または治療不全に導く。従って、医師または臨床医は、MAKAP-2分子またはMAKAP-2モジュレーターを投与すべきか否かを決定するため及びMAKAP-2分子またはMAKAP-2モジュレーターによる治療における薬用量及び／または治療計画を作成するために、適切な薬理遺伝子学的研究で得られた知識を応用 20 30

【0487】

VI. ジンクフィンガー含有タンパク質

遺伝子の発現を支配する一次メカニズムが配列特異的にDNAに結合するタンパク質スイッチを含むという範例は1967-Ptashe, M., Nature (London) 214, 323-4 (1967)に提示された。DNA結合タンパク質の多様な構造ファミリーが記載された。

【0488】

いずれか1つの遺伝子の選択的発現は主として、タンパク質転写因子と、大抵は実際のコーディング領域の近傍または上流に位置する遺伝子のコントロール領域に存在する特徴的ヌクレオチド配列との相互作用によって行われる。一連のこのような因子または調節タンパク質の結合はRNAポリメラーゼ及び全遺伝子に共通の転写機構の別の成分を活性化させる分子スイッチとして作用する。このような転写因子の特定の組合せが供給されると、遺伝子は確実に正しい場所及び正しい時期にスイッチされる。従って、転写調節は主としてタンパク質がDNA及びRNAに配列特異的に結合することによって行われる。 40

【0489】

DNAの配列特異的認識に関与する既知のタンパク質モチーフのうちで、ジンクフィンガータンパク質は独特のモジュール性を有している。今日まで200を越える数のタンパク質がジンクフィンガードメインを有することが判明し、これらのタンパクの多くは転写因子である。DNA及びRNA結合転写因子TFIIIA中で最初に同定されたCys₂- 50

H i s₂ ジンクフィンガーモチーフ (M i l l e r, J., M c L a c h l a n, A. D. & K l u g, A., E m b o J 4, 1609-14 (1985)) は恐らく、配列特異的タンパク質を構築するための理想的な構造スカフォールドである。ジンクフィンガーは、主としてDNA塩基対の特異的配列即ち “ はしご形 ” DNAの “ 横棧 ” に結合することによって転写因子をそれらのターゲット遺伝子に接続する。実際、C y s₂ - H i s₂ ジンクフィンガーモチーフは真核細胞中で最も頻用される核酸結合モチーフを構成している。

【0490】

これらのモチーフは特異的DNA配列を認識しこれに結合するもっと大きいタンパク質ドメインを構築するためのモジュール式積み上げブロックとして使用できる。ジンクフィンガーとDNAとの相互作用の詳細なモデルが提示されている (B e r g, 1988; 及び C h u r c h i l l ら, 1990)。また、RNAに結合するジンクフィンガータンパク質も報告されている - C l e m e n s o, S c i e n c e, 260:530, (1993)。

【0491】

重要なことに、設計されたジンクフィンガーペプチドを使用する遺伝子発現のコントロールがガン遺伝子マウス細胞系の特異的阻害によって及び発現プラスミド中の遺伝子をスイッチオンすることによって証明された。これらの実験は、ジンクフィンガーDNA結合ドメインが所与のDNA配列を認識するように新たに (d e n o v o) 設計され得ることを証明した。互いに連結した5個から6個の個別のジンクフィンガーがヒトゲノム中の微量アドレスを構成すべく十分に長い15-18bpの長さのDNA配列認識することは理解されよう。設計されたDNA結合ドメイン、例えば、無機能 (s i l e n c i n g) ドメインに官能基を付加することによってターゲット遺伝子の発現の正または負の調節を行う新しい転写因子を作製し得る。可能な用途としては、ガン遺伝子発現の退縮、及び、ウイルス感染の複製サイクルの破壊が考えられる。K l u g, A, J. M o l. 293 (2): 215-8 (1999)。

【0492】

米国特許第6, 140, 466号は、細胞ヌクレオチド配列に結合し細胞ヌクレオチド配列の機能を調節する新しいジンクフィンガーモジュールの設計方法を教示している。提案された新規な変異体はDNAまたはRNAに結合し、プロモーターからの転写または構造遺伝子の被転写領域内部からの転写を増進または抑制し得る。細胞ヌクレオチド配列は細胞中で天然に生じる配列であってもよく、または、細胞中のウイルス由来のヌクレオチド配列であってもよい。米国特許第5, 789, 538b号も参照。

【0493】

その結果として、本文中に開示された新規なヌクレオチド配列は、M A P K A P-2 キナーゼをコードするヘテロログスDNAで細胞を形質転換する必要なしに細胞系から内因性M A P K A P-2を発現させるために使用できる新しいジンクフィンガー含有タンパク質を設計するために使用できる。提案された新しいジンクフィンガータンパク質は本文中に開示されたポリヌクレオチド配列に特異的であるかまたはその相補的配列であり、これは実質的に配列番号2のポリペプチドをコードしている。得られたタンパク質は次に、M A P K A P-2 関連障害を治療するために使用できる。

【0494】

V I I. 医薬製剤及び投与形態

新規なヒトキナーゼコーディングDNA、ヒトキナーゼコーディングRNA、アンチセンス配列または実質的に配列番号2で表される配列を有するヒトキナーゼ、またはヒトのキナーゼ活性を有するかまたはその活性を調節する変異体または類似体を含む医薬有用組成物は、公知の方法に従って、例えば、医薬的に許容される担体との混合によって製剤化できる。このような担体の例及び製剤化方法はR e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s (M a a c k P u b l i s h i n g C o., E a s t o n, P a.) に見出される。効果的な投与に適した医薬的に許容される組成物を形成

するためには、このような組成物が有効量のタンパク質、DNA、RNAまたはモジュレーターを含有するであろう。

【0495】

治療有効用量という用語は、組成物がヒトのシグナル伝達キナーゼポリペプチド関連障害を治療または診断するために十分な量で個体に投与されることを意味する。有効量は、個体の状態、体重、性別及び年齢のような様々な要因に従って変更し得る。その他の要因としては、投与形態がある。有効であるが無毒な量の所望化合物をシグナル伝達キナーゼ調節剤として使用できる。

【0496】

本文中に開示された方法に従って同定された化合物は、潜在的な毒性が最小になるようにしながらシグナル伝達キナーゼまたはその活性を最適に調節するように定型の試験によって決定した適正用量で単独使用し得る。更に、別の薬剤の同時投与または順次投与も望ましい。

【0497】

このような化合物の毒性及び治療有効性は、例えばLD₅₀（集団の50%までの致死量）及びED₅₀（集団の50%の治療有効量）を測定するための医薬用標準手順によって細胞培養物または実験動物中で測定できる。毒性作用と治療効果との用量比が治療係数であり、LD₅₀ / ED₅₀ の比として表すことができる。大きい治療係数を示す化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータはヒトに使用できる薬用量の範囲を処方するために使用できる。このような化合物の薬用量は好ましくは、毒性を殆どまたは全く示さないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にあるのが好ましい。薬用量は使用される剤形及び使用される投与経路に応じてこの範囲内で変更し得る。

【0498】

正確な処方、投与経路及び薬用量は、個々の医師が患者の状態を考慮して選択し得る。例えば、Fingler, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1975, Ch. 1 p. 1参照。主治医は、毒性または器官の機能不全があればいつどのように投与を終了、中断または調節するかを知る必要があることに留意されたい。逆に、（毒性を除外した）臨床応答が適正でないときに治療をもっと高いレベルに調節することも主治医は知る必要がある。問題の障害を管理するために投与される用量の値は、治療すべき状態の重篤度及び投与経路に伴って変更されるであろう。状態の重篤度は例えば、標準予知評価方法にによって評価され得る。更に、用量及び恐らく投薬頻度はまた、患者各人の年齢、体重及び応答に従って変更されるであろう。上述のプログラムと同等のプログラムを獣医薬にも使用し得る。薬用量は、不要な交差反応、過敏反応などのような好ましくない副作用を生じるほど多い量であってはならない。

【0499】

一般に、薬用量は患者の年齢、状態、性別及び疾病の程度、もしあれば逆効果の徴候（counter indications）、並びに、各医師によって調整されるべき別の同様の変数に伴って変更されるであろう。薬用量の範囲は、0.001mg/kg - 50mg/kg、好ましくは0.1mg/kg - 1.0mg/kgの本発明のアゴニストまたはアンタゴニストが1日あたり1回または複数回で1日または数日間投与されるような範囲である。

【0500】

経口投与のためには、治療される患者に対する薬用量を症状に応じて調節するために、組成物を好ましくは0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0及び50.0ミリグラムの有効成分を含有する刻み目付きまたは刻み目のない錠剤の形態で提供する。有効量の薬物を普通には1日あたり体重1kgに対して約0.0001mg/kg - 約100mg/kgの薬用量レベルで供給する。より特定のにはこの範囲は1日あたり体重1kgに対して約0.001mg/kg - 約10mg/kgである。もっと特定のには範囲は約0.05mg/kg - 約1mg/kgである。勿論、薬用量レベルは特定化合物の効力に従って変更される。いくつかの化合物は別の

化合物よりも効力が大きい。更に、薬用量レベルは化合物の生体内利用効率に従って変更されるであろう。化合物の生体内利用効率及び効力が大きいほど、経口デリバリーを非限定例とする任意のデリバリー経路で投与される化合物の必要量が少ない。ヒトのシグナル伝達キナーゼモジュレーターは、併用されると所望の効果を発揮するように調整される。他方では、これらの種々の薬剤の薬用量を独立に最適化し、いずれかの薬剤を単独で使用したときよりも病状が軽減される相乗的結果を達成するように併用してもよい。当業者は、ヌクレオチドに対してはタンパク質またはそれらのインヒビターとは異なる処方を使用するであろう。また、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドのデリバリーは特定の細胞及び状態に特異的であろう。

【0501】

例えば、細胞培養物中で測定された IC_{50} を含む循環血漿濃度範囲（即ち、ポリペプチド複合体の最大破壊の半値、または、複合体成分の細胞レベル及び／または活性の最大阻害の半値が得られる被験化合物濃度）が得られるような用量を動物モデルで処方し得る。このような情報を使用して、ヒトに有効な用量をいっそう正確に決定できる。血漿中のレベルは例えば HPLC によって測定し得る。

【0502】

医薬組成物は、皮下、外用、経口及び筋肉内のような様々な経路によって個体に提供され得る。医薬組成物の投与は経口的または非経口的に行われる。非経口デリバリーの方法には、外用、動脈内（組織に直接）、筋肉内、皮下、髄内、鞘内、心室内、静脈内、腹腔内、または、鼻腔内投与がある。本発明はまた、本発明の新規な治療方法に使用するための適当な外用、経口、全身性及び非経口医薬製剤を提供することを目的とする。シグナル伝達キナーゼの調節に使用するための有効成分として本発明に従って同定された化合物を含む組成物は慣用の投与ビヒクルに入れた多様な治療用剤形で投与できる。例えば、化合物は、錠剤、カプセル剤（いずれも適時放出剤及び持続放出剤を含む）、丸剤、散剤、粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、溶液剤、懸濁液剤、シロップ及びエマルジョンのような経口剤形または注射によって投与できる。同様に、化合物はまた静脈内（濃縮塊及び注入）、腹腔内、皮下、閉鎖を伴うかもしくは伴わない外用、または、筋肉内形態で投与してもよい。すべての形態が製薬業界の当業者に公知である。

【0503】

注射の場合、本発明の薬剤は水溶液、好ましくはハंक溶液、リンゲル液または生理的食塩水バッファのような生理的に適合性のバッファ中で製剤化し得る。経粘膜投与のためには、障壁透過に適した浸透剤を製剤中に使用し得る。このような浸透剤は当業界で普遍的に知られている。本発明を実施するために本文中に開示された化合物を全身性投与に適した剤形に製剤化するための医薬的に許容される担体の使用は本発明に包含される。担体及び適当な実用の製造手順を選択することによって、本発明の組成物、より特定のには溶液として製剤化された組成物を例えば静注によって非経口投与し得る。化合物は当業界で公知の医薬的に許容される担体を使用して経口投与に適した剤形に容易に製剤化できる。このような担体は本発明の化合物を錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などのような治療される患者が経口摂取できる形態に製剤化し得る。

【0504】

細胞内投与を目的とする薬剤は平均的な当業者に公知の技術を使用して投与され得る。例えば、このような薬剤をリポソームに封入し、次いで上述のように投与し得る。リポソームは水性内部を含む球形の脂質二重層である。リポソーム形成時点で水溶液中に存在する全部の分子が水性内部に取り込まれる。リポソームの内容物は外部の微小環境から保護され、また、リポソームが細胞膜に融合するので細胞の細胞質に効率的にデリバリーされる。更に、疎水性であるので、小さい有機分子を直接的に細胞内に投与してもよい。

【0505】

これらの医薬組成物は有効成分に加えて、活性化合物を医薬として使用できる調製物に加工することを容易にする賦形剤及び補助剤から成る医薬的に許容される適当な担体を含むし得る。経口投与すべく製剤化された調製物は錠剤、カプセル剤または溶液の形態でよい

10

20

30

40

50

。本発明の医薬組成物はそれ自体公知の方法、例えば、慣用の混合、溶解、造粒、浮遊、乳化、封入、捕獲または凍結乾燥プロセスを使用して製造し得る。

【0506】

非経口投与される医薬製剤としては、水溶性形態の活性化合物の水溶液がある。更に、活性化合物の懸濁液は油性の注射用懸濁液として適宜調製し得る。適当な親水性溶媒またはビヒクルは、ゴマ油のような脂肪油、または、エチルオレエートもしくはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームである。注射用水性懸濁液は、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のような懸濁液の粘度を増加させる物質を含有し得る。場合によっては懸濁液がまた、安定剤、または、高度に濃縮された溶液を調製できるように化合物の溶解度を増加させる物質を含有し得る。

10

【0507】

経口使用される医薬調製物は、活性化合物を固体賦形剤に組合せ、場合によっては得られた混合物を粉砕し必要ならば適当な補助剤を添加した後で錠剤または糖衣錠コアを得るように顆粒の混合物を加工することによって得られる。適当な賦形剤はより特定のには、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールなどの糖類のような充填剤；例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、イネデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルーセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び／または、ポリビニルピロリドン（PVP）のようなセルロース調製物である。所望の場合、架橋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のような崩壊剤を添加し得る。

20

【0508】

キット

本発明は更に、MAPKAP-2キナーゼ及びその付随キナーゼ活性を検出するキットを提供する。このようなキットは、MAPKAP-2キナーゼもしくはポリヌクレオチドのレベルを検出するように設計されてもよく、または、直接キナーゼアッセイもしくは結合キナーゼアッセイでHsp-27のような天然基質もしくは人工基質のリン酸化を検出してもよい。このアッセイでは、MAPKAP-2のリン酸化レベル及び／またはキナーゼ活性を測定し得る。

【0509】

（1つまたは複数の）MAPKAP-2キナーゼ及びそれらの付随キナーゼ活性は、真核細胞、細菌、ウイルス、これらの生物から調製された抽出物、生存する生物体内で見出される流体のような様々なサンプルのいずれかで検出され得る。一般に、本発明のキットは、アッセイで使用すべき試薬またはバッファのような要素を収容した1つまたは複数の容器を含む。

30

【0510】

MAPKAP-2キナーゼまたはポリヌクレオチドのレベルを検出するキットは典型的には、MARKファミリー及び／またはMAPKAP-2キナーゼ、DNAまたはRNAの少なくとも1つに結合する試薬を含む。MAPKAP-2キナーゼをコードする核酸を検出するための試薬は核酸プローブでもよくまたはPCRプライマーでもよい。好ましい実施態様では、キットが更に、1つまたは複数の以下の試薬を収容した別の容器を含む：洗浄用試薬、及び、結合した核酸プローブの存在を検出し得る試薬。検出用試薬の非限定例は、放射性標識プローブ、酵素標識プローブ（ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、アフィニティ標識プローブ（ビオチン、アビジンまたはストレプトアビジン）である。

40

【0511】

MAPKAP-2キナーゼを検出するための試薬は典型的には抗体である。サンプル中のMAPKAP-2キナーゼの存在を検出するために有用なキットは、上述の試薬が内部に配置された少なくとも1つの容器手段を含む。キットはまた、試薬の直接的または間接的な検出に適したリポーター基を含む（即ち、リポーター基は試薬に共有結合してもよく、

50

または、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリンまたはレクチンのようなそれ自体が試薬に結合し得る第二分子に結合してもよい)。適当なりポーター基の非限定例は、酵素(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ)、基質、補因子、インヒビター、染料、放射性核種、発光基、蛍光基及びビオチンである。このようなりポーター基は、平均的な当業者に公知の標準方法を使用してサンプル成分に試薬を直接的または間接的に結合させるために使用し得る。

【0512】

より詳細には、区画型キットという用語は個別の容器に試薬を収容した任意のキットを含む。このような容器は小さいガラス容器、プラスチック容器またはプラスチックストリップもしくは紙ストリップである。このような容器によって、サンプルと試薬とが交差汚染しないようにして試薬を1つの区画から別の区画に効率的に移すことができ、また、各容器の薬剤または溶液を1つの区画から別の区画に定量的に添加し得る。このような容器としては、被験サンプルを受容する容器、アッセイに使用されるプローブまたはプライマーを収容している容器、洗浄用試薬(例えば、リン酸塩緩衝生理食塩水、トリスバッファ、など)を収容している容器、ハイブリダイズプローブ、結合抗体、増幅産物などを検出するために使用される試薬を収容している容器、などがある。MAPKAP-2に対する抗体、好ましくは、モノクローナル抗体のような単一特異的抗体またはNBPの組成物を、抗-抗体、ラベルなどのような追加試薬と別々にもしくは一緒に通常は凍結乾燥形態で容器に収容しているキットも提供され得る。

10

【0513】

Hsp-27のリン酸化の測定に基づいてMAPKAP-2キナーゼ活性を検出するキットは一般に、Hsp-27またはその等価物を適当なバッファと組合せて含む。Hsp-27活性の検出に基づいてMAPKAP-2キナーゼ活性を検出するキットは一般に、MAPKAP-2をHsp-27のような適当なMAPKAP-2基質と組合せて含む。場合によっては、キットが更に、基質と組合せる前にMAPKAP-2を精製し、活性化するための適当なバッファ及び/または材料を含む。このようなキットは、上述のように行われる直接または結合キナーゼアッセイに使用され得る。

20

【0514】

従って、別の特徴によれば、本発明は、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、結合相手、基質、酵素などを同定するため、または、個別形態もしくは複合体形態のこのようなポリペプチドの産生を抑制または増進する化合物を同定するためのスクリーニングキットに関する。キットは、

30

- (a) 本発明のポリペプチドと、
- (b) 本発明のポリペプチドを発現する組換え細胞と、
- (c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞膜と、
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体とから成り、本発明のポリペプチドは配列番号2で表される。

【0515】

このようなキットにおいて(a)、(b)、(c)または(d)が本質的な成分を構成することは理解されよう。

40

【0516】

本発明に記載された核酸プローブを当業界で公知の慣用のキットフォーマットの1つに容易に組込めることは当業者に明らかであろう。

【0517】

本発明を以下の非限定実施例によって更に説明する。本願に引用したすべての参考文献、特許及び公開特許出願の記載内容は参照によって本発明に含まれるものとする。

【実施例1】

【0518】

I. 本発明のcDNAポリヌクレオチド配列のクローニング

- (i) 全長MAPKAP-2をコードするcDNA配列(配列番号3)：

50

ヌクレオチド1-1200にわたる全長MAPKAP-2 cDNAは3つのESTクローンの結合によって作製した。これらのESTクローンは：343563 (gb: w69432)；610307 (gb: aa171519)；及びAI478890であった。342563断片と610307断片との組合せを表すDNA断片をpThioHisベクターにサブクロニングし、以下のオリゴヌクレオチドを使用してPCR増幅した：5' ATAGTTTATGCGGCCGC TCA GTG GGC CAG AGC CGC 3' (配列番号5)；及び5' GCT CCA GAA GTG CTG GGT CCA GAC 3' (配列番号6)。PCR条件は、10% (0.5M) GC Me l t バッファ及びPlat inum HiFi DNAポリメラーゼ (Gibco BRL) を利用するClontech Advantage^{RTM}-GC 2 PCRキットによって推奨されている条件であった。このDNAフラグメントはサブクロニング用の3' NOT I 制限部位を含んでいた (フラグメント1)。AI478890 EST DNA断片は上記と同じ条件を利用し、以下の2つのオリゴヌクレオチドを使用してPCR増幅した：5' GTG GGA TTC CC ATG TTG TCA AAC TCC CAG GGC 3' (配列番号7)；及び5' TGG AGT AGA A GG GGG GAT ACC CAC 3' (配列番号8)。このフラグメントは、サブクロニング用の5' BAM HI 部位を含んでいた (フラグメント2)。高速ライゲーションキット法 (Roche) を使用して個々のESTフラグメントをTOPO TAベクターに結合した。Qiaspin Miniprep プロトコル (Qiagen) を使用してクローンをミニプレップ精製した。フラグメント1はAFL III 及びNOT I で制限消化し、フラグメント2はAFL III 及びBAM HI で制限消化してDNAフラグメントをTAベクターから単離した。制限したインサートをQiaspin Miniprep プロトコル (Qiagen) を使用してゲル精製した。インサートをBAM HI 及びNOT I で制限しておいたpGEX 5X-1にRoche高速ライゲーション法を使用してライゲーションした。化学的にコンピtentな大腸菌1-shot TOPO 10細胞を形質転換し、得られたクローンを上述のようにミニプレップ精製した。クローンを制限消化物によって点検して、1200bpのMAPKAP-2 DNAフラグメントの遊離を確認し、更にABI 393 XLにおいてTaq FS Big Dyeターミネーターキット (Applied Biosystems) を用いた全自動配列決定によって確認した。上記の1200bpのMAPKAP-2フラグメントのDNA配列を配列番号3で表し、その推定アミノ酸配列を配列番号4で表す。全長MAPKAP-2 コーディング遺伝子に対応するcDNA配列は少なくとも以下の点で従来技術のMAPKAP-2 遺伝子とは違っている。

【0519】

全長クローン (配列番号3) と従来技術のクローン (登録番号X75346のクローン) のDNA配列比較から、それぞれのDNA配列によってコードされたアミノ酸に以下の違いがあることが判明した：D117H；L247W；及びV248S。MAPKAP-2の9個のEST DNAフラグメントを位置合せするとこれらの変化がすべてのESTで保存され、また、マウス、ハムスター、ウサギ及びショウジョウバエのような別の種でも保存されていることが判明した。

【0520】

本発明の全長クローンは、従来技術のクローンには存在しない4つの追加アミノ酸をN末端にコードしていた。

【0521】

(ii) 末端欠損MAPKAP-2をコードするcDNA配列 (配列番号1)：末端欠損MAPKAP-2は、上述の全長MAPKAP-2 cDNAを鋳型として使用し以下のオリゴヌクレオチドを使用してPCR増幅した：5' CAGTCGGATCCCCTCC CAGGGCCAGAGCCCGC 3' (配列番号9)；及び5' TAGCGCGGCCGCTCAGTTGGGCCAGAGCCGCAAGCCT 3' (配列番号10)。PCR条件は、10% (0.5M) GC Me l t バッファ及びPlat inum

10

20

30

40

50

H i F i DNAポリメラーゼ (G i b c o B R L) を利用する C l o n t e c h A d v a n t a g e^{R T M} - G C 2 P C R キットによって推奨されている条件であった。インサートを B A M H I 及び N O T I で制限しておいた p G E X 5 X - 1 に R o c h e 高速ライゲーション法を使用して結合した。化学的にコンピテントな大腸菌 1 - s h o t T O P O 1 0 細胞を形質転換し、得られたクローンを上述のようにミニプレップ精製した。クローンを制限消化物によって点検して、1 1 8 8 b p の末端欠損 M A P K A P - 2 DNA フラグメントの遊離を確認し、更に A B I 3 9 3 X L において T a q F S B i g D y e ターミネーターキット (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を用いた全自動配列決定によって確認した。

【0522】

10

末端欠損 M A P K A P - 2 コーディングクローン (配列番号 1) と従来技術のクローン (登録番号 X 7 5 3 4 6 のクローン) との DNA 配列比較から、それぞれの DNA 配列のアミノ酸に以下の違いがあることが判明した: D 1 1 7 H; L 2 4 7 W; 及び V 2 4 8 S。M A P K A P - 2 の 9 個の E S T DNA フラグメントを位置合せするとこれらの変化がすべての E S T で保存され、または、マウス、ハムスター、ウサギ及びショウジョウバエのような別の種でも保存されていることが判明した。

【0523】

S f - 9 / バキュロウイルス中の全長 M A P K A P - 2 クローンの発現
M A P K A P - 2 を p A c G 3 X (B D - P h a r m i n g e n) にサブクローニングし、S f - 9 / バキュロウイルス中で以下の条件下で G S T - 融合として発現させた: 4. 4 m L の M A P K A P - 2 ウイルス保存液 (力価 8.5×10^7 p f u / m L) を添加することによって 4 0 0 m L の 1.5×10^6 S f - 9 細胞 / m L を m o i = 1 で感染させた。細胞を 2 6 ° C で 4 8 時間増殖させ、2 m M の $N a_3 V O_4$ 及び 5 0 n g / m L の O k a d a i c A c i d の存在下で 4 2 ° C で 3 0 分間の熱ショックを与えて活性化した。1 5 0 0 r p m で 1 0 分間遠心することによって細胞を収集した。細胞ペレットを - 2 0 ° C で凍結し、1 0 0 m M の トリス - H C l p H 8. 0、1 5 0 m M の N a C l、2 m M の $N a_3 V O_4$ 、5 0 n g / m L の O k a d a i c A c i d 及び S i g m a プロテアーゼカクテル中に溶解させた。上清をグルタチオンセファロース 4 B (P h a r m a c i a) に結合させることによってタンパク質を精製した。カラムを 5 カラム容のカラムバッファで洗浄し、2 0 m M のグルタチオン (S i g m a) を加えたカラムバッファで溶出させた。精製及び溶出用のカラムバッファは 5 0 m M の トリス p H 8. 0、0. 5 M の N a C l、1 m M の D T T、1 0 % のグリセロールから成る。

【0524】

S f - 9 / バキュロウイルス中の末端欠損 M A P K A P - 2 クローンの発現
末端欠損 M A P K A P - 2 を p A c G 3 X (B D - P h a r m i n g e n) にサブクローニングし、S f - 9 / バキュロウイルス中で以下の条件下で G S T - 融合として発現させた: 2. 6 m L の末端欠損 M A P K A P - 2 ウイルス保存液 (力価 1.5×10^8 p f u / m L) を添加することによって 4 0 0 m L の 1.5×10^6 S f - 9 細胞 / m L を m o i = 1 で感染させた。細胞を 2 6 ° C で 4 8 時間増殖させ、2 m M の $N a_3 V O_4$ 及び 5 0 n g / m L の O k a d a i c A c i d の存在下で 4 2 ° C で 3 0 分間の熱ショックを与えて活性化した。1 5 0 0 r p m で 1 0 分間遠心することによって細胞を収集した。細胞ペレットを - 2 0 ° C で凍結し、1 0 0 m M の トリス - H C l p H 8. 0、1 5 0 m M の N a C l、2 m M の $N a_3 V O_4$ 、5 0 n g / m L の O k a d a i c A c i d 及び S i g m a プロテアーゼカクテル中に溶解させた。上清をグルタチオンセファロース 4 B (P h a r m a c i a) に結合させることによってタンパク質を精製した。カラムを 5 カラム容のカラムバッファで洗浄し、2 0 m M のグルタチオン (S i g m a) を加えたカラムバッファで溶出させた。精製及び溶出用のカラムバッファは 5 0 m M の トリス p H 8. 0、0. 5 M の N a C l、1 m M の D T T、1 0 % のグリセロールから成る。

【実施例 2】

【0525】

50

哺乳類細胞発現

本発明のポリペプチドはまた、ヒト胚性腎293（HEK293）細胞または接着性dhfrCHO細胞中で発現できる。最大のタンパク質発現を得るために、典型的には5'及び3'の全部の非翻訳領域（UTR）をpCDNまたはpCDNA3ベクターに挿入する前にタンパク質cDNAから除去する。その後、リポフェクチンによって個々の受容体cDNAを細胞にトランスフェクトし、適正量（約400mg/ml）のG418の存在下で選択する。

【0526】

適当な選択期間、即ち、約3週間の経過後、個々のクローンを採取し、膨張させて更に分析する。ベクター単独をトランスフェクトしたHEK293またはCHO細胞を陰性対照とする。個々の受容体を安定に発現する細胞系を単離するために、典型的には約24-36クローンを選択し、ノーザンブロット分析によって分析する。受容体mRNAは一般に、分析したG418抵抗性クローンの約50%に検出される。

【実施例3】

【0527】

アフリカツメガエル卵母細胞中の機能アッセイ

本発明のMAPKAP-2 cDNAをコードする直鎖化プラスミド鋳型からのキャップ付きRNA転写物はRNAポリメラーゼを使用し標準手順に従ってin vitroで合成し得る。in vitro転写物を最終濃度0.2mg/mlで水に懸濁させる。雌のカエル成体から卵巣葉を摘出し、卵胞を除去した第5期の卵母細胞を採取し、RNA転写物（10ng/卵母細胞）をマイクロインジェクション装置を使用して50nlの丸塊として注入する。

【0528】

次に2電極電圧クランプを使用してアゴニスト接触に応答した個々のアフリカツメガエル卵母細胞の電流を測定する。室温でCa²⁺非含有のBarthの培地中で記録する。アフリカツメガエル系は公知のリガンド及びリガンドを活性化する組織/細胞抽出物をスクリーニングするために使用できる。

【実施例4】

【0529】

マイクロフィジオメトリックアッセイ

様々な二次メッセンジャー系の活性化によって細胞から少量の酸が押し出される。形成される酸は主として、細胞内シグナル伝達プロセスを刺激するために必要な代謝活性の増加の結果である。細胞周囲の媒体のpH変化は極めて小さいがCYTOSENSORマイクロフィジオメーター（Molecular Devices Ltd., Menlo Park, Calif.）によって検出可能である。CYTOSENSORは本発明のG-プロテイン結合受容体のような細胞内シグナル伝達経路を利用するエネルギーに結合している受容体の活性化を検出できる。

【0530】

添付図面を参照しながら本発明の好ましい実施態様について記載したが、本発明がこれらの詳細な実施態様に限定されないこと、当業者は特許請求の範囲に定義された本発明の範囲及び要旨を逸脱することなく記載の実施態様に様々な変更及び修正を加えてもよいことが理解されよう。

【0531】

(配列の説明)

配列番号1は1191ヌクレオチド塩基から成る本発明の新規な末端欠損MAPKAP-2キナーゼをコードするヌクレオチド配列である。

【0532】

配列番号2は配列番号1の遺伝子産物の推定アミノ酸配列である。

【0533】

配列番号3は1200ヌクレオチド塩基から成る本発明の新規な全長ヒトMAPKAP-2キナーゼをコードするヌクレオチド配列である。

2 キナーゼをコードするヌクレオチド配列である。

【0534】

配列番号4は配列番号3の遺伝子産物のアミノ酸配列である。

【図面の簡単な説明】

【0535】

【図1】 t d n a M A P K A P - 2 と命名された1191ヌクレオチド塩基の長さをもつ本発明の末端欠損ヒトM A P K A P - 2 キナーゼをコードするヌクレオチド配列を表す。

【図2】 t a a M A P K A P - 2 と命名された396アミノ酸の本発明の末端欠損ヒトM A P K A P - 2 キナーゼの推定アミノ酸配列を表す。

【図3】 f l d n a M A P K A P - 2 と命名された1203ヌクレオチド塩基の長さをもつ本発明の全長ヒトM A P K A P - 2 キナーゼをコードするヌクレオチド配列を表す。

【図4】 f l a a M A P K A P - 2 と命名された400アミノ酸の本発明の全長ヒトM A P K A P - 2 キナーゼクロンの推定アミノ酸配列を表す。

【図1】

```
tdnaMAPKAP2
1  tccccaggcc agagcccgcc ggtgcggttc cccgccctgg cccgcgcgcc gcagc
cccc
61  acccctggccc tgcgcacccc cccggcgccg cccgcgcgcg gcgcccgccc gcagc
tcccg
121  cagttctccag tcaagtccgg ccgcgagatc aagagaagac ccatcctaga tgact
acaag
181  gtccaccagcc aggtccctgg gtcgggcatc aacgcgaag ttctgcagat ctcca
acaag
241  aggaccaccgg agaatctgc cttcaaaatg ctccaggaet gccccaaggc ccgca
gggag
301  gtggagctgc actggcgggc ctcccagtcg ccgcacatcg tacggatcgt ggaatg
tgtac
361  gagaatctgt acgcggggag gaagtgcctg ctgattgtca tggaatgttt ggaatg
gtgga
421  gaactcttta gcggaatcca ggaatcgagg gccaggccat tccaggaag agaatg
catcc
481  gaaatcatga agagcatcgg tgaagcctac cagtatctgc attcaatcaa catcg
cccat
541  cggcatgtcca agcctgagaa tctcttatat accttccaaa ggcaccaacgc catcc
tgaaa
601  ctccctgact ttgggtttgc caaggaaccc accagccaca acctcttgac cactc
cttgt
661  tataccctgt actatgtgc tccagaagtg ctgggtccag agaagtatga caagt
ccgtg
721  gacatgtggt cccctggcgt catcatgtac atcctgtctg gtgggtatcc cccct
ctcac
781  tccaccacag gcccttgcat ctctccggcg ctgaagctcc gcatccgaat gggcc
agtat
841  gaattctcca acccagaatg gtccagaagta ccagaggaa ggaagatgct catto
ggaat
901  ctgctgaaaa ccagccccc ccagagaagt acatcacccg agcttatgaa ccacc
cttgg
961  atcatgcaat ccacaaaggt ccttcaaac ccactgcaca ccagccgggt cctga
aggag
1021 gacaaaggag ggtgggagga tgcacaggag gagaagacca gtgctttggc cccaa
tgccg
1081 gtagactacg agccagatca gataaaaaag attgaaagt catccacccc ttctg
tgtcg
1141 aagaggccgga agaaagctcg ggcctcgga gctggcgctc tggcccatga a
```

配列番号 1

【図2】

```
ttaaMAPKAP2
1  SQQSSEFFVF PAPAPPQPP TFALPFPFAQ FFFPPTQQFP QFHVKSGLQI KKHAI
IDVYX
61  VTSQVLGLGI NGKVLQFNK RTQEKALKM LQDCFKARR VELHWBASQC PHIVR
IVCVY
121  ENLVAGRKCL LIVBCLDGG ELPSRIQDRG DQAFTEREAS EIMKSGEAI QYLHS
INIAH
181  RDVVFEMLLY TSKFNAILK LIDFGAKET TSHNSLTTPC VTPYVAPRV LQPEX
YKSC
241  DMNSLGVDHY ILQGYPPFY SNHGLAISG MKTRIRMGQY ZFPNPMSEV SEEVK
MLIRN
301  LLRTPTPTRM TITFTMHFW IQSTKEVET PLHTSRVLEK DKERNEDVKE EMTSA
LATMR
361  VDVBQCKKKZ IEDASNPJLL KRRKARALE AALAH*
```

配列番号 2

【図3】

```
fldnaMAPKAP2
1  atgctgtcca actccaggg ccagagcccg ccggtgcctt tcccgcgcc ggccc
cgccg
61  ccgcagcccc ccacccctgc cctgcgcac ccccgcgcgc agccgcgcgc gcgcg
cccc
121  ccgcagttcc cgcagttcca cgtcaagtcc gctctgcaga tcaagaagaa cgcga
tcatc
181  gatgactaca aggtccaccg ccaggtctct gggctgggca tcaacggcaa agttt
tgacg
241  atcttcaaca agaggaccga ggagaaatc gccctcaaaa tgcttcaggc ctgoc
ccaa
301  gccgcaggg aggttagagc gcactggcgc gccctccagc gccccacat cgtac
gcatc
361  gtggagtgtt acgagaatct gtacgcaggg aggaagtgcg tgcgtattgt catgg
aatg
421  ctggcgggtg gagaactctt tagccgaatc caggatcgag gagaccaggc attca
cagaa
481  agagaagcat ccgaactcat gaagagctac gctgaggcca tccagatct gcaat
caatc
541  aacattgcgc atcggaatgt caagctcgag aactcttat acactccaa aaggc
cmaac
601  gccatctgca caactcctga ctttgccll gaaagagaaa ccacagcna caact
ctttg
661  accatctctt gttacacacc gtactactgt gttccagaag tgcctggctc agaga
agtat
721  gacaaagcct gtgactgtgt gtccctgggt gtcctcatgt acatccctgc gtgtg
gggat
781  cccctctctt accccaacca cggccttgcc atctctccgg gcatgaagac tcgca
tcoga
841  atgggcaggt atgaattccc caaccagaa cggctcagaag tatccagaga agtga
agatg
901  ctcattcgga atctgtgaa aacagagccc acccagagaa tgaccatcac cgaat
tcatg
961  aaccacccct ggaatcatga atcaacaaag gtccctcaaa ccccatgcgc cacca
ccggg
1021 gtccctgaag aggaacaagg gccgcgggag gatgtcaagg aggaagatgac cagtg
ccttg
1081 gccacaatgc cggttgacta cgaagcagac aagataaaaa agattgaaga tgcac
ccac
1141 cctctgctg tgaagaggcg gaagaaagct cgggcctcgg aggtctgcgc tctgg
ccac
1201 tga
```

配列番号 3

【図4】

```
flaamMAPKAP2
1  MLGNSGQSQP PVFFFAAF FQFFFLALHP PPAQEPFPFP QQFPQHVKS GLQIK
KNAIL
61  ZDYKTSQVL GLGINGVLQ IFNKTQKRF ALKMLQDCK ARKSEVLHNR ASQCP
HIVRI
121  VDVFENLVAG RKCLLVMEC LVGGELFSRI QDRGDQAFTE REASEIMKI GEATQ
YLHSI
181  NTAHROVYPE NLLVTSRRN AIZLXLDPGF AZETTSINEL TTPCYTPYV APEVL
QPERY
241  DKSCDMWSLG VINYLQGY PPFYSNGLA ISPMKTRIR NQVFPNPE MSEVS
EEVKK
301  LIRNLKTEP TQKCTITEEM NHFWIQSTK VQKTLMTSR VLKEDKEME DVKES
MTSAL
361  ATMRHUYEQI KIKKIEDASN PLLKKRRXA RALEAALAH *
```

配列番号 4

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/090524 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 0907 (US). HAWKINS, Julio [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US). LISNOCK, Jean Marie [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/05670
- (22) International Filing Date: 25 February 2002 (25.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/272,260 28 February 2001 (28.02.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK & CO., INC. [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): LOGGRASSO, Philip [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-
- (74) Common Representative: MERCK & CO., INC.; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (81) Designated States (national): CA, JP, US.
- (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A NOVEL HUMAN SIGNAL TRANSDUCING KINASE-MAPKAP-2; ENCODED PROTEINS, CELLS TRANSFORMED THEREWITH AND USES THEREOF

1. A nucleic acid molecule encoding a protein kinase-2, comprising a sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NOS: 1 and 3. Each of the herein disclosed enzymes is a serine/threonine signal transduction kinase that is phosphorylated and activated by Irfks and p38 MAPK *in vitro*. Also disclosed, *inter alia*, are cells containing the recombinant nucleic acid molecules; antisense constructs thereto; antibodies specific for each of the disclosed proteins; methods for using the novel nucleic acid molecules and their gene products including kits containing the same.

WO 02/090524 A2

WO 02/090524

PCT/US02/05670

TITLE OF THE INVENTION
ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A NOVEL HUMAN
SIGNAL TRANSDUCING KINASE - MAPKAP-2; ENCODED PROTEINS,
CELLS TRANSFORMED THEREWITH AND USES THEREOF

5

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS
Not Applicable.

STATEMENT REGARDING FEDERALLY-SPONSORED R&D
10 Not Applicable.

REFERENCE TO MICROFICHE APPENDIX
Not Applicable.

15 FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to newly identified nucleic acid
molecules encoding intracellular signal-transduction serine/threonine kinases,
polypeptides encoded by the polynucleotides, and antibodies raised against the novel
polypeptides. The invention further provides for the use of the novel polynucleotides
20 and polypeptides, e.g., methods to regulate signal transduction in a cell and methods
for utilizing the herein disclosed MAPKAP-2 kinase in the design of protocols for the
treatment of MAPKAP-2 mediated disorders. Also provided are therapeutic
compositions and their use to treat mammals having medical disorders manifested by
a dysfunctional signal transducing pathway of which the disclosed MAPKAP-2 kinase
25 is an integral member or a dysfunctional MAPKAP-2 kinase.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Regulation of cell growth is mediated by a complex array of signaling
pathways precisely coordinated by different families of cell surface receptors that
30 serve to "sense" the cell environment and supply the cell with an input signal about
any changes in the environment. These signaling pathways regulate all the critical
phases of cell growth which lead to changes in protein synthesis, secretion,
metabolism and gene expression. These signals take the form of growth factors,
hormones, cytokines, and peptides, which bind to and activate specific receptor

WO 02/090524

PCT/US02/05670

5 molecules located on cell surface membranes. The activated receptors, in turn, trigger intracellular signal transduction pathways ultimately culminating in a wide range of cellular responses affecting gene expression, protein secretion, cell cycle progression, and cell differentiation. Signaling pathways within cells are generally formed by chains of intercommunicating proteins, wherein each protein component integrates signals from upstream activators and passes them to various downstream targets or effector proteins.

10 Reversible protein phosphorylation is a central feature of signal transduction. Many cellular processes are known to be modulated in some manner by phosphorylation/dephosphorylation mechanisms. In fact, a number of protein kinase "cascades" have been recognized, in which a series of protein kinases phosphorylate and regulate one another in a sequential fashion ultimately leading to differential phosphorylation of key regulatory molecules such as metabolic enzymes, transcription factors, cytoskeleton proteins, cell-cycle regulators, translation control proteins, ion channels and other protein kinases. Thus, protein kinases and phosphatases play a major role in cell regulation.

15 It is estimated that more than 1000 of the 10,000 proteins active in a typical mammalian cell are phosphorylated. The high-energy phosphate which drives activation is generally transferred from adenosine triphosphate molecules (ATP) to a particular protein by protein kinases and removed from that protein by protein phosphatases. Phosphorylation occurs in response to extracellular signals (hormones, neurotransmitters, growth and differentiation factors, etc.), cell cycle checkpoints, and environmental or nutritional stresses, and is roughly analogous to turning on a molecular switch. When the switch goes on, the appropriate protein kinase activates a metabolic enzyme, regulatory protein, receptor, cytoskeletal protein, ion channel or pump, or transcription factor.

20 Protein kinases are enzymes that phosphorylate other proteins and/or themselves (autophosphorylation). With regard to substrates, protein kinases involved in signal transduction in eukaryotic cells can be divided into three major groups based upon their substrate utilization: protein-tyrosine specific kinases (which phosphorylate substrates on tyrosine residues), protein-serine/threonine specific kinases (which phosphorylate substrates on serine and/or threonine residues) and dual-specificity kinases (which phosphorylate substrates on tyrosine, serine and/or threonine residues). Well over a hundred protein kinases have been identified to date.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

For reviews on protein kinases, see *Kemp, B. E. (ed.)*, Peptides and Protein Phosphorylation, CRC Press Inc. (1990) and *Hanks et al.*, Science 241:42-52 (1988).

Given their key role in cellular regulation, it is not surprising that defects in protein kinases have been implicated in many disease states and conditions.

- 5 For example, the over-expression of cellular tyrosine kinases such as the EGF or PDGF receptors, or the mutation of tyrosine kinases to produce constitutively active forms (oncogenes) occurs in many cancer cells. See *Drucker et al.*, Nature Medicine 2: 561-56 (1996). Protein tyrosine kinases are also implicated in inflammatory signals. Defective Thr/Ser kinase genes have been demonstrated to be implicated in
- 10 several diseases such as myotonic dystrophy as well as cancer, and Alzheimer's disease. *Sanpei et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 341-6 (1995); *Sperber et al.* Neurosci. Lett. 197: 149-153 (1995); *Grammas et al.* Neurobiology of Aging 16: 563-569 (1995); *Govoni et al.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 777: 332-337 (1996). More, kinases have also been implicated in angiotensin II and hematopoietic cytokine
- 15 receptor signal transduction. *B. Berk et al.*, Circ. Res., 80:5, pp. 607-16 (1997); *R. Mufson*, FASEB J., 11:1 pp. 37-44 (1997).

Mitogen-activated protein kinases (MAP kinases/ MAPK), a family of serine/threonine protein kinases, have been recently demonstrated to play a central role in mediating the intracellular actions of a variety of extracellular agonists that

20 include growth factors, mitogens and differentiating agents whose receptors are protein tyrosine kinase (Cobb *et al.*, 1991; Sturgill and Wu, 1991).

Over the past few years, data suggest that MAP kinase facilitates signal transduction through both protein kinases and protein phosphatases and is responsible for triggering biological effects across a wide variety of pathophysiological

25 conditions. These include conditions manifested by dysfunctional leukocytes; T-lymphocytes; acute and chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, inflammatory bowel disease; osteoarthritis; atherosclerosis; auto-immune disorders; asthma and allergic response.

Nearly all cell surface receptors use one or more of the MAP protein

30 kinase "cascades" during signal transduction. Signals from diverse receptors, including receptor protein tyrosine kinases, nonreceptor protein tyrosine kinases, cytokine receptors, and heterotrimeric G protein-coupled receptors have all been reported to result in activation of the MAPKs.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

5 The MAP kinase cascade, is activated as an early event in the response of cells to a wide variety of stimuli. The mechanism of activation of MAP kinases has been intensively investigated and reveals a conserved signaling cascade initiated by ligand induced activation of receptor tyrosine kinases which leads to a sequential activation of a series of protein kinases. The variety of signals that conscript the MAP kinase pathway demonstrates that this cascade serves a myriad of purposes, and the consequences of its activation will depend on cellular context.

10 MAP kinases are activated by phosphorylation at a dual phosphorylation motif with the sequence Thr--X--Tyr by mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs) which is itself 'dual specificity' enzyme (Ahn *et al.*, 1991; Gomez and Cohen, 1991; Nakielnny *et al.*, 1992a,b). The dual-specificity kinase is capable of phosphorylating both tyrosine and serine/threonine residues in proteins. Activated MAPK undergoes a translocation to the nucleus where it can directly phosphorylate and activate a variety of transcription factors including c-Myc, C/EBP β , p62^{sup}.TCF/Elk-1, ATF-2 and c-Jun. Grunicke, Hans H., Signal Transduction Mechanisms in Cancer, Springer-Verlag (1995).

15 The mammalian MAP kinases include the extracellular signal regulated kinases (ERKs) the c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and the CSBP/p38/RK/Mpk2 kinases. (Cobb *et al.*). These subgroups are distinguished by the sequence of the tripeptide dual phosphorylation motif that is required for MAP kinase activation: Thr-Glu-Tyr (ERK), Thr-Pro-Tyr (JNK), and Thr-Gly-Tyr (p38). The best-characterized pathway leads to the activation of the extracellular-signal-regulated kinase (ERK). Less well understood are the signal transduction pathways leading to the activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) and the p38 MAPK (for reviews, see Davis, Trends Biochem. Sci. 19:470-473 (1994). Each pathway contains a MAP kinase module, consisting of a MAP kinase or ERK, a MAP/ERK kinase (MEK), and a MEK kinase (MEKK).

20 All known signaling pathways are believed to use the two dual specificity protein kinases MEK1 and MEK2 to phosphorylate and activate MAP kinase. Substrates of the MAP kinases include other protein kinases and several transcription factors, which are activated by phosphorylation to induce gene expression.

JNK and p38 kinases are activated in response to the pro-inflammatory cytokines TNF- α and interleukin-1, and by cellular stress such as heat shock,

ultraviolet radiation, lipopolysaccharides and inhibitors of protein synthesis. See *B. Derijard et al.*, *Cell*, 76, pp. 1025-37 (1994); *L. Shapiro et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, pp. 12230-4 (1995). Activation of the MAPK kinase, particularly the p38 pathway results in phosphorylation of transcription and initiation factors, and affects

5 cell division, apoptosis, invasiveness of cultured cells and the inflammatory response. p38 MAP kinase activates many protein kinases such as the MAP-kinase-activated protein kinases MAPKAP-2 and MAPKAP-3, the MAP-kinase-interacting kinases MNK1 and MNK2, and the p38-regulated/activated protein kinases PRAK and MSK1. Moreover, transcription factors such as ATF2 (activating

10 transcription factor 2), CHOP/GADD153 and MEF2 (myocyte enhancer factor 2) are phosphorylated in parallel. Recently, the nucleus has been shown to be a target for the signal transduction of p38 MAP kinases.

In sharp contrast, ERK kinases are activated by mitogens and growth factors. See *D. Bokemeyer et al.*, *Kidney Int.*, 49, pp. 1187-98 (1996). The ERK

15 cascade starts with one or more *Raf* family kinases, which phosphorylate and activate MAP kinase kinase 1 (MKK1) and MKK2, permitting the MKKs to phosphorylate and activate the MAP kinases extracellular signal-regulated kinase 1 (Erk1) and Erk2 (Davis, 1993; Marshall, 1995). Erks then phosphorylate both cytoplasmic and nuclear

20 substrates, including the epidermal growth factor receptor, cytosolic phospholipase A2, ribosomal S6 kinase II (Rsk). Elk-1 (a ternary complex factor), c-Jun and c-Myc (*Sturgill et al.*, 1988; *Pulverer et al.*, 1991; and *Gille et al.*, 1995). A net result of activating the ERK cascade is induction of immediate early gene transcription leading to cell proliferation or differentiation. Upon activation, MAP kinases have been reported to translocate into the nucleus and phosphorylate transcription factors.

25 Among the substrates for MAP kinases are S6 kinases - *rsk1* and *rsk2* (p90rsk) and MAPKAP kinase-2 (MAPKAP-2), which is an acronym for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2.

MAPKAP-2 was originally identified in skeletal muscle as an enzyme

30 that is activated by the p42 and p44 isoforms of mitogen-activated protein MAP kinase (MAPK) (Stokoe et al., 1992a) and distinguished from the RSK family of ribosomal protein S6 kinases (MAPKAP kinases-1), which are also activated by p42/p44MAPK, by its substrate specificity, insensitivity to the inhibitor H7, and amino acid sequence (Stokoe et al., 1992a, 1993). The catalytic domain of MAPKAP kinase-2 is most similar (35%-40% identity) to a branch of the protein kinase

WO 02/090524

PCT/US02/05670

phylogenetic tree that includes several calmodulin-dependent protein kinases and the C-terminal kinase domain of MAPKAP kinase-2 (Stokoe et al., 1993, Engel et al., 1993). It is preceded by a proline-rich N-terminal domain, while two different C-terminal sequences have been reported that may be generated by alternative splicing of a common precursor mRNA. One of these isoforms contains a putative nuclear localization signal KK(X)₁₀KRRKK (Stokoe et al., 1993; Zu et al., 1994). The MAPKAP-2 mRNA transcript is present at a similar concentration in every mammalian tissue examined (Stokoe et al., 1993; Zu et al., 1994).

Substrates of MAPKAP-2 include glycogen synthase; small heat shock proteins Hsp-25 and Hsp-27, ATF2 and CREB (Stokoe et al., 1992b; Freshney et al., 1994; Tan et al., 1996). The best characterized substrate for MAPKAP-2 is Hsp27.

MAPKAP-2 becomes activated when cells are stimulated with interleukin-1 or tumour necrosis factor or exposed to cellular stresses (Rouse et al., 1994). MAPKAP-2 is also phosphorylated and activated by Erks *in vitro*. In cells, however, it is predominantly regulated by p38 MAPK. In the inflammatory response, TNF- α and IL- β activate p38, which triggers production of more TNF and IL-1, which, in turn, amplifies the inflammatory response. This process is thought to play a role in septic shock and formation of the atherosclerotic plaque.

In view of the recent literature, it is generally accepted that the p38 kinase and MAPKAP-2 kinase pathway are central components in the response of cells to chemical, mechanical and proinflammatory assaults.

Clear evidence has been shown, for instance, that ERK, JNK and p38 pathways are strongly linked to IL-2 production. P38 activation is clearly established to be required for full T-lymphocyte activation leading to IL-2 gene transcription and T-cell proliferation. Interruption of the signaling process by selective kinase inhibition is therefore expected to reduce IL-2 production and T-lymphocyte proliferation which would be therapeutically beneficial in chronic inflammatory diseases including but not limited to rheumatoid arthritis, Crohn's disease and inflammatory bowel disease.

The MAPKAP-2 kinase described herein (SEQ ID NO:2) is believed to transduce cellular response to stress related stimuli leading to the activation of proinflammatory gene products. The deleterious effects of the mediators of inflammation, including cytokines, opens new avenues for the development of original anti-inflammatory therapies. As MAPKs and MAPKAP-2 play a central role

WO 02/090524

PCT/US02/05670

in signaling events which mediate cellular response to stress, their inactivation or antagonization is key to the attenuation of the response.

MAPKs including MAPKAP-2 are thus expected to play key roles in the pathology of autoimmune diseases including but not limited to rheumatoid arthritis (RA), Crohn's disease, inflammatory bowel disease, osteoarthritis (OA), and multiple sclerosis (MS).

Accordingly, the novel human serine/threonine signal-transduction kinase described herein (SEQ ID NO:2), and nucleic acid sequence coding therefor, e.g. SEQ ID NO:1 has significant potential as a specific targets that can be exploited diagnostically and therapeutically for the control of dysfunctional leukocytes, including but not limited to dysfunctional T-lymphocytes, and in the treatment of chronic inflammation including rheumatoid arthritis (RA), Crohn's disease, inflammatory bowel disease, osteoarthritis (OA) and autoimmune disease, and in the study, diagnosis, and treatment of acute and chronic inflammation as well as other diseases manifested by dysfunctional native MAPKAP-2 kinase.

Indeed, potential diagnostic and therapeutic applications are readily apparent for modulators of the human MAPKAP-2 signal-transduction serine/threonine kinase described herein. Areas which are common to disease particularly in need of therapeutic intervention include but are not limited to pathophysiological disorders manifested by dysfunctional leukocytes, T-cell activation, acute and chronic inflammatory disease such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease and inflammatory bowel disease, auto-immune disorders, osteoarthritis, transplant rejection, macrophage regulation, atherosclerosis, fibroblasts regulation, pathological fibrosis, asthma, allergic response, atheroma, osteoarthritis, sepsis, neurodegeneration, and related disorders.

Compounds which modulate or inactivate specific signal transduction polypeptide(s) integral to specific cytosolic pathways generally will have significant potential for the ability to modulate or attenuate downstream physiological responses. Accordingly, the ability to screen for compounds which modulate the activity of native or recombinant human MAPKAP-2 kinase such as the one described herein is of paramount importance toward the development of therapeutic agents. Accordingly, applicants have endeavored to clone a human MAPKAP-2 kinase, which will prove useful in target-based drug design programs.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Applicants now report the isolation by expression cloning of a novel human serine/threonine signal-transduction kinase described herein. Applicants believe that the newly discovered isolated nucleic acid molecules that encode the novel kinase will allow for the development of therapeutic candidates effective to

5 treat various disorders attending a defective signal-transduction pathway involving a PKAP-2 kinase.

It is noted that the novel kinase of the present invention differs in sequence—at one or more base-contacting amino acid residues—from the known MAPKAP-2 or has a nucleotide base sequence that also differs and is thus distinct

10 from that of a known MAPKAP-2 kinase.

SUMMARY OF THE INVENTION

Disclosed herein is a newly identified enzyme, MAPKAP-2, which is a serine/threonine signal transduction kinase that is phosphorylated and activated by,

15 *inter alia*, Erks and p38 MAPK *in vitro*.

In particular, the present invention relates to nucleic acid molecules coding for MAPKAP-2 kinases; recombinant nucleic acid molecules; cells containing the recombinant nucleic acid molecules; antisense MAPKAP-2 nucleic acid constructs; antibodies raised against such proteins; hybridomas containing the

20 antibodies; nucleic acid probes for the detecting of MAPKAP-2 nucleic acid; a method of detecting MAPKAP-2 nucleic acid or polypeptide in a sample; kits containing nucleic acid probes or antibodies; method(s) of detecting a compound capable of binding to MAPKAP-2 or a fragment thereof; a method of detecting an agonist or antagonist of MAPKAP-2 activity; a method of agonizing or antagonizing

25 MAPKAP-2 associated activity in a mammal; a method of treating pathological conditions associated with over or underexpression of MAPKAP-2 kinase(s) compared to normal in a mammal with an agonist or antagonist of the disclosed polypeptide; and a pharmaceutical composition comprising a MAPKAP-2 agonist or antagonist.

30 The isolated kinase-encoding nucleic acid molecule preferably comprises the sequences of nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 1.

Another aspect of the present invention includes a recombinant molecule, comprising a nucleic acid molecule capable of hybridizing under stringent

WO 02/090524

PCT/US02/05670

conditions with a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:1, in which the nucleic acid molecule is operatively linked to an expression vector.

Antisense molecule(s) comprising the complement of a polynucleotide comprising the sequence set forth in SEQ ID NO:1 is also provided. In particular, an aspect of the invention is drawn to antisense molecules that have the ability to modulate the transcription/translation of the nucleic acid coding region of SEQ ID NO: 1.

Methods to identify compounds that modulate the biological activity of human MAPKAP-2 kinase are also provided.

Allelic variants of the polynucleotide having a sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NO:1 are also provided.

The invention is further directed to an expression vector for the expression of the signal transduction kinase of the invention in a recombinant host cell, wherein the vector contains a nucleic acid molecule comprising a sequence of nucleotides that encode a kinase having an amino acid sequence substantially as depicted in SEQ ID NO:2 or a pharmacologically and/or biologically active or biologically effective derivative thereof.

The invention is further directed to an expression vector for the expression of a biologically effective nucleic acid molecule comprising an antisense nucleic acid sequence derived from SEQ ID NO:1 which has the ability to modulate the transcription/translation of a nucleic acid coding region of the signal transducing polypeptide of the present invention.

Recombinant cells containing the above-described DNAs, mRNA or plasmids i.e., encoding MAPKAP-2 kinase are also provided herein.

Indeed, an aspect of the invention is directed to a host cell containing an expression vector for expression of a signal transducing polypeptide, wherein the vector contains a nucleic acid molecule comprising a sequence of nucleotides which encode the signal transducing polypeptide having the amino acid sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:2 or a pharmacologically and/or biologically active or biologically effective derivative thereof.

Yet another aspect of the present invention, is drawn to nucleic acid probes comprising nucleic acid molecules of sufficient length to specifically hybridize to the polynucleotide sequences disclosed herein. The nucleic acid probes of the invention enable one of ordinary skill in the art of genetic engineering to identify and

WO 02/090524

PCT/US02/05670

clone similar polypeptides from any species thereby expanding the usefulness of the sequences of the invention.

The present invention is also directed to an isolated and purified nucleic acid molecule derived from SEQ ID NO:1 comprising a sequence of
 5 nucleotides that encode a biologically effective dominant negative mutant polypeptide substantially as forth in SEQ ID NO:2 which has the ability to modulate the biological activity and/or pharmacological activity of the MAPKAP-2 kinase of the invention.

The newly discovered member of the protein serine/threonine kinases is capable of regulating signals initiated from a receptor on the surface of a cell, the
 10 ability to regulate being dependent upon activation by a member of the MAPK-dependent pathway. The herein disclosed polypeptide comprises at least a portion of an amino acid sequence encoded by a nucleic acid sequence that is capable of hybridizing under stringent conditions with a nucleic acid molecule encoding an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2.

15 Another aspect of the invention contemplates a purified polypeptide comprising the amino acid sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:2. Biologically active fragments thereof are also included.

A further aspect of the invention provides assay(s) for screening and the quantitative characterization of potentially pharmacologically effective
 20 compounds that specifically interact with and modulate the activity of a signal transducing polypeptide of a signal transduction pathway, particularly the disclosed MAPKAP-2 kinase.

The invention further provides a method of identifying compounds that modulate the biological activity and/or pharmacological activity of a signal
 25 transducing molecule, comprising:

(a) combining a candidate compound suspected of modulating signal transduction activity with a polypeptide having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, and
 (b) measuring an effect of the candidate compound modulator on
 30 the biological and/or pharmacological activity of the polypeptide.

The invention further provides a method of identifying compounds that modulate the biological and/or pharmacological activity of a signal transducing molecule, comprising:

WO 02/090524

PCT/US02/05670

(a) combining a candidate compound modulator of signal transduction activity with a host-cell expressing a polypeptide having a sequence of amino acids as set forth in SEQ ID NO:2, and

5 (b) measuring an effect of the candidate compound modulator on the biological and/or pharmacological activity attending the polypeptide. Such a measurement may include detecting changes in level or activity of the polypeptide.

The present invention is also directed to a compound identified by means of one of the aforementioned methods, wherein the compound modulates the biological and/or pharmacological activity of i.e. kinase activity of a MAPKAP-2
10 kinase.

Further, the invention is directed to a pharmaceutical composition comprising a compound identified by means of one of the aforementioned methods, wherein the compound modulates the biological and/or pharmacological activity of a MAPKAP-2 kinase.

15 Method(s) of treatment of a disease state manifested by a dysfunctional signal transduction pathway are also provided. One such method comprises administering an effective amount of a compound identified by means of one of the aforementioned methods, wherein the compound modulates the biological and/or pharmacological activity of a MAPKAP-2 kinase; or administering an effective
20 amount of a biologically effective dominant negative mutant substantially as depicted in SEQ ID NO:2 or a functional derivative thereof.

An alternative embodiment is drawn to a method of treatment of a patient in need of such treatment for a pathophysiological condition mediated by a defective signal-transducing molecule, comprising administration of an effective
25 amount of a biologically effective antisense nucleic acid molecule derived from SEQ ID NO:1; or administering an effective amount of a nucleic acid which encodes a biologically effective dominant negative mutant substantially as depicted in SEQ ID NO:2 or a functional derivative thereof.

In accordance with yet another aspect of the present invention, there
30 are provided antibodies specific for the signal transducing polypeptide comprising the amino acid sequence substantially as depicted in SEQ ID NO:2, as well as a diagnostic composition for the identification of a polypeptide sequence comprising the amino acid sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:2.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

The invention is also directed to PCR primers derived from SEQ ID NO:1 as well as to methods of making nucleic acid molecules substantially as depicted in SEQ ID NO:1.

Plasmids containing genomic DNA, cDNA or mRNA encoding the
5 MAPKAP-2 kinase polypeptide are also provided.

In accordance with a further aspect of the present invention, there are provided processes for producing the signal transducing kinase of the invention by recombinant techniques comprising culturing transformed prokaryotic and/or eukaryotic host cells, containing nucleic acid sequences encoding the MAPKAP-2
10 kinase of the invention under conditions promoting expression of the kinase polypeptide(s), followed by subsequent recovery of the polypeptide(s).

In another aspect, the invention provides means for regulating the expression levels of the MAPKAP-2 kinase of the invention thus treating, therapeutically and/or prophylactically, a disorder which can be linked directly or
15 indirectly to the novel kinase disclosed herein.

Also within the invention is a therapeutic composition including, in a pharmaceutically-acceptable carrier, (a) the MAPKAP-2 kinase of the invention, (b) an immunologically active or biologically active fragment thereof, or (c) an antibody having affinity for (a) or (b) above. These therapeutic compositions provide a means
20 for treating various disorders characterized by abnormal (low or ubiquitous) level of expression or activity or a defective signal transducing polypeptide having an amino acid sequence substantially as set forth in SEQ ID NO: 2.

By virtue of having the signal transducing kinase of the invention, agonists or antagonists may be identified which stimulate or inhibit the interaction of a native or recombinant MAPKAP-2 kinase with its binding partner(s), i.e., upstream
25 kinases such as ERK or p38, both of which are known to phosphorylate MAPKAP-2 or downstream target substrates such as Hsp-27 or Hsp-25, which are phosphorylated by activated MAPKAP-2. With either agonists or antagonists the metabolism and reactivity of cells, which express a MAPKAP-2 kinase having an amino acid
30 sequence substantially as set forth of SEQ ID NO: 2, are controlled, thereby providing a means to abate or in some instances prevent the disease of interest.

In accordance with the above, there are provided methods of screening for compounds which bind to and activate (agonist) or inhibit activation (antagonist) of a MAPKAP-2. Indeed, testing of the herein disclosed kinase with a variety of

WO 02/090524

PCT/US02/05670

potential agonists or antagonists would provide additional information with respect to the function and activity of the kinase. Such information may lead to the identification of compounds which are capable of very specific interaction with the signal transducing kinase disclosed herein. Such specificity may prove of great value
5 in medical application. Such assays may be designed to identify compounds which bind to the MAPKAP-2 kinase and thereby block or inhibit interaction of the kinase with its binding partner. Other assays can be designed to identify compounds which can stimulate MAPKAP-2-mediated intracellular pathways.

A method of detecting an agonist or antagonist of the herein disclosed
10 human MAPKAP-2 kinase comprises the steps of incubating cells that produce MAPKAP-2 in the presence of a compound and detecting changes in the level of MAPKAP-2 kinase activity.

Another aspect of the invention is drawn to a pharmaceutical composition comprising a MAPKAP-2 agonist or antagonist in an amount sufficient
15 to alter MAPKAP-2 associated kinase activity, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient.

In accordance with still another aspect of the present invention, there are provided diagnostic assays for detecting diseases related to mutations in the nucleic acid sequences encoding the novel invention and for detecting an altered level
20 of the encoded polypeptide.

Also, testing of the herein disclosed MAPKAP-2 kinase with a variety of potential agonists or antagonists will provide additional information with respect to the function and activity of the MAPKAP-2 kinase and should lead to the identification and design of compounds that are capable of very specific interaction
25 with native MAPKAP-2 or its interaction with its binding partner.

The novel nucleic acids disclosed herein, polypeptides encoded by them, vectors, and cells provided herein permit production of a MAPKAP-2 kinase, as well as antibodies to the kinase and antibodies thereto. This provides a means to prepare synthetic or recombinant kinase polypeptides proteins that are substantially
30 free of contamination from many other proteins whose presence can interfere with analysis of a single invention. The availability of the novel MAPKAP-2 makes it possible to observe the effect of a drug substance on the MAPKAP-2 kinase to thereby perform initial *in vitro* screening of the drug substance in a test system that is

WO 02/090524

PCT/US02/05670

specific for the MAPKAP-2 kinase disclosed herein or its native form and its corresponding binding partner.

As well, these also provide diagnostic assays for detecting diseases mediated by a defective signal transduction pathway, particularly one which is attended by a defective signal transducing polypeptide(s) having an amino acid sequence substantially as that set forth in SEQ. ID NO: 2. .

The availability of invention -specific antibodies also makes possible the application of the technique of immunohistochemistry to monitor the distribution and expression density of the MAPKAP-2 kinase as well as its corresponding ligand (e.g., in normal vs diseased brain tissue). Such antibodies could also be employed for diagnostic and therapeutic applications. This antibody is preferably capable of neutralizing a biological activity of the polypeptide (i.e. adenylate cyclase activation).

Thus, antibodies, (monoclonal or polyclonal), including purified preparations of an antibody, which is capable of forming an immune complex with the kinase of the invention, such antibody being generated by using as antigen either a polypeptide or a fragment thereof.

As a consequence, an aspect of the invention provides a substantially pure intracellular signal regulated kinase, in which the protein is isolated using an antibody capable of selectively binding to a human kinase polypeptide having the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2.

Another aspect of the invention includes an isolated antibody capable of selectively binding to a polypeptide that is phosphorylated by at least one member of a MAPK-dependant pathway, the antibody capable of being produced by a method comprising administering to an animal an effective amount of a substantially pure protein of the present invention, and recovering an antibody capable of selectively binding to the protein.

In accordance with yet a further aspect of the present invention, there are provided processes for utilizing the signal transducing kinase of the invention or nucleic acid molecules encoding such kinase(s) for *in vitro* purposes such as synthesis of DNA; manufacture of DNA vectors, kinase assays etc.

Further in relation to drug development and therapeutic treatment of various disease states, the availability of polynucleotides encoding the MAPKAP-2 kinase of the invention enables identification of any alterations in such genes (e.g., mutations) which may correlate with the occurrence of certain disease states. In

WO 02/090524

PCT/US02/05670

addition, the creation of animal models of such disease states becomes possible, by specifically introducing such mutations into synthetic DNA sequences which can then be introduced into laboratory animals or *in vitro* assay systems to determine the effects thereof.

- 5 At least some of these and other objects are addressed by the various embodiments of the invention disclosed herein. Other features and advantages of the invention will be apparent to those of skill in the art upon further study of the specification and claims.

10 DETAILED DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 presents the nucleotide sequence encoding a truncated human MAPKAP-2 kinase of the invention designated tdnaMAPKAP-2 comprising 1191 nucleotides bases in length.

- 15 FIG. 2 presents the deduced amino acid sequence of truncated human MAPKAP-2 kinase of the invention, designated taaMAPKAP-2 of 396 amino acids.

FIG. 3 presents the nucleotide sequence encoding a full length human MAPKAP-2 kinase of the invention designated fldnaMAPKAP-2 comprising 1203 nucleotides bases in length.

- 20 FIG. 4 presents the deduced amino acid sequence of the full length human MAPKAP-2 kinase clone of the invention, designated flaaMAPKAP-2 of 400 amino acids.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- 25 It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a host cell" includes a plurality of such host cells, reference to the "antibody" is a reference to one or more antibodies and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth.

- 30 It is understood that the definition(s) and description(s) following hereunder, while directed to the truncated MAPKAP-2 encoding polynucleotide(s) and the encoded protein(s) (SEQ ID NO: 1 and 2 respectively), apply equally to the full length clone (SEQ ID NOs: 3 and 4).

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to

WO 02/090524

PCT/US02/05670

which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described.

5 All publications mentioned herein are incorporated herein by reference for the purpose of describing and disclosing the methodologies, vectors etc which are reported in the publications that might be used in connection with the invention. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

10 In the description that follows, a number of terms used in the field of recombinant DNA technology are extensively utilized. In order to provide a clearer and consistent understanding of the specification and claims, including the scope to be given such terms, the following definitions are provided.

A "gene" refers to a nucleic acid molecule whose nucleotide sequence codes for a polypeptide molecule. Genes may be uninterrupted sequences of
15 nucleotides or they may include such intervening segments as introns, promoter regions, splicing sites and repetitive sequences. A gene can be either RNA or DNA. A preferred gene is one that encodes the MAPKAP-2 kinase of the present invention.

Use of the terms "isolated" and/or "purified" in the present specification and claims as a modifier of DNA, RNA, polypeptides or proteins means
20 that the DNA, RNA, polypeptides or proteins so designated have been produced in such form by the hand of man, and thus are separated from their native in vivo cellular environment. As a result of this human intervention, the recombinant DNAs, RNAs, polypeptides and proteins of the invention are useful in ways described herein that the DNAs, RNAs, polypeptides or proteins as they naturally occur are not.

25 Similarly, as used herein, "recombinant" as a modifier of DNA, RNA, polypeptides or proteins means that the DNA, RNA, polypeptides or proteins so designated have been prepared by the efforts of human beings, e.g., by cloning, recombinant expression, and the like. Thus as used herein, recombinant proteins, for example, refers to proteins produced by a recombinant host, expressing DNAs which
30 have been added to that host through the efforts of human beings.

An "insertion" or "addition", as used herein, refers to a change in an amino acid or nucleotide sequence resulting in the addition of one or more amino acid or nucleotide residues, respectively, as compared to the naturally occurring molecule.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

A "substitution", as used herein, refers to the replacement of one or more amino acids or nucleotides by different amino acids or nucleotides, respectively.

By "signal transduction disorder" is meant any disease or condition associated with an abnormality in a signal transduction pathway. The abnormality
5 may result from a defective MAPKAP-2, kinase or inadequate phosphorylation by its native upstream protein kinase, i.e., mammalian ERK or p38, or low or ubiquitous level of expression of MAPKAP-2 kinase. Alternatively, activated ERK or p38 may not interact effectively with endogenous MAPKAP-2 kinase and thus cause the abnormality in the signal transduction pathway. On the other hand, the level of
10 interaction between them or MAPKAP-2 and any of its native binding partners may be normal, but affecting that interaction may effectively treat a signal transduction pathway disorder.

A "disorder" is any condition that would benefit from treatment with the MAPKAP-2 kinase or nucleic acid encoding such a kinase. This includes chronic
15 and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question. Disorders include, but are not limited to, those of the cardiovascular system, the nervous system and those involving pain perception.

By "abnormality" or "aberrant" is meant a level which is statistically
20 different from the level observed in organisms not suffering from such a disease or condition and may be characterized as either an excess amount, intensity or duration of signal or a deficient amount, intensity or duration of signal. The abnormality in signal transduction may be realized as an abnormality in cell function, viability or differentiation state. An abnormal interaction level may also either be greater or less
25 than the normal level and may impair the normal performance or function of the organism.

By "signal transduction pathway" is meant the sequence of events that involves the transmission of a message from an extracellular protein receptor to the cytoplasm through a cell membrane. The signal ultimately will cause the cell to
30 perform a particular function, for example, to uncontrollably proliferate and therefore cause cancer. Various mechanisms for the signal transduction pathway (Fry et al., Protein Science, 2:1785-1797, 1993) provide possible methods for measuring the amount or intensity of a given signal. Depending upon the particular disease associated with the abnormality in a signal transduction pathway, various symptoms

WO 02/090524

PCT/US02/05670

may be detected. Those skilled in the art recognize those symptoms that are associated with the various other diseases described herein. Furthermore, since some adapter molecules recruit secondary signal transducer proteins towards the membrane, one measure of signal transduction is the concentration and localization of various
 5 proteins and complexes. In addition, conformational changes that are involved in the transmission of a signal may be observed using circular dichroism and fluorescence studies.

The term "agonist", as used herein, is meant to refer to an agent that mimics or upregulates (e.g. potentiates or supplements) MAPKAP-2 bioactivity. A
 10 MAPKAP-2 agonist can be a wild-type MAPKAP-2 protein or derivative thereof having at least one bioactivity of the wild-type MAPKAP-2. An MAPKAP-2 therapeutic can also be a compound that upregulates expression of an MAPKAP-2 gene or which increases at least one bioactivity of an MAPKAP-2 protein. An agonist can also be a compound, which increases the interaction of an MAPKAP-2 kinase
 15 with another molecule, e.g., its substrate. Alternatively, "agonist" refers to a molecule which, when bound to MAPKAP-2 protein, increases or prolongs the duration of the effect of MAPKAP-2.

"Antagonist" as used herein is meant to refer to an agent that downregulates (e.g. suppresses or inhibits) at least one MAPKAP-2 bioactivity. An
 20 MAPKAP-2 antagonist can be a compound, which inhibits or decreases the interaction between an MAPKAP-2 kinase and another molecule, e.g., a downstream target molecule. Accordingly, a preferred antagonist is a compound, which inhibits or decreases binding of MAPKAP-2 to either its upstream kinase, e.g., a member of the MAPK that activates MAPKAP-2, or a downstream target substrate that gets activated
 25 by MAPKAP-2. An antagonist can also be a compound that downregulates expression of an MAPKAP-2 gene or which reduces the amount of MAPKAP-2 protein present. The MAPKAP-2 antagonist can be a dominant negative form of an MAPKAP-2 kinase, e.g., a form of an MAPKAP-2 kinase which is capable of interacting with an upstream region of a gene, which is regulated by an MAPKAP-2
 30 transcription factor, but which is not capable of regulating transcription. The MAPKAP-2 antagonist can also be a nucleic acid encoding a dominant negative form of an MAPKAP-2 kinase, an MAPKAP-2 antisense nucleic acid, or a ribozyme capable of interacting specifically with an MAPKAP-2 RNA. Yet other MAPKAP-2

WO 02/090524

PCT/US02/05670

antagonists are molecules which bind to an MAPKAP-2 kinase and inhibit its action. Such molecules include peptides, antibodies and small molecules.

"Dominant negative mutant" as used herein refer to a nucleic acid coding region sequence which has been changed with regard to at least one position in the sequence, relative to the corresponding wild type native version, preferably at a position which changes an amino acid residue position at an active site required for biological and/or pharmacological activity in the native peptide to thereby encode a mutant peptide. Dominant negative mutant as used herein also, in the same manner, may be used to refer to a mutant peptide.

Thus, "dominant negative mutant protein" refers to a mutant protein that interferes with the normal signal transduction pathway. The dominant negative mutant protein contains the domain of interest (e.g., a MAPKAP-2 kinase or a NBP), but has a mutation preventing proper signaling, for example by preventing binding of a second domain from the same protein. One example of a dominant negative protein is described in Millauer et al., Nature Feb. 10, 1994. The agent is preferably a peptide which blocks or promotes interaction of a signal-transducing kinase having a sequence as substantially set forth in SEQ ID NO: 2 and the NBP. The peptide may be recombinant, purified, or placed in a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

The term "modulation" is used herein to refer to the capacity to either enhance or inhibit a biological activity and/or pharmacological activity of a signal transduction molecule having the sequence as substantially set forth in SEQ ID NO: 2 or to the capacity to either enhance or inhibit a functional property of a nucleic acid coding region of the invention nucleic acids. The term "modulate", as used herein, may also refers to a change or an alteration in the biological activity of MAPKAP-2 kinase.

Modulation may be an increase or a decrease in protein activity, a change in binding characteristics, or any other change in the biological, functional or immunological properties of MAPKAP-2 kinase.

"Biologically effective" as used herein in reference to antisense nucleic acid molecules as well as dominant negative mutant nucleic acid coding regions and dominant negative mutant peptides refers to the ability of these molecules to modulate the biological activity and/or pharmacological activity of the novel signal transduction protein kinase of the present invention and/or transcription/translation of nucleic acid

WO 02/090524

PCT/US02/05670

coding regions of the novel signal transduction protein kinase of the present invention.

As used herein, a "functional derivative" of the novel nucleic acid molecule or polypeptide disclosed herein is an entity that possesses a functional biological activity and/or pharmacological activity as defined herein that is derived from SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, for example, truncated versions, versions having deletions, functional fragments, versions having substitutions, versions having insertions or extended ends, or biologically effective dominant negative mutants as well as biologically effective antisense molecules.

"Direct administration" as used herein refers to the direct administration of nucleic acid molecules, peptides, or compounds which comprise embodiments and/or functional derivatives (e.g., SEQ ID NO:1 or 2) of the present invention. Direct administration includes but is not limited to gene therapy.

"Antibodies" as used herein includes polyclonal and monoclonal antibodies, chimeric, single chain, and humanized antibodies, as well as Fab fragments, including the products of an Fab or other immunoglobulin expression library.

As used herein, the term "acceptable carrier" encompasses any of the standard pharmaceutical carriers, such as phosphate buffered saline solution, water and emulsions such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents.

Invention nucleic acids, oligonucleotides (including antisense), vectors containing same, transformed host cells, polypeptides and combinations thereof, as well as antibodies of the present invention, can be used to screen compounds *in vitro* to determine whether a compound functions as a potential agonist or antagonist to the MAPKAP-2 kinase of the invention.

Accordingly, methods for identifying compounds, which bind to the MAPKAP-2 kinase polypeptide(s), are also contemplated by the present invention. The kinase(s) of the invention may be employed in a competitive binding assay. Such an assay can accommodate the rapid screening of a large number of compounds to determine which compounds, if any, are capable of binding to the kinase(s) of the invention. Subsequently, more detailed assays can be carried out with those compounds found to bind, to further determine whether such compounds act as modulators, agonists or antagonists of kinase polypeptide(s) of the invention.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

As understood by those of skill in the art, assay methods for identifying compounds that modulate kinase activity of the MAPKAP_2 kinase of the invention generally require comparison to a control. One type of a "control" is a cell or culture that is treated substantially the same as the test cell or test culture exposed to the compound, with the distinction that the "control" cell or culture is not exposed to the compound. For example, in methods that use voltage clamp electrophysiological procedures, the same cell can be tested in the presence or absence of compound, by merely changing the external solution bathing the cell. Another type of "control" cell or culture may be a cell or culture that is identical to the transfected cells, with the exception that the "control" cell or culture do not express the invention polypeptide. Accordingly, the response of the transfected cell to compound is compared to the response (or lack thereof) of the "control" cell or culture to the same compound under the same reaction conditions.

In yet another embodiment of the present invention, the activation of MAPKAPS-2 kinase can be modulated by contacting the kinase with an effective amount of at least one compound (agonist or antagonist) identified by the above-described bioassays.

In accordance with another embodiment of the present invention, there are provided methods for diagnosing disease states characterized by abnormal signal transduction. For example, a sample can be obtained from a patient believed to be suffering from a pathological disorder characterized by dysfunctional signal transduction, and contacted with a nucleic acid probe having a sequence of nucleotides that are substantially homologous to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1. Binding of the probe to any complimentary mRNA present in the sample can be determined and is indicative of the regression, progression or onset of such a pathological disorder in the patient.

Alternatively, the patient sample can be contacted with a detectable probe that is specific for the gene product of the invention nucleic acid molecule, under conditions favoring the formation of a probe/gene product complex. The presence of the complex is indicative of the regression, progression or onset of the pathological disorder in the patient.

In accordance with another embodiment of the present invention, there are provided diagnostic systems, preferably in kit form, comprising at least one invention nucleic acid in a suitable packaging material. The diagnostic nucleic acids

WO 02/090524

PCT/US02/05670

are derived from the kinase-encoding nucleic acids described herein. In one embodiment, for example, the diagnostic nucleic acids are derived from SEQ ID No:1. Herein disclosed diagnostic systems are useful for assaying for the presence or absence of nucleic acid encoding a MAPKAP-2 kinase either genomic DNA or in transcribed nucleic acid (such as mRNA or cDNA).

A suitable diagnostic system includes at least one invention nucleic acid, preferably two or more invention nucleic acids, as a separately packaged chemical reagent(s) in an amount sufficient for at least one assay. Instructions for use of the packaged reagent are also typically included. Those of skill in the art can readily incorporate invention nucleic probes and/or primers into kit form in combination with appropriate buffers and solutions for the practice of the invention methods as described herein.

As used herein, the term "protein kinase" includes a protein or polypeptide, which is capable of modulating its own phosphorylation state or the phosphorylation state of another protein or polypeptide. Protein kinases can have a specificity for (i.e., a specificity to phosphorylate) serine/threonine residues, tyrosine residues, or both serine/threonine and tyrosine residues, e.g., the dual specificity kinases.

As used herein, the term "mitogen-activating protein kinase" or "MAPK" means a protein kinase which possesses the characteristic activity of phosphorylating and activating other proteins, including but not limited to MAPKAP-2. Examples of MAPK include p38 MAP Kinase, JNK and ERK. These are generally dual specificity kinases.

"Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in which the disorder is to be prevented.

By "screening" is meant investigating an organism for the presence or absence of a property. The process may include measuring or detecting various properties, including the level of signal transduction and the level of interaction between a MAPKAP-2 kinase, recombinant or naturally occurring and its natural binding partner (NBP) / substrate.

By "NBP" is meant a natural binding partner of a MAPKAP-2 kinase that naturally associates with the polypeptide. The structure (primary, secondary, or

WO 02/090524

PCT/US02/05670

tertiary) of the particular natural binding partner will influence the particular type of interaction between the MAPKAP-2 kinase and the natural binding partner. For example, if the natural binding partner comprises a sequence of amino acids complementary to the MAPKAP-2 kinase, covalent bonding may be a possible
 5 interaction. Similarly, other structural characteristics may allow for other corresponding interactions. The interaction is not limited to particular residues and specifically may involve phosphotyrosine, phosphoserine, or phosphothreonine residues. A broad range of sequences may be capable of interacting with MAPKAP-2 kinase. Using techniques well known in the art, one may identify several natural
 10 binding partners for MAPKAP-2 kinases. NBP also encompasses MAPKAP-2 substrates, natural and synthetic. Yet another aspect of the invention features a method for treatment of an organism having a disease or condition characterized by an abnormality in a signal transduction pathway.

In preferred embodiments the disease or condition which is diagnosed
 15 or treated are those described above, the agent is a dominant negative mutant protein provided by gene therapy or other equivalent methods as described below and the agents is therapeutically effective and has an EC.sub.50, or IC.sub.50 as described below.

An EC.sub.50, or IC.sub.50 of less than or equal to 100 .mu.M is
 20 preferable, and even more preferably less than or equal to 50 .mu.M, and most preferably less than or equal to 20 .mu.M. Such lower EC.sub.50 's or IC.sub.50 's are advantageous since they allow lower concentrations of molecules to be used in vivo or in vitro for therapy or diagnosis. The discovery of molecules with such low EC.sub.50 's and IC.sub.50 's enables the design and synthesis of additional molecules
 25 having similar potency and effectiveness. In addition, the molecule may have an EC.sub.50 or IC.sub.50 less than or equal to 100 .mu.M at a muscle cell.

By "therapeutically effective amount" is meant an amount of a pharmaceutical composition having a therapeutically relevant effect. A therapeutically relevant effect relieves to some extent one or more symptoms of the
 30 disease or condition in the patient; or returns to normal either partially or completely one or more physiological or biochemical parameters associated with or causative of the disease or condition. Generally, a therapeutically effective amount is between about 1 nmole and 1 .mu.mole of the molecule, depending on its EC.sub.50 or

WO 02/090524

PCT/US02/05670

IC.sub.50, and on the age and size of the patient, and the disease associated with the patient.

Also included in the present invention is a therapeutic compound capable of regulating the activity of a MAPK-dependent pathway in a cell identified by a process, comprising: (a) contacting a cell with a putative regulatory molecule; and (b) determining the ability of the putative regulatory compound to regulate the activity of an MAPK-dependent pathway in the cell by measuring the activation or phosphorylation of at least one substrate specific for at least one member of the MAPK-dependent pathway. The substrate is a human kinase polypeptide having an amino acid sequence substantially the same as that depicted in SEQ. ID. NO: 2. The member is ERK or p38, both of which are members of the MAPK pathway and known to phosphorylate MAPKAP-2.

An alternative embodiment of the invention provides a method for treatment of a disease manifested by a dysfunctional MAPKAP-2 mediated signal transduction pathway which comprises administering to a patient an effective amount of a therapeutic compound comprising at least one regulatory molecule including a molecule capable of decreasing the activity of a MAPK-dependent pathway, a molecule capable of decreasing activity of a polypeptide that is phosphorylated by an activated extracellular signal-regulated kinase, and combinations thereof, in which the effective amount comprises an amount which results in the depletion of harmful cells involved in the disease.

In yet another aspect, the screening assays provided by the invention relate to transgenic mammals whose germ cells and somatic cells contain a nucleotide sequence encoding the MAPKAP-2 kinase disclosed herein or a selected portion of the protein sufficient to activate its native substrate. There are several means by which a sequence encoding, for example, the MAPKAP-2 kinase of the invention may be introduced into a non-human mammalian embryo, some of which are described in, e.g., U.S. Pat. No. 4,736,866, Jaenisch, Science 240-1468-1474 (1988) and Westphal et al., Annu. Rev. Cell Biol. 5:181-196 (1989), which are incorporated herein by reference. The animal's cells then express the receptor and thus may be used as a convenient model for testing or screening selected agonists or antagonists.

I. DNA Constructs Comprising the Polynucleotides Encoding MAPKAP-2; Vectors, Host Cells Containing the DNA constructs, Expression etc.

Provided herein are isolated nucleic acid molecules comprising a sequence of nucleotides that encode a novel human signal transducing kinase – MAPKAP-2 polypeptide. Specifically, isolated cDNA encoding MAPKAP-2 are described as are recombinant messenger RNA (mRNA). Splice variants of the isolated nucleic acid molecules are also described. Typically, unless the MAPKAP-2 of the invention arises as a splice variant, MAPKAP-2-encoding polynucleotides will share substantial sequence homology (i.e., greater than about 90%), with the MAPKAP-2 encoding DNA described herein. DNA or RNA encoding a splice variant may share less than 90% overall sequence homology with the DNA or RNA provided herein, but such a splice variant would include regions of nearly 100% homology to the disclosed DNAs.

The term "nucleic acid" or "nucleic acid molecule" is intended for polynucleotides or oligonucleotides such as deoxyribonucleic acid (DNA), and, where appropriate, ribonucleic acid (RNA). The term should also be understood to include, as equivalents, analogs of either RNA or DNA made from nucleotide analogs and as applicable to the embodiment being described, single (sense or antisense) and double-stranded polynucleotides. DNA can be either complementary DNA (cDNA) or genomic DNA, e.g. a gene encoding the novel kinase disclosed herein.

Unless otherwise indicated, a "nucleotide" defines a monomeric unit of DNA or RNA consisting of a sugar moiety (pentose), a phosphate group, and a nitrogenous heterocyclic base. The base is linked to the sugar moiety via the glycosidic carbon (1' carbon of the pentose) and that combination of base and sugar is a nucleoside. When the nucleoside contains a phosphate group bonded to the 3' or 5' position of the pentose, it is referred to as a nucleotide. A sequence of operatively linked nucleotides is typically referred to herein as a "base sequence" or "nucleotide sequence", and their grammatical equivalents, and is represented herein by a formula whose left to right orientation is in the conventional direction of 5'-terminus to 3'-terminus.

Each "nucleotide sequence" set forth herein is presented as a sequence of deoxyribonucleotides (abbreviated A, G, C and T). However, by "nucleotide sequence" of a nucleic acid molecule is intended, for a DNA molecule or polynucleotide, a sequence of deoxyribonucleotides, and for an RNA molecule or polynucleotide, the corresponding sequence of ribonucleotides (A, G, C and U),

WO 02/090524

PCT/US02/05670

where each thymidine deoxyribonucleotide (T) in the specified deoxyribonucleotide sequence is replaced by the ribonucleotide uridine (U). For instance, reference to an RNA molecule having the sequence of SEQ ID NO: 1 set forth using deoxyribonucleotide abbreviations is intended to indicate an RNA molecule having a sequence in which each deoxyribonucleotide A, G or C of SEQ ID NO: 1 has been replaced by the corresponding ribonucleotide A, G or C, and each deoxyribonucleotide T has been replaced by a ribonucleotide U.

"Invention polynucleotides" or "nucleic acids" refers to (DNA or RNA) containing a nucleotide sequence which encodes the MAPKAP-2 kinase or fragment thereof, or a sequence of nucleotides that hybridize under high stringency conditions to the nucleotide sequences disclosed herein.

As used herein, a "splice variant" refers to variant MAPKAP-2 kinase-encoding nucleic acid(s) produced by differential processing of primary transcript(s) of genomic DNA, resulting in the production of more than one type of mRNA.

cDNA derived from differentially processed primary transcript will encode a MAPKAP-2 kinase that has regions of complete amino acid identity and regions having different amino acid sequences. Thus, the same genomic sequence can lead to the production of multiple, related mRNAs and proteins. Both the resulting mRNAs and proteins are referred to herein as "splice variants".

An "allele" or "allelic sequence", or "allelic form" as used herein denotes an alternative version of a gene encoding the same functional protein but containing differences in its nucleotide sequence relative to another version of the same gene.

Alleles may result from at least one mutation in the nucleic acid sequence and may result in altered mRNAs or polypeptides whose structure or function may or may not be altered. Any given natural or recombinant gene may have none, one, or many allelic forms. Common mutational changes which give rise to alleles are generally ascribed to natural deletions, additions, or substitutions of nucleotides. Each of these types of changes may occur alone, or in combination with the others, one or more times in a given sequence.

"Allelic polymorphism" or "allelic variant" as used herein denotes a variation in the nucleotide sequence within a gene, wherein different individuals in the general population may express different variants of the gene.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

“Consisting essentially of” herein is meant to encompass the disclosed sequence and includes allelic variations of the disclosed nucleotide sequence(s), either naturally occurring or product of *in vitro* chemical or genetic modification. Each such variant will be understood to have essentially the same nucleotide sequence as the

5 nucleotide sequence of the corresponding MAPKAP-2 disclosed herein.

A “fragment” of a nucleic acid molecule or nucleotide sequence is a portion of the nucleic acid that is less than full-length and comprises at least a minimum length capable of hybridizing specifically with the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 under stringent hybridization conditions. The length of such a

10 fragment is preferably 15-17 nucleotides or more.

A “variant” nucleic acid molecule refers to polynucleotide molecules containing minor changes in the native nucleotide sequence encoding a MAPKAP-2 kinase i.e., changes in which one or more nucleotides of a native sequence is deleted, added, and/or substituted, preferably while substantially maintaining the biological

15 activity of the native nucleic acid molecule. Variant nucleic acid molecules can be produced, for example, by standard DNA mutagenesis techniques or by chemically synthesizing the variant DNA molecule or a portion thereof. Generally, differences are limited so that the nucleotide sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical.

Changes in the nucleotide sequence of a variant polynucleotide may be silent. That is, they may not alter the amino acids encoded by the polynucleotide. Where alterations are limited to silent changes of this type, a variant will encode a polypeptide with the same amino acid sequence as the reference.

20

Alternatively, the changes may be “conservative.” Conservative

25 variants are changes in the nucleotide sequence that may alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Such nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence. Thus, conservative variants are those changes in the protein-coding region of the gene that result in

30 conservative change in one or more amino acid residues of the polypeptide encoded by the nucleic acid sequence, i.e. amino acid substitution.

Preferably, a variant form of the preferred nucleic acid molecule has at least 70%, more preferably at least 80%, and most preferably at least 90% nucleotide

WO 02/090524

PCT/US02/05670

sequence similarity with the native gene encoding the MAPKAP-2 kinase of the invention.

"Primer" or "nucleic acid polymerize primer(s)" refers to an oligonucleotide, whether natural or synthetic, capable of acting as a point of initiation of DNA synthesis under conditions in which synthesis of a primer extension product complementary to a nucleic acid strand is initiated, i.e., in the presence of four different nucleotide triphosphates and an agent for polymerization (i.e., DNA polymerase or reverse transcriptase) in an appropriate buffer and at a suitable temperature. The exact length of a primer will depend on many factors, but typically ranges from 15 to 25 nucleotides. Short primer molecules generally require cooler temperatures to form sufficiently stable hybrid complexes with the template. A primer need not reflect the exact sequence of the template, but must be sufficiently complementary to hybridize with a template. A primer can be labeled, if desired.

Nucleic acid amplification techniques, which are well known in the art, can be used to locate splice variants of the herein-disclosed MAPKAP-2 kinase. This is accomplished by employing oligonucleotides based on DNA sequences surrounding divergent sequence(s) as primers for amplifying human RNA or genomic DNA. Size and sequence determinations of the amplification products can reveal the existence of splice variants. Furthermore, isolation of human genomic DNA sequences by hybridization can yield DNA containing multiple exons, separated by introns that correspond to different splice variants of transcripts encoding the herein disclosed MAPKAP-2 kinase. Techniques for nucleic-acid manipulation are described generally in, for example, Sambrook et al. (1989) and Ausubel et al. (1987, with periodic updates). Methods for chemical synthesis of nucleic acids are discussed, for example, in Beaucage and Carruthers, Tetra. Letts. 22:1859-1862, 1981, and Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981. Chemical synthesis of nucleic acids can be performed, for example, on commercial automated oligonucleotide synthesizers.

As used herein, a nucleic acid "probe" is single-stranded DNA or RNA, or analog thereof, that has a sequence of nucleotides that includes at least 14, preferably at least 20, more preferably at least 50, contiguous bases that are the same as or the complement of any 14 or more contiguous bases set forth in SEQ ID NO:1. In addition, the entire cDNA-encoding region of the entire sequence corresponding to SEQ ID NO:1 may be used as a probe.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Presently preferred probe-based screening conditions comprise a temperature of about 37°C, a formamide concentration of about 20%, and a salt concentration of about 5X standard saline citrate (SSC; 20X SSC contains 3M sodium chloride, 0.3M sodium citrate, pH 7.0). Such conditions will allow the identification of sequences which have a substantial degree of similarity with the probe sequence, without requiring perfect homology.

"Hybridization" refers to the binding of complementary strands of nucleic acid (i.e., sense:antisense strands or probe:target-DNA) to each other through hydrogen bonds, similar to the bonds that naturally occur in chromosomal DNA. Stringency levels used to hybridize a given probe with target-DNA can be readily varied by those of skill in the art.

The phrase "stringent hybridization conditioned" is used herein to refer to conditions under which polynucleic acid hybrids are stable. As known to those of skill in the art, the stability of hybrids is reflected in the melting temperature (T_m) of the hybrids. T_m can be approximated by the formula:

$$81.5^{\circ}\text{C} - 16.6(\log_{10} [\text{Na}^{+}]) + 0.41(\%G+C) - 600/L,$$

where L is the length of the hybrids in nucleotides. T_m decreases approximately 1°-1.5° C with every 1% decrease in sequence homology. In general, the stability of a hybrid is a function of sodium ion concentration and temperature. Typically, the hybridization reaction is performed under conditions of lower stringency, followed by washes of varying, but higher, stringency. Reference to hybridization stringency relates to such washing conditions.

As used herein, the phrase "moderately stringent hybridization" refers to conditions that permit target-DNA to bind a complementary nucleic acid that has about 60% identity, preferably about 75% identity, more preferably about 85% identity to the target DNA; with greater than about 90% identity to target-DNA being especially preferred. Preferably, moderately stringent conditions are conditions equivalent to hybridization in 50% formamide, 5X Denhart's solution, 5X SSPE, 0.2% SDS at 42°C, followed by washing in 0.2X SSPE, 0.2% SDS, at 65°C.

The phrase "high stringency hybridization" refers to conditions that permit hybridization of only those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 0.018M NaCl at 65°C (i.e., if a hybrid is not stable in 0.018M NaCl at 65°C, it will

WO 02/090524

PCT/US02/05670

not be stable under high stringency conditions, as contemplated herein). High stringency conditions can be provided, for example, by hybridization in 50% formamide, 5X Denhart's solution, 5X SSPE, 0.2% SDS at 42°C., followed by washing in 0.1X SSPE, and 0.1% SDS at 65°C.

- 5 The phrase "low stringency hybridization" refers to conditions equivalent to hybridization in 10% formamide, 5X Denhart's solution, 6X SSPE, 0.2% SDS at 42°C., followed by washing in 1X SSPE, 0.2% SDS, at 50°C.

- 10 Denhardt's solution and SSPE (see, e.g., Sambrook, Fritsch, and Maniatis, in: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) are well known to those of skill in the art as are other suitable hybridization buffers. For example, SSPE is pH 7.4 phosphate-buffered 0.18M NaCl. SSPE can be prepared, for example, as a 20X stock solution by dissolving 175.3 g of NaCl, 27.6 g of NaH₂PO₄ and 7.4 g EDTA in 800 ml of water, adjusting the pH to 7.4, and then adding water to 1 liter. Denhardt's solution (see, Denhardt (1966)
- 15 Biochem. Biophys. Res. Commun. 23:641) can be prepared, for example, as a 50X stock solution by mixing 5 g Ficoll (Type 400, Pharmacia LKB Biotechnology, INC., Piscataway N.J.), 5 g of polyvinylpyrrolidone, and 5 g bovine serum albumin (Fraction V; Sigma, St. Louis Mo.), and then adding water to 500 ml and filtering to remove particulate matter.

- 20 Preferred nucleic acids encoding the herein disclosed novel human MAPKAP-2 kinase hybridize under moderately stringent, preferably high stringency, conditions to substantially the entire sequence, or substantial portions (i.e., typically at least 15-30 nucleotides) of the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:1.

- 25 Preferably, hybridization conditions will be selected which allow the identification of sequences having at least 70% homology with the probe, while discriminating against sequences which have a lower degree of homology with the probe. As a result, nucleic acids having substantially the same nucleotide sequence as the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO:1 are obtained.

- 30 Thus, the nucleic acid probes are useful for various applications. On the one hand, they may be used as PCR primers for amplification of nucleic acid molecules according to the invention. On the other hand, they can be useful tools for the detection of the expression of molecules according to the invention in target tissues, for example, by in-situ hybridization or Northern-Blot hybridization.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

The invention probes may be labeled by methods well known in the art, as described hereinafter, and used in various diagnostic kits.

A "label" refers to a compound or composition that facilitates detection of a compound or composition with which it is specifically associated, which can include conferring a property that makes the labeled compound or composition able to bind specifically to another molecule. "Labeled" refers to a compound or composition that is specifically associated, typically by covalent bonding but non-covalent interactions can also be employed to label a compound or composition, with a label. Thus, a label may be detectable directly, i.e., the label can be a radioisotope (e.g., ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I) or a fluorescent or phosphorescent molecule (e.g., FITC, rhodamine, lanthanide phosphors), or indirectly, i.e., by enzymatic activity (e.g., horseradish peroxidase, beta-galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase) or by its ability to bind to another molecule (e.g., streptavidin, biotin, an antigen, epitope, or antibody). Incorporation of a label can be achieved by a variety of means, i.e., by use of radiolabeled or biotinylated nucleotides in polymerase-mediated primer extension reactions, epitope-tagging via recombinant expression or synthetic means, or binding to an antibody.

Labels can be attached directly or via spacer arms of various lengths, i.e., to reduce steric hindrance. Any of a wide variety of labeled reagents can be used for purposes of the present invention. For instance, one can use one or more labeled nucleoside triphosphates, primers, linkers, or probes. A description of immunofluorescent analytic techniques is found in DeLuca, "Immunofluorescence Analysis", in *Antibody As a Tool*, Marchalonis et al., eds., John Wiley & Sons, Ltd., pp. 189-231 (1982), which is incorporated herein by reference.

The term label can also refer to a "tag", which can bind specifically to a labeled molecule. For instance, one can use biotin as a tag and then use avidinylated or streptavidinylated horseradish peroxidase (HRP) to bind to the tag, and then use a chromogenic substrate (e.g., tetramethylbenzamine) to detect the presence of HRP. In a similar fashion, the tag can be an epitope or antigen (e.g., digoxigenin), and an enzymatically, fluorescently, or radioactively labeled antibody can be used to bind to the tag.

In defining nucleic acid sequences, all subject nucleic acid sequences capable of encoding substantially similar amino acid sequences are considered substantially similar or are considered as comprising substantially identical sequences

WO 02/090524

PCT/US02/05670

of nucleotides to the reference nucleic acid sequence, i.e., MAPKAP-2 kinase encoding sequence disclosed herein (SEQ ID NO:1).

In practice, the term "substantially the same sequence" means that DNA or RNA encoding two proteins hybridize under moderately stringent conditions and encode proteins that have the same sequence of amino acids or have changes in sequence that do not alter their structure or function.

Nucleotide sequence "similarity" is a measure of the degree to which two polynucleotide sequences have identical nucleotide bases at corresponding positions in their sequence when optimally aligned (with appropriate nucleotide insertions or deletions). Sequence similarity or percent similarity can be determined, for example, by comparing sequence information using sequence analysis software such as the GAP computer program, version 6.0, available from the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). The GAP program utilizes the alignment method of Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), as revised by Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1981).

As used herein, "substantially identical sequences of nucleotides" share at least about 90% identity, and substantially identical amino acid sequences share more than 95% amino acid identity. It is recognized, however, that proteins (and DNA or mRNA encoding such proteins) containing less than the above-described level of homology arising as splice variants or that are modified by conservative amino acid substitutions (or substitution of degenerate codons) are contemplated to be within the scope of the present invention.

"Substantially as depicted" or "set forth" as used herein may also refer to functional derivative proteins, and functional derivative nucleic acid sequences as defined herein that may have changes but perform substantially the same biochemical or pharmacological function in substantially the same way; however, "substantially as depicted" as used herein also refers to biologically effective dominant negative mutants and is intended to encompass biologically effective antisense molecules as defined herein.

The present invention also encompasses nucleic acids which differ from the nucleic acid shown in SEQ ID NO:1, but which have the same phenotype. Phenotypically similar nucleic acids are also referred to as "functionally equivalent nucleic acids".

WO 02/090524

PCT/US02/05670

As used herein, the phrase "functionally equivalent nucleic acids" or "functional derivative" encompasses nucleic acids characterized by slight and non-consequential sequence variations that will function in substantially the same manner to produce the same protein product(s) as the nucleic acids disclosed herein.

5 Functionally equivalent sequences will function in substantially the same manner to produce substantially the same compositions as the nucleic acid and amino acid compositions disclosed and claimed herein.

In particular, functionally equivalent DNAs encode proteins that are the same as those disclosed herein (SEQ ID NO:2) or that have conservative amino acid variations, such as substitution of a non-polar residue for another non-polar residue or a charged residue for a similarly charged residue. These changes include those recognized by those of skill in the art as those that do not substantially alter the tertiary structure of the protein.

10 In particular, functionally equivalent nucleic acids encode polypeptides that are the same as those disclosed herein or that have conservative amino acid variations, or that are substantially similar to one having the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2.

In one embodiment of the present invention, cDNAs encoding the MAPKAP-2 kinase disclosed herein include substantially the same nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1. Preferred cDNA molecules encoding the invention proteins include the same nucleotide sequence as that set forth in SEQ ID NO: 1.

20 Another embodiment of the invention contemplates nucleic acid(s) having substantially the same nucleotide sequence as the reference nucleotide sequence that encodes substantially the same amino acid sequence as that set forth in SEQ ID NO:2.

Further provided are nucleic acids encoding the MAPKAP-2 kinase of the invention those, by virtue of the degeneracy of the genetic code, do not necessarily hybridize to the invention nucleic acids under specified hybridization conditions.

30 Preferred nucleic acids encoding the MAPKAP-2 kinase of the invention are comprised of nucleotides that encode substantially the same amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2.

As used herein, the term "degenerate" refers to codons that differ in at least one nucleotide from SEQ ID NO:1, but encode the same amino acids as that set

WO 02/090524

PCT/US02/05670

forth in SEQ ID NO: 2. For example, codons specified by the triplets "UCU", "UCC", "UCA", and "UCG" are degenerate with respect to each other since all four of these codons encode the amino acid serine.

As used herein, "expression" refers to the process by which
 5 polynucleic acids are transcribed into mRNA and translated into peptides, polypeptides, or proteins. If the polynucleic acid is derived from genomic DNA, expression may, if an appropriate eukaryotic host cell or organism is selected, include splicing of the mRNA.

"Expression vector" as used herein refers to nucleic acid vector
 10 constructions to direct the transcription of nucleic acid regions in host cells. Expression vectors include but are not limited to plasmids, retroviral vectors, viral and synthetic vectors.

"Transformed host cells" as used herein refer to cells which harbor nucleic acids or functional derivatives of the present invention.

15 The invention nucleic acids can be produced by a variety of methods well-known in the art, e.g., the methods described herein, employing PCR amplification using oligonucleotide primers from various regions of SEQ ID NO:1 and the like.

Polynucleotides which are identical or sufficiently identical to a
 20 nucleotide sequence contained in SEQ ID NO:1, may be used as hybridization probes for cDNA and genomic DNA or as primers for a nucleic acid amplification (PCR) reaction, to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding polypeptides of the present invention and to isolate cDNA and genomic clones of other genes (including genes encoding homologs and orthologs from species other than human)
 25 that have a high sequence similarity to SEQ ID NO:1. Typically these nucleotide sequences are 70% identical, preferably 80% identical, more preferably 90% identical, most preferably 95% identical to that of the referent. The probes or primers will generally comprise at least 15 nucleotides, preferably, at least 30 nucleotides and may have at least 50 nucleotides. Particularly preferred probes will have between 30
 30 and 50 nucleotides.

Nucleic acid probes derived from the invention polynucleotide sequences are particularly useful for this purpose. Examples of nucleic acids are RNA, cDNA, or isolated genomic DNA encoding the MAPKAP-2 kinase. Such nucleic acids may include, but are not limited to, nucleic acids having substantially

WO 02/090524

PCT/US02/05670

the same nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or one encoding the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2. The probes generally will comprise at least 15 nucleotides. Preferably, such probes will have at least 30 nucleotides and may have at least 50 nucleotides. Particularly preferred probes will range between 30 and 50 nucleotides. The probe may be used to isolate splice variants of the polynucleotides disclosed herein.

Thus, one means of isolating a nucleic acid encoding the polypeptide is to probe various sources of human tissue and cDNA such as kidney, liver, skeletal muscle, leukocytes, leukemia MOLT4, and lymphocytes DNA with invention sequences, and then select those sequences having a significant level of sequence homology with the probe employed. Generally, after screening the mammalian library, positive clones are identified by detecting a hybridization signal; the identified clones are characterized by restriction enzyme mapping and/or DNA sequence analysis, and then examined, by comparison with the sequences set forth herein, to ascertain whether they include DNA encoding the entire MAPKAP-2 kinase. If the selected clones are incomplete, they may be used to rescreen the same or a different library to obtain overlapping clones. If desired, the library can be rescreened with positive clones until overlapping clones that encode an entire MAPKAP-2 kinase are obtained. If the library is a cDNA library, then the overlapping clones will include an open reading frame. If the library is genomic, then the overlapping clones may include exons and introns. In both instances, complete clones may be identified by comparison with the DNA and encoded proteins provided herein.

Preferred stringent hybridization conditions include overnight incubation at 42°C. in a solution comprising: 50% formamide, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH7.6), 5x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 microgram/ml denatured, sheared salmon sperm DNA; followed by washing the filters in 0.1x SSC at about 65°C. Thus the present invention also includes polynucleotides obtainable by screening an appropriate library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO:1 or a fragment thereof.

The skilled artisan will appreciate that, in many cases, an isolated cDNA sequence will be incomplete, in that the region coding for the human polypeptide of the invention is cut short at the 5' end of the cDNA. This is a consequence of reverse transcriptase, an enzyme with inherently low 'processivity' (a

WO 02/090524

PCT/US02/05670

measure of the ability of the enzyme to remain attached to the template during the polymerization reaction), failing to complete a DNA copy of the mRNA template during 1st strand cDNA synthesis.

- There are several methods available and well known to those skilled in the art to obtain full-length cDNAs, or extend short cDNAs, for example those based on the method of Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) (see, for example, Frohman et al., PNAS USA 85, 8998-9002, 1988). Recent modifications of the technique, exemplified by the Marathon.TM. technology (Clontech Laboratories Inc.) for example, have significantly simplified the search for longer cDNAs. In the Marathon.TM. technology, cDNAs have been prepared from mRNA extracted from a chosen tissue and an 'adaptor' sequence ligated onto each end. Nucleic acid amplification (PCR) is then carried out to amplify the 'missing' 5' end of the cDNA using a combination of gene specific and adaptor specific oligonucleotide primers. The PCR reaction is then repeated using 'nested' primers, that is, primers designed to anneal within the amplified product (typically an adaptor specific primer that anneals further 3' in the adaptor sequence and a gene specific primer that anneals further 5' in the known gene sequence). The products of this reaction can then be analyzed by DNA sequencing and a full-length cDNA constructed either by joining the product directly to the existing cDNA to give a complete sequence, or carrying out a separate full-length PCR using the new sequence information for the design of the 5' primer.

- Invention DNA sequences or cDNA sequences thus identified can be used for producing MAPKAP-2 kinases, when such nucleic acids are incorporated into a variety of protein expression systems known to those of skill in the art. In addition, such nucleic acid molecules or fragments thereof can be labeled with a readily detectable substituent and used as hybridization probes for assaying for the presence and/or amount of a Invention encoding gene or mRNA transcript in a given sample. The nucleic acid molecules described herein, and fragments thereof, are also useful as primers and/or templates in a PCR reaction for amplifying genes encoding the invention protein described herein.

- A polynucleotide encoding the MAPKAP-2 kinase of the present invention, including homologs and orthologs from species other than human, may be obtained by a process which comprises the steps of screening an appropriate library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO:1 or a fragment thereof; and isolating full-length cDNA and genomic

WO 02/090524

PCT/US02/05670

clones containing the polynucleotide sequence. Such hybridization techniques are well known to the skilled artisan.

- "Identity" can be readily calculated by known methods, including but not limited to those described in (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48: 1073 (1988). Methods to determine identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Moreover, methods to determine identity are codified in publicly available computer programs. Computer program methods to determine identity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990). The BLAST X program is publicly available from NCBI and other sources (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Parameters for polynucleotide comparison include the following:

- 1) Algorithm: Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)
Comparison matrix: matches=+10, mismatch=0
Gap Penalty: 50
Gap Length Penalty: 3

Available as: The "gap" program from Genetics Computer Group, Madison Wis. These are the default parameters for nucleic acid comparisons.

- A preferred meaning for "identity" for polynucleotides and polypeptides, as the case may be, are provided in (1) and (2) below.

(1) Polynucleotide embodiments further include an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least a 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 or 100% identity to the reference sequence of SEQ ID NO: 1, wherein

WO 02/090524

PCT/US02/05670

- the polynucleotide sequence may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO: 1 or may include up to a certain integer number of nucleotide alterations as compared to the reference sequence, wherein the alterations are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion, and wherein the alterations may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence, and wherein the number of nucleotide alterations is determined by multiplying the total number of nucleotides in SEQ ID NO: 1 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from the total number of nucleotides in SEQ ID NO: 1, or:
- $$N_n X_n - (X_n Y),$$
- wherein N_n is the number of nucleotide alterations, X_n is the total number of nucleotides in SEQ ID NO: 1, Y is 0.50 for 50%, 0.60 for 60%, 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85%, 0.90 for 90%, 0.95 for 95%, 0.97 for 97% or 1.00 for 100%, and is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of X_n and Y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from X_n . Alterations of a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 may create nonsense, missense or frameshift mutations in this coding sequence and thereby alter the polypeptide encoded by the polynucleotide following such alterations.

Complementary DNA clones encoding the MAPKAP-2 kinase of the invention may be prepared from the DNA provided. As well, the polynucleotides of the invention can be obtained from natural sources such as genomic DNA libraries or can be synthesized using well-known and commercially available techniques.

Indeed, the invention polynucleotide may be obtained using standard cloning and screening, from a cDNA library derived from mRNA in cells expressing or suspected of expressing native MAPKAP-2 or its native binding partners using the expressed sequence tag (EST) analysis (Adams, M. D., et al. Science (1991) 252:1651-1656; Adams, M. D. et al., Nature, (1992) 355:632-634; Adams, M. D., et al., Nature (1995) 377 Supp:3-174).

The nucleotide sequence encoding the MAPKAP-2 of the invention may be identical over its entire length to the coding sequence set forth in SEQ ID

WO 02/090524

PCT/US02/05670

NO:1, or it may be a degenerate form of this nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2, or may be highly identical to a nucleotide sequence that encodes the polypeptide of SEQ ID NO:2.

An exemplary nucleic acid molecule encoding the novel human

5 MAPKAP-2 kinase of the invention can be characterized in a number of ways, for example

- (i) a nucleic acid molecule may encode the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2, or
- 10 (ii) a nucleic acid molecule that hybridizes to the DNA of (i) under moderately stringent conditions; or
- (iii) a DNA degenerate with respect to either (a) or (b) above, wherein the DNA encodes biologically active MAPKAP-2 kinase; or
- 15 (iv) a nucleotide sequence which has at least 75.9% identity to the nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2; or
- (v) the corresponding fragment thereof, or
- (vi) a nucleotide sequence which has sufficient identity to the nucleotide sequence contained in SEQ ID NO:1 or allelic variants thereof, splice variants thereof and/or their complements.
- 20

Preferably, the nucleic acid molecule(s) of the invention, i.e., SEQ ID NO: 1 contains a nucleotide sequence that is highly identical, at least 80% identical, 25 with a nucleotide sequence encoding a human MAPKAP-2 kinase, or at least 85% identical with the encoding nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1, or at least 90% identical to a nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2.

Among particularly preferred embodiments of the invention are polynucleotides encoding the MAPKAP-2 kinase of the invention having the amino 30 acid sequence of as substantially set forth in SEQ ID NO:2 and variants thereof.

Further preferred embodiments are polynucleotides encoding MAPKAP-2 polypeptide variants that have the amino acid sequence of the MAPKAP-2 of SEQ ID NO:2 in which several, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 or 1 amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 80% identical over their entire length to a polynucleotide encoding the MAPKAP-2 kinase having the amino acid sequence set out in SEQ ID NO:2, and polynucleotides which are complementary to such polynucleotides. In this regard, 5 polynucleotides at least 80% identical over their entire length to the same are particularly preferred, and those with at least 90% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred and those with at least 98-99% are most highly preferred, with at least 99% being the most preferred.

10 The present invention further relates to polynucleotides that hybridize to the herein above-described sequences. In this regard, the present invention especially relates to polynucleotides which hybridize under stringent conditions to the herein above-described polynucleotides. As herein used, the term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there are at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences.

15 In another embodiment, the present invention relates to a recombinant DNA molecule comprising, 5' to 3', a promoter effective to initiate transcription in a host cell and the above-described invention nucleic acid molecule(s).

The present invention also relates to vectors which comprise a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, and host cells which are 20 genetically engineered with vectors of the invention and to the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques.

Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

25 Incorporation of cloned DNA into a suitable expression vector, transfection of eukaryotic cells with a plasmid vector or a combination of plasmid vectors, each encoding one or more distinct genes or with linear DNA, and selection of transfected cells are well known in the art (see, e.g., Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Suitable means for introducing (transducing) expression vectors 30 containing invention nucleic acid constructs into host cells to produce transduced recombinant cells (i.e., cells containing recombinant heterologous nucleic acid) are well-known in the art (see, for review, Friedmann, 1989, *Science*, 244:1275-1281; Mulligan, 1993, *Science*, 260:926-932, each of which are incorporated herein by reference in their entirety).

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Exemplary methods of transduction include, e.g., infection employing viral vectors (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,405,712 and 4,650,764), calcium phosphate transfection (U.S. Pat. Nos. 4,399,216 and 4,634,665), dextran sulfate transfection, electroporation, lipofection (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,394,448 and 4,619,794),
5 cytofection, particle bead bombardment, and the like. The heterologous nucleic acid can optionally include sequences which allow for its extrachromosomal (i.e., episomal) maintenance, or the heterologous nucleic acid can be donor nucleic acid that integrates into the genome of the host. Recombinant cells can then be cultured under conditions whereby the MAPKAP-2 kinase encoded by the DNA is (are)
10 expressed. Preferred cells include mammalian cells (e.g., HEK 293, CHO and Ltk-cells), yeast cells (e.g., methylotrophic yeast cells, such as *Pichia pastoris*), bacterial cells (e.g., *Escherichia coli*), and the like.

Expression vectors for use in carrying out the present invention will comprise a promoter capable of directing the transcription of a cloned DNA and a
15 transcriptional terminator.

Also contained in the expression vectors is a polyadenylation signal located downstream of the coding sequence of interest. Polyadenylation signals include the early or late polyadenylation signals from SV40 (Kaufman and Sharp, *ibid.*), the polyadenylation signal from the Adenovirus 5 E1B region and the human
20 growth hormone gene terminator (DeNoto et al., *Nuc. Acid Res.* 9: 3719-3730, 1981). The expression vectors may include a noncoding viral leader sequence, such as the Adenovirus 2 tripartite leader, located between the promoter and the RNA splice sites. Preferred vectors may also include enhancer sequences, such as the SV40 enhancer and the mouse .mu. enhancer (Gillies, *Cell* 33: 717-728, 1983). Expression vectors
25 may also include sequences encoding the adenovirus VA RNAs.

Suitable expression vectors are well-known in the art, and include vectors capable of expressing DNA operatively linked to a regulatory sequence, such as a promoter region that is capable of regulating expression of such DNA. Thus, an expression vector refers to a recombinant DNA or RNA construct, such as a plasmid,
30 a phage, recombinant virus or other vector that, upon introduction into an appropriate host cell, results in expression of the inserted DNA. Appropriate expression vectors are well known to those of skill in the art and include those that are replicable in eukaryotic cells and/or prokaryotic cells and those that remain episomal or those which integrate into the host cell genome.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Exemplary expression vectors for transformation of *E. coli* prokaryotic cells include the pET expression vectors (Novagen, Madison, Wis., see U.S. Pat. No. 4,952,496), e.g., pET11a, which contains the T7 promoter, T7 terminator, the inducible *E. coli* lac operator, and the lac repressor gene; and pET 12a-c, which contains the T7 promoter, T7 terminator, and the *E. coli* ompT secretion signal. Another such vector is the pIN-IIIompA2 (see Duffaud et al., Meth. in Enzymology, 153:492-507, 1987), which contains the lpp promoter, the lacUV5 promoter operator, the ompA secretion signal, and the lac repressor gene.

Exemplary eukaryotic expression vectors include eukaryotic cassettes, such as the pSV-2 gpt system (Mulligan et al., 1979, Nature, 277:108-114); the Okayama-Berg system (Mol. Cell Biol., 2:161-170), and the expression cloning vector described by Genetics Institute (1985, Science, 228:810-815). Each of these plasmid vectors is capable of promoting expression of the invention chimeric protein of interest.

Also provided are nucleic acid molecule(s) comprising a transcriptional region functional in a cell, a sequence complementary to an RNA sequence encoding an amino acid sequence corresponding to the herein-disclosed MAPKAP-2 kinase, and a transcriptional termination region functional in a suitable host cell.

A wide variety of transcriptional and translational regulatory sequences may be employed, depending upon the nature of the host. The transcriptional and translational regulatory signals may be derived from viral sources, such as adenovirus, bovine papilloma virus, cytomegalovirus, simian virus, or the like, where the regulatory signals are associated with a particular gene sequence which has a high level of expression. Alternatively, promoters from mammalian expression products, such as actin, collagen, myosin, and the like, may be employed. Transcriptional initiation regulatory signals may be selected which allow for repression or activation, so that expression of the gene sequences can be modulated. Of interest are regulatory signals which are temperature-sensitive so that by varying the temperature, expression can be repressed or initiated, or are subject to chemical (such as metabolite) regulation.

Thus, an embodiment provides are transformed host cells that recombinantly express the herein disclosed MAPKAP-2 kinase of the invention.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

As used herein, a cell is said to be "altered to express a desired peptide" when the cell, through genetic manipulation, is made to produce a protein which it normally does not produce or which the cell normally produces at lower levels. One skilled in the art can readily adapt procedures for introducing and
5 expressing either genomic, cDNA, or synthetic sequences into either eukaryotic or prokaryotic cells.

A nucleic acid molecule, such as DNA, is said to be "capable of expressing" a polypeptide if it contains nucleotide sequences which contain transcriptional and translational regulatory information and such sequences are
10 "operably linked" to nucleotide sequences which encode the polypeptide. An operable linkage is a linkage in which the regulatory DNA sequences and the DNA sequence sought to be expressed are connected in such a way as to permit gene sequence expression. The precise nature of the regulatory regions needed for gene sequence expression may vary from organism to organism, but shall in general
15 include a promoter region which, in prokaryotes, contains both the promoter (which directs the initiation of RNA transcription) as well as the DNA sequences which, when transcribed into RNA, will signal synthesis initiation. Such regions will normally include those 5'-non-coding sequences involved with initiation of transcription and translation, such as the TATA box, capping sequence, CAAT
20 sequence, and the like.

If desired, the non-coding region 3' to the sequence encoding an MAPKAP-2 gene may be obtained by the above-described methods. This region may be retained for its transcriptional termination regulatory sequences, such as termination and polyadenylation. Thus, by retaining the 3'-region naturally
25 contiguous to the DNA sequence encoding a MAPKAP-2 kinase, the transcriptional termination signals may be provided. Where the transcriptional termination signals are not satisfactorily functional in the expression host cell, then a 3' region functional in the host cell may be substituted.

Two DNA sequencers (such as a promoter region sequence and an
30 MAPKAP-2 encoding sequence) are said to be "operably linked" if the nature of the linkage between the two DNA sequences does not (1) result in the introduction of a frame-shift mutation, (2) interfere with the ability of the promoter region sequence to direct the transcription of the MAPKAP-2 encoding gene sequence, or (3) interfere with the ability of the an MAPKAP-2 encoding gene sequence to be transcribed by

WO 02/090524

PCT/US02/05670

the promoter region sequence. Thus, a promoter region would be operably linked to a DNA sequence if the promoter were capable of effecting transcription of that DNA sequence.

5 The selection of control sequences, expression vectors, transformation methods, and the like, are dependent on the type of host cell used to express the gene. As used herein, "cell", "cell line", and "cell culture" may be used interchangeably and all such designations include progeny.

The term "transformants" or "transformed cells" include the primary subject cell and cultures derived therefrom, without regard to the number of transfers. 10 It is also understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. However, as defined, mutant progeny have the same functionality as that of the originally transformed cell.

To express the human MAPKAP-2 kinase-encoding gene of the invention, transcriptional and translational signals recognized by an appropriate host 15 are necessary. The present invention encompasses the expression of the MAPKAPS-2 kinase encoding gene (or a functional derivative thereof) in either prokaryotic or eukaryotic cells.

Host cells which may be used in the expression systems of the present invention are not strictly limited, provided that they are suitable for use in the 20 expression of the novel human MAPKAP-2 kinase of the invention. Suitable hosts may often include eukaryotic cells.

Representative examples of appropriate host cells for use in practicing the present invention include bacterial cells, such as streptococci, staphylococci, E. coli, Streptomyces and Bacillus subtilis cells; fungal cells, such as yeast cells and 25 Aspergillus cells; insect cells such as Drosophila S2 and Spodoptera Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.

Fungal cells, including species of yeast (e.g., Saccharomyces spp., particularly S. cerevisiae, Schizosaccharomyces spp.) or filamentous fungi (e.g., 30 Aspergillus spp., Neurospora spp.) may be used as host cells within the present invention. Suitable yeast vectors for use in the present invention include YRp7 (Struhl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1035-1039, 1978), YEpl3 (Broach et al., Gene 8: 121-133, 1979), POT vectors (Kawasaki et al, U.S. Pat. No. 4,931,373, which is incorporated by reference herein), pJDB249 and pJDB219 (Beggs, Nature

WO 02/090524

PCT/US02/05670

275:104-108, 1978) and derivatives thereof. Such vectors will generally include a selectable marker, which may be one of any number of genes that exhibit a dominant phenotype for which a phenotypic assay exists to enable transformants to be selected. Preferred selectable markers are those that complement host cell auxotrophy, provide

5 antibiotic resistance or enable a cell to utilize specific carbon sources, and include LEU2 (Broach et al., *ibid.*), URA3 (Botstein et al., *Gene* 8: 17, 1979), HIS3 (Struhl et al., *ibid.*) or POT1 (Kawasaki et al., *ibid.*). Another suitable selectable marker is the CAT gene, which confers chloramphenicol resistance on yeast cells.

Any of a series of yeast gene sequence expression systems can be

10 utilized which incorporate promoter and termination elements from the actively expressed gene sequences coding for glycolytic enzymes are produced in large quantities when yeast are grown in mediums rich in glucose. Known glycolytic gene sequences can also provide very efficient transcriptional control signals.

Yeast provides substantial advantages in that it can also carry out post-

15 translational peptide modifications. A number of recombinant DNA strategies exist which utilize strong promoter sequences and high copy number of plasmids which can be utilized for production of the desired proteins in yeast. Yeast recognizes leader sequences on cloned mammalian gene sequence products and secretes peptides bearing leader sequences (*i.e.*, pre-peptides). For a mammalian host, several possible

20 vector systems are available for the expression of the MAPKAP-2 kinase.

A variety of higher eukaryotic cells may serve as host cells for expression of the polypeptides of the invention, although not all cell lines will be capable of functional coupling of the receptor to the cell's second messenger systems. Cultured mammalian cells, such as BHK, CHO, Y1 (Shapiro et al., *TIPS Suppl.* 43-46

25 (1989)), NG108-15 (Dawson et al., *Neuroscience Approached Through Cell Culture*, Vol. 2, pages 89-114 (1989)), N1E-115 (Liles et al., *J. Biol. Chem.* 261:5307-5313 (1986)), PC 12 and COS-1 (ATCC CRL 1650) are preferred. Preferred BHK cell lines are the tk.sup.-- ts13 BHK cell line (Waechter and Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1106-1110 (1982)) and the BHK 570 cell line (deposited with the

30 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. under accession number CRL 10314). A tk.sup.-- BHK cell line is available from the ATCC under accession number CRL 1632.

Prokaryotic hosts are, generally, very efficient and convenient for the production of recombinant proteins and are, therefore, one type of preferred expression system for the expressing the MAPKAP-2 kinase encoding gene.

Prokaryotes most frequently are represented by various strains of *E. coli*. However, other microbial strains may also be used, including other bacterial strains. In prokaryotic systems, plasmid vectors that contain replication sites and control sequences derived from a species compatible with the host may be used. Examples of suitable plasmid vectors may include pBR322, pUC-118, pUC119 and the like; suitable phage or bacteriophage vectors may include .gamma.gt10, .gamma.gt11 and the like; and suitable virus vectors may include pMAM-neo, pKRC and the like. Preferably, the selected vector of the present invention has the capacity to replicate in the selected host cell.

Recognized prokaryotic hosts include bacteria such as *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, and the like. However, under such conditions, the peptide will not be glycosylated. The prokaryotic host must be compatible with the replicon and control sequences in the expression plasmid.

To express the MAPKAP-2 kinase (or a functional derivative thereof) in a prokaryotic cell, it is necessary to operably link the MAPKAP-2 encoding nucleotide sequence to a functional prokaryotic promoter. Such promoters may be either constitutive or, more preferably, regulatable (i.e., inducible or derepressible). Examples of constitutive promoters and inducible promoters of well known to a skilled artisan. Prokaryotic promoters are reviewed by Cenatiempo (*Biochimie* 68:505-516 (1986)); and Gottesman (*Ann. Rev. Genet.* 18:415-442 (1984)). Proper expression in a prokaryotic cell also requires the presence of a ribosome-binding site upstream of the gene sequence-encoding sequence. Such ribosome binding sites are disclosed, for example, by Gold et al., *Ann. Rev. Microbiol.* 35:365-404 (1981).

As used herein, the term "promoter" refers to a polynucleotide sequence, preferably a DNA sequence, that regulates expression of a selected DNA sequence operably linked to the promoter, and which effects expression of the selected DNA sequence in cells. The term encompasses "tissue specific" promoters, i.e. promoters, which effect expression of the selected DNA sequence only in specific cells (e.g. cells of a specific tissue). The term also covers so-called "leaky" promoters, which regulate expression of a selected DNA primarily in one tissue, but cause expression in other tissues as well. The term also encompasses non-tissue

WO 02/090524

PCT/US02/05670

specific promoters and promoters that constitutively express or that are inducible (i.e. expression levels can be controlled).

5 A MAPKAP-2 kinase encoding nucleic acid molecule and an operably linked promoter may be introduced into a recipient prokaryotic or eukaryotic cell either as a nonreplicating DNA (or RNA) molecule, which may either be a linear molecule or, more preferably, a closed covalent circular molecule. Since such molecules are incapable of autonomous replication, the expression of the gene may occur through the transient expression of the introduced sequence. Alternatively, permanent expression may occur through the integration of the introduced DNA
10 sequence into the host chromosome.

In one embodiment, a vector is employed which is capable of integrating the desired gene sequences into the host cell chromosome. Cells which have stably integrated the introduced DNA into their chromosomes can be selected by also introducing one or more markers which allow for selection of host cells which
15 contain the expression vector. The marker may provide for prototrophy to an auxotrophic host, biocide resistance, e.g., antibiotics, or heavy metals, such as copper, or the like. The selectable marker gene sequence can either be directly linked to the DNA gene sequences to be expressed, or introduced into the same cell by co-transfection. Additional elements may also be needed for optimal synthesis of single
20 chain binding protein mRNA. These elements may include splice signals, as well as transcription promoters, enhancers, and termination signals. cDNA expression vectors incorporating such elements include those described by Okayama, Molec. Cell. Biol. 3:280 (1983).

In a preferred embodiment, the introduced nucleic acid molecule will
25 be incorporated into a plasmid or viral vector capable of autonomous replication in the recipient host. Any of a wide variety of vectors may be employed for this purpose. Factors of importance in selecting a particular plasmid or viral vector include: the ease with which recipient cells that contain the vector may be recognized and selected from those recipient cells which do not contain the vector; the number of
30 copies of the vector which are desired in a particular host; and whether it is desirable to be able to "shuttle" the vector between host cells of different species.

Preferred prokaryotic vectors include plasmids such as those capable of replication in *E. coli* (such as, for example, pBR322, ColEI, pSC101, pACYC 184, .pi.VX. Such plasmids are, for example, disclosed by Sambrook (cf. Molecular

WO 02/090524

PCT/US02/05670

- Cloning: A Laboratory Manual, second edition, edited by Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)). Bacillus plasmids include pC194, pC221, pT127, and the like. Such plasmids are disclosed by Gryczan (In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, N.Y. (1982), pp. 307-329).
- 5 Suitable Streptomyces plasmids include pIJ101 (Kendall et al., J. Bacteriol. 169:4177-4183 (1987)), and streptomyces bacteriophages such as .phi.C31 (Chater et al., In: Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54). Pseudomonas plasmids are reviewed by John et al. (Rev. Infect. Dis. 8:693-704 (1986)), and Izaki (Jpn. J. Bacteriol. 10 33:729-742 (1978)).
- As noted, *supra*, expression of the MAPKAP-2 kinase in eukaryotic hosts requires the use of eukaryotic regulatory regions. Such regions will, in general, include a promoter region sufficient to direct the initiation of RNA synthesis. Preferred eukaryotic promoters include, for example, the promoter of the mouse
- 15 metallothionein I gene sequence (Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288 (1982)); the TK promoter of Herpes virus (McKnight, Cell 31:355-365 (1982)); the SV40 early promoter (Benoist et al., Nature (London) 290:304-310(1981)); the yeast gal4 gene sequence promoter (Johnston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:6971-6975 (1982); Silver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:5951-5955 (1984)).
- 20 As is widely known, translation of eukaryotic mRNA is initiated at the colon which encodes the first methionine. For this reason, it is preferable to ensure that the linkage between a eukaryotic promoter and a DNA sequence which encodes the MAPKAP-2 kinase (or a functional derivative thereof) does not contain any intervening codons which are capable of encoding a methionine (i.e., AUG). The
- 25 presence of such codons results either in a formation of a fusion protein (if the AUG codon is in the same reading frame as the MAPKAP-2 coding sequence) or a frame-shift mutation (if the AUG codon is not in the same reading frame as the MAPKAP-2 coding sequence).
- Preferred eukaryotic plasmids include, for example, BPV, vaccinia,
- 30 SV40, 2-micron circle, and the like, or their derivatives. Such plasmids are well known in the art (Botstein et al., Miami Wntr. Symp. 19:265-274 (1982); Broach, In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., p. 445-470 (1981); Broach, Cell 28:203-204 (1982); Bollon et al., J. Clin. Hematol. Oncol. 10:39-48 (1980);

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Maniatis, In: Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, N.Y., pp. 563-608 (1980).

Once the vector or nucleic acid molecule containing the construct(s) has been prepared for expression, the DNA construct(s) may be introduced into an appropriate host cell by any of a variety of suitable means, i.e., transformation, transfection, conjugation, protoplast fusion, electroporation, particle gun technology, calcium phosphate-precipitation, direct microinjection, and the like. After the introduction of the vector, recipient cells are grown in a selective medium, which selects for the growth of vector-containing cells. Expression of the cloned gene molecule(s) results in the production of the herein-disclosed MAPKAP-2 kinase or biologically active fragments thereof. This can take place in the transformed cells as such, or following the induction of these cells to differentiate (for example, by administration of bromodeoxyuracil to neuroblastoma cells or the like).

A variety of incubation conditions can be used to form the peptide of the present invention. The most preferred conditions are those which mimic physiological conditions.

An example of the means for preparing the MAPKAP-2 kinase of the invention is to express nucleic acids encoding the MAPKAP-2 kinase in a suitable host cell, such as a bacterial cell, a yeast cell, an amphibian cell (i.e., oocyte), or a mammalian cell, using methods well known in the art, and recovering the expressed polypeptide, again using well-known methods.

Using methods such as northern blot or slot blot analysis, transfected cells that contain MAPKAP-2 kinase encoding DNA or RNA can be selected. Transfected cells can also be analyzed to identify those that express the MAPKAP-2 kinase. Analysis can be carried out, for example, by using any of well known screening assays attending a functional receptor, and comparing the values obtained to a control, untransfected host cells by electrophysiologically monitoring the currents through the cell membrane in response to MAPKAP-2 kinase, and the like. MAPKAP-2 kinase(s) can be isolated directly from cells that have been transformed with expression vectors comprising nucleic acid encoding the MAPKAP-2 kinases or fragments/portions thereof.

Nucleic acid molecules may be stably incorporated into cells or may be transiently introduced using methods known in the art. Stably transfected mammalian cells may be prepared by transfecting cells with an expression vector comprising a

WO 02/090524

PCT/US02/05670

sequence of nucleotides that encodes the MAPKAP-2 kinases in conjunction with a selectable marker gene (such as, for example, the gene for thymidine kinase, dihydrofolate reductase, neomycin resistance, and the like), and growing the transfected cells under conditions selective for cells expressing the marker gene. To
5 prepare transient transfectants, mammalian cells are transfected with a reporter gene (such as the E. coli .beta.-galactosidase gene) to monitor transfection efficiency. The precise amounts and ratios of DNA encoding the MAPKAP-2 kinases may be empirically determined and optimized for a particular cells and assay conditions. Selectable marker genes are typically not included in the transient transfections
10 because the transfectants are typically not grown under selective conditions, and are usually analyzed within a few days after transfection.

In order to identify cells that have integrated the cloned DNA, a selectable marker is generally introduced into the cells along with the gene or cDNA of interest. Preferred selectable markers for use in cultured mammalian cells include
15 genes that confer resistance to drugs, such as neomycin, hygromycin, and methotrexate. The selectable marker may be an amplifiable selectable marker. Preferred amplifiable selectable markers are the DHFR gene and the neomycin resistance gene. Selectable markers are reviewed by Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA, which is incorporated herein by
20 reference). The choice of selectable markers is well within the level of ordinary skill in the art.

Selectable markers may be introduced into the cell on a separate plasmid at the same time as the gene of interest, or they may be introduced on the same plasmid. If on the same plasmid, the selectable marker and the gene of interest
25 may be under the control of different promoters or the same promoter, the latter arrangement producing a dicistronic message. Constructs of this type are known in the art (for example, Levinson and Simonsen, U.S. Pat. No. 4,713,339). It may also be advantageous to add additional DNA, known as "carrier DNA" to the mixture which is introduced into the cells.

30 In particularly preferred aspects, eukaryotic cells which contain heterologous DNAs express such DNA and form recombinant MAPKAP-2 kinase. In more preferred aspects, recombinant MAPKAP-2 kinase activity is readily detectable because it is a type that is absent from the untransfected host cell.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Heterologous DNA may be maintained in the cell as an episomal element or may be integrated into chromosomal DNA of the cell. The resulting recombinant cells may then be cultured or subcultured (or passaged, in the case of mammalian cells) from such a culture or a subculture thereof. Methods for transfection, injection and culturing recombinant cells are known to the skilled artisan. Similarly, the MAPKAP-2 kinase(s) may be purified using protein purification methods known to those of skill in the art. For example, antibodies or other ligands that specifically bind to the MAPKAP-2 kinase may be used for affinity purification of the MAPKAP-2 kinase.

As used herein, "heterologous or foreign DNA and/or RNA" are used interchangeably and refer to DNA or RNA that does not occur naturally as part of the genome of the cell in which it is present or to DNA or RNA which is found in a location or locations in the genome that differ from that in which it occurs in nature. Typically, heterologous or foreign DNA and RNA refer to DNA or RNA that is not endogenous to the host cell and has been artificially introduced into the cell. Examples of heterologous DNA include DNA disclosed herein.

In other embodiments, mRNA may be produced by *in vitro* transcription of DNA encoding the MAPKAP-2 kinase. This mRNA can then be injected into *Xenopus* oocytes where the RNA directs the synthesis of the MAPKAP-2 kinase. Alternatively, the invention-encoding DNA can be directly injected into oocytes for expression of a functional MAPKAP-2 kinase. The transfected mammalian cells or injected oocytes may then be used in the methods of drug screening provided herein.

Alternatively, the invention DNA sequences can be transcribed into RNA, which can then be transfected into amphibian cells for translation into protein. Suitable amphibian cells include *Xenopus* oocytes.

II. Substantially Pure MAPKAP-2 Polypeptides

Also provided by the present invention are substantially pure signal-transduction kinase polypeptide designated MAPKAP-2. It is of human origin. It can be prepared in any suitable manner. It includes recombinantly produced polypeptides, synthetically produced polypeptides, or polypeptides produced by a combination of these methods.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

The MAPKAP-2 kinase of the invention includes the polypeptide defined by the sequence as set forth in SEQ ID NO:2 (in particular the mature polypeptide) as well as those polypeptides which have at least 80% identity to the polypeptide of SEQ ID NO:2 or the relevant portion and more preferably at least 85% identity, and still more preferably at least 90% identity, and even still more preferably at least 95% identity to SEQ ID NO: 2.

The terms "MAPKAP-2 polypeptide" and "MAPKAP-2 protein" "invention polypeptide" "MAPKAP-2 kinase" all of which may be used interchangeably are intended to encompass kinase polypeptides comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO. 2 or fragments thereof, and homologs thereof and include agonist and antagonist polypeptides.

"Polypeptide" or "peptide" or "protein" refers to a polymer of amino acid residues and to variants and synthetic analogs of the same and are used interchangeably herein. Thus, these terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residues is a synthetic non-naturally occurring amino acid, such as a chemical analog of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers. The invention polypeptide is the preferred polypeptide - a MAPKAP-2 kinase having the sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:2.

An "amino acid" is a subunit that is polymerized to form proteins and there are twenty amino acids that are universally found in proteins. The general formula for an amino acid is $H.sub.2N-CHR-COOH$, in which the R group can be anything from a hydrogen atom (as in the amino acid glycine) to a complex ring (as in the amino acid tryptophan).

The term "protein" refers to a compound formed of 5-50 or more amino acids joined together by peptide bonds.

An "amino acid" is a subunit that is polymerized to form proteins and there are twenty amino acids that are universally found in proteins. The general formula for an amino acid is $H.sub.2N-CHR-COOH$, in which the R group can be anything from a hydrogen atom (as in the amino acid glycine) to a complex ring (as in the amino acid tryptophan).

"Reporter" molecules are those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents which associate with, establish the

WO 02/090524

PCT/US02/05670

presence of, and may allow quantification of a particular nucleotide or amino acid sequence.

"Identity," as known in the art, is a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between polypeptide or polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences.

"Identity" or "homology" with respect to the invention polypeptide – MAPKAP-2 (SEQ ID NO: 2) is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the residues in SEQ ID NO: 2, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent homology, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. No N- nor C-terminal extensions, deletions nor insertions shall be construed as reducing identity or homology.

Parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

1) Algorithm: Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970) Comparison matrix: BLOSSUM62 from Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

A program useful with these parameters is publicly available as the "gap" program from Genetics Computer Group, Madison Wis. The aforementioned parameters are the default parameters for peptide comparisons (along with no penalty for end gaps).

Polypeptide embodiments further include an isolated polypeptide comprising a polypeptide having at least a 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 or 100% identity to a polypeptide reference sequence of SEQ ID NO:2, wherein the polypeptide sequence may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO: 2 or may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence, wherein the alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and wherein the alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among

WO 02/090524

PCT/US02/05670

the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence, and wherein the number of amino acid alterations is determined by multiplying the total number of amino acids in SEQ ID NO:2 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from the total number of amino acids in SEQ ID NO:2, or:

$$N_a = X_a - (X_a Y),$$

herein N_a is the number of amino acid alterations, X_a is the total number of amino acids in SEQ ID NO:2, Y is 0.50 for 50%, 0.60 for 60%, 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85%, 0.90 for 90%, 0.95 for 95%, 0.97 for 97% or 1.00 for 100%, and is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of X_a and Y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from X_a .

As used herein, a "variant" of the invention polypeptide refers to a polypeptide having an amino acid sequence with one or more amino acid substitutions, insertions, and/or deletions compared to the sequence of the invention polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference (invention polypeptide) and the variant are closely similar overall, and in many regions, identical. Such variants are generally biologically active and necessarily have less than 100% sequence identity with the polypeptide of interest.

In a preferred embodiment, the biologically active variant has an amino acid sequence sharing at least about 70% amino acid sequence identity with the invention polypeptide, preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%, still more preferably at least about 85%, even more preferably at least about 90%, and most preferably at least about 95%. Amino acid substitutions are preferably substitutions of single amino-acid residues.

A "fragment" of the invention polypeptide (reference protein) is meant to refer to a protein molecule which contains a portion of the complete amino acid sequence of the wild type or reference protein.

Preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention are expected to have, *inter alia*, similar biological functions/properties to their homologous polypeptides and polynucleotides. Furthermore, preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention have at least one MAPKAP-2 related activity.

As used herein, activity of the MAPKAP-2 kinase of the invention (SEQ ID NO: 2) refers to any activity characteristic of invention. Such activity can

WO 02/090524

PCT/US02/05670

typically be measured by one or more *in vitro* methods, and frequently corresponds to an *in vivo* activity of invention. Such activity may be measured by any method known to those of skill in the art, such as, for example, assays that measure second messenger activity or phosphorylation assays.

5 The invention polypeptide, biologically active fragments, and functional equivalents thereof can also be produced by chemical synthesis. For example, synthetic polypeptides can be produced using Applied Biosystems, Inc. Model 430A or 431A automatic peptide synthesizer (Foster City, Calif.) employing the chemistry provided by the manufacturer.

10 The present invention also provides compositions containing an acceptable carrier and any of an isolated, purified invention polypeptide, an active fragment thereof, or a purified, mature protein and active fragments thereof, alone or in combination with each other. These polypeptides or proteins can be recombinantly derived, chemically synthesized or purified from native sources.

15 The invention polypeptide may be in the form of the "mature" protein or may be a part of a larger protein such as a fusion protein. It is often advantageous to include sequences which aid in purification such as multiple histidine residues, or an additional sequence for stability during recombinant production.

20 Recombinant MAPKAP-2 kinase of the present invention may be prepared by processes well known in the art from genetically engineered host cells comprising expression systems. Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to expression systems which comprise a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, host cells which are genetically engineered with such expression systems and to the production of MAPKAP-2 kinase of the
25 invention by recombinant techniques. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

30 Also included are biologically active fragments or variants of the MAPKAP-2 kinase of the invention. A fragment is a polypeptide having an amino acid sequence that entirely is the same as part, but not all, of the amino acid sequence of the aforementioned polypeptide having the amino acid sequence as that depicted in SEQ ID NO.:2. Biologically active fragments are those that mediate kinase activity attending the mature or native MAPKAP-2 kinase, including those with a similar

WO 02/090524

PCT/US02/05670

activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Activity includes not only phosphorylating native substrates, but also synthetic substrates.

The following is a partial list of available substrates that are activated (phosphorylated) by MAPKAP-2 kinase of the invention.

Hsp-27 (Heat-shock protein-27) entire protein sequence, which is well known.

2) Peptides based on Hsp-27

10

- a) LCB-YSRALSRL-NH₂
- b) LCB-LLRGPSWDPR-NH₂
- c) LCB-RALSRLSSGV-NH₂

15

Hsp-25

Peptide based on glycogen synthase

20

- a) LCB-KKLNRTLSVA-NH₂

4) Peptide based on CREB

- a) LCB-KRREILSRPSYRK

25

Where LCB = Long chain Biotin and NH₂ = free amine.

30 Based upon the sequences provided herein, additional substrates can be identified and designed using known techniques.

As with the invention MAPKAP-2 polypeptides, fragments may be "free-standing," or comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region, most preferably as a single continuous region.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Preferred fragments include, for example, truncation polypeptides having the amino acid sequence substantially the same as that of the disclosed MAPKAP-2 polypeptides, except for deletion of a continuous series of residues that includes the amino terminus, or a continuous series of residues that includes the carboxyl terminus or deletion of two continuous series of residues, one including the amino terminus and one including the carboxyl terminus.

Preferably, all of these polypeptides retain the biological activity of the polypeptide disclosed herein, including its kinase activity. Thus, the polypeptides of the invention include polypeptides having an amino acid sequence at least 80% identical to that of SEQ ID NO:2 or fragments thereof with at least 85% identity to the corresponding fragment of SEQ ID NO:2.

Included in this group are variants of the defined sequence and fragments. Preferred variants are those that vary from the referents by conservative amino acid substitutions--i.e., those that substitute a residue with another of like characteristics. Typical such substitutions are among Ala, Val, Leu and Ile; among Ser and Thr; among the acidic residues Asp and Glu; among Asn and Gln; and among the basic residues Lys and Arg; or aromatic residues Phe and Tyr. Particularly preferred are variants in which several, 5-10, 1-5, or 1-2 amino acids are substituted, deleted, or added in any combination.

III. Peptide Nucleic Acids or "PNAs"

In yet another embodiment, the invention nucleic acid molecules can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, e.g., the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acid molecules can be modified to generate peptide nucleic acids (see Hyrup B. et al. (1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4 (1): 5-23). As used herein, the terms "peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics, e.g., DNA mimics, in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of PNAs has been shown to allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide

WO 02/090524

PCT/US02/05670

synthesis protocols as described in Hyrup B. et al. (1996) supra; Perry-O'Keefe et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670-675.

PNAs of the novel MAPKAP-2 encoding nucleic acid molecules can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as antisense or antigene agents for sequence-specific modulation of gene expression by, for example, inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of the invention nucleic acid molecules can also be used in the analysis of single base pair mutations in a gene, (e.g., by PNA-directed PCR clamping); as "artificial restriction enzymes" when used in combination with other enzymes, (e.g., S1 nucleases (Hyrup B. (1996) supra)); or as probes or primers for DNA sequencing or hybridization (Hyrup B. et al. (1996) supra; Perry-O'Keefe supra).

In another embodiment, PNAs of the invention can be modified, (e.g., to enhance their stability or cellular uptake), by attaching lipophilic or other helper groups to PNA, by the formation of PNA-DNA chimeras, or by the use of liposomes or other techniques of drug delivery known in the art. For example, PNA-DNA chimeras of the invention nucleic acid molecules can be generated which may combine the advantageous properties of PNA and DNA.

Such chimeras allow DNA recognition enzymes, (e.g., RNase H and DNA polymerases), to interact with the DNA portion while the PNA portion would provide high binding affinity and specificity. PNA-DNA chimeras can be linked using linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation (Hyrup B. (1996) supra). The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed as described in Hyrup B. (1996) supra and Finn P. J. et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24 (17):3357-63. For example, a DNA chain can be synthesized on a solid support using standard phosphoramidite coupling chemistry and modified nucleoside analogs, e.g., 5'-(4-methoxytrityl)amino-5'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used as a between the PNA and the 5' end of DNA (Mag, M. et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17: 5973-88). PNA monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment and a 3' DNA segment (Finn P. J. et al. (1996) supra). Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment (Peterser, K. H. et al. (1975) Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-11124).

In other embodiments, the oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors in vivo), or agents

WO 02/090524

PCT/US02/05670

facilitating transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810) or the blood-brain barrier (see, e.g., PCT Publication No. W089/10134). In addition, oligonucleotides can be modified

5 with hybridization-triggered cleavage agents (See, e.g., Krol et al. (1988) Bio-Techniques 6:958-976) or intercalating agents. (See, e.g., Zon (1988) Pharm. Res. 5:539-549). To this end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, (e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent).

10

IV. Compositions

The present invention also provides methods for reducing an abnormality in a signal transduction pathway, wherein the signal transduction

15 pathway contains a MAPKAP-2 kinase. Compositions and methods for the treatment of disorders which involve modulating the activity and/or level of individual components, e.g., cell proliferate disorders, hematopoietic cell disorders and disorders of the immune system including inflammation and rheumatoid arthritis, involving the MAPKAP-2 kinase as well as methods for the identification of agents for such

20 treatments are within the scope of the present invention. More, methods and compositions for prognostic evaluation of such disorders are also described.

In terms of methods and compositions for the treatment of such disorders, such methods and compositions may include, but are not limited to the agents capable of decreasing or inhibiting the interaction between a MAPKAP-2

25 kinase and a MAPKAP-2 target or natural binding partner (NBP). These may include the upstream kinase(s) that phosphorylates MAPKAP-2. Alternatively, the NBP may be a MAPKAP-2 substrate, e.g., Hsp-25 etc. Agents capable of modulating the activity and/or level of interaction between a MAPKAP-2, native or recombinant polypeptide and its binding partner include those agents that inhibit or decrease the

30 dephosphorylating activity of tyrosine phosphatases. Such agents may also include those that increase or stimulate phosphorylating activity of the activated MAPKAP-2 and thus effect its interaction with its native substrate, e.g., Hsp-25 or an artificial substrate.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Methods for the identifying such agents are also described. These methods may include, for example, assays to identify agents capable of disrupting or inhibiting or promoting the interaction between components of the complexes (e.g., MAPKAP-2:NBP complexes), and may also include paradigms and strategies for the rational design of drugs capable of disruption and/or inhibition and/or promotion of such complexes.

A disorder involving a MAPKAP-2 : NBP complex may, for example, develop because the presence of such a complex brings about the aberrant inhibition of a normal signal transduction event. In such a case, the disruption of the complex would allow the restoration of the usual signal transduction event. Further, an aberrant complex may bring about an altered subcellular adapter protein localization, which may result in, for example, dysfunctional cellular events. An inhibition of the complex in this case would allow for restoration or maintenance of a normal cellular architecture. Still further, an agent or agents that cause(s) disruption of the complex may bring about the disruption of the interactions among other potential components of a complex.

The above described antibodies may be made specific for recognizing a complex or an epitope thereof, or of specifically recognizing an epitope on either of the components of the complex, especially those epitopes which would not be recognized by the antibody when the component is present separate and apart from the complex. Such antibodies may be used, for example, in the detection of a complex in a biological sample, or, alternatively, as a method for the inhibition of a complex formation, thus inhibiting the development of a disorder. In general, the techniques described above regarding antibodies to MAPKAP-2 may also be used in relation to antibodies to the complex (MAPKAP-2 : NBP) and vice versa.

V. Anti-MAPKAP-2 Antibodies and Uses Therefor

Another aspect of the invention pertains to antibodies. For example, by using immunogens derived from a the invention polypeptide(s), its fragments or analogs thereof, e.g., based on the cDNA sequences, anti-protein/anti-peptide antisera or monoclonal antibodies can be made by standard protocols (See, for example, Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). The subject antibodies, in turn, can be used for producing

WO 02/090524

PCT/US02/05670

hybridoma(s), and identifying pharmaceutical compositions, and for studying DNA/protein interaction.

The term "immunospecific" means that the antibodies have substantial greater affinity for the polypeptides of the invention than their affinity for other related polypeptides in the prior art.

The antibodies of the present invention include monoclonal and polyclonal antibodies as well fragments of these antibodies, and humanized forms.

For example, polyclonal and monoclonal antibodies can be produced by methods well known in the art, as described, for example, in Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), which is incorporated herein by reference. Invention polypeptides can be used as immunogens in generating such antibodies. Alternatively, synthetic peptides can be prepared (using commercially available synthesizers) and used as immunogens. Amino acid sequences can be analyzed by methods well known in the art to determine whether they encode hydrophobic or hydrophilic domains of the corresponding polypeptide. Altered antibodies such as chimeric, humanized, CDR-grafted or bifunctional antibodies can also be produced by methods well known in the art. Such antibodies can also be produced by hybridoma, chemical synthesis or recombinant methods described, for example, in Sambrook et al., supra., and Harlow and Lane, supra. Both anti-peptide and anti-fusion protein antibodies can be used. (see, for example, Bahouth et al., Trends Pharmacol. Sci. 12:338 (1991); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, N.Y. (1989) which are incorporated herein by reference).

Polyclonal antibodies are heterogeneous populations of antibody molecules derived from the sera of animals immunized with an antigen, such as a complex, or an antigenic functional derivative thereof.

A monoclonal antibody, which is a substantially homogeneous population of antibodies to a particular antigen, may be obtained by any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to the hybridoma technique of Kohler and Milstein (Nature 256:495-497, 1975) and U.S. Pat. No. 4,376,110), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor et. al., Immunology Today 4:72, 1983; Cole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030, 1983), and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-

WO 02/090524

PCT/US02/05670

96). Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclass thereof. The hybridoma producing the mAb of this invention may be cultivated in vitro or in vivo. Production of high titers of mAbs in vivo makes this the presently preferred method of production.

- 5 For the production of polyclonal antibodies, various host animals may be immunized by injection with the complex including but not limited to rabbits, mice, rats, etc. Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as lysolecithin, pluronic polyols, 10 polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*.

- Any animal (mouse, rabbit, and the like) which is known to produce antibodies can be immunized with the selected polypeptide. Methods for 15 immunization are well known in the art. Such methods include subcutaneous or intraperitoneal injection of the polypeptide. One skilled in the art will recognize that the amount of polypeptide used for immunization will vary based on the animal which is immunized, the antigenicity of the polypeptide and the site of injection.

- The polypeptide may be modified or administered in an adjuvant in 20 order to increase the peptide antigenicity. Methods of increasing the antigenicity of a polypeptide are well known in the art. Such procedures include coupling the antigen with a heterologous protein (such as globulin or β -galactosidase) or through the inclusion of an adjuvant during immunization. For monoclonal antibodies, spleen cells from the immunized animals are removed, fused with myeloma cells, such as 25 SP2/0-Ag14 myeloma cells, and allowed to become monoclonal antibody producing hybridoma cells.

- For preparation of monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include the hybridoma technique (Kohler, G. and Milstein, C., *Nature* (1975) 30 256:495-497), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., *Immunology Today* (1983) 4:72) and the EBV-hybridoma technique (Cole et al, *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985). Active fragments of antibodies are encompassed within the definition of "antibody".

WO 02/090524

PCT/US02/05670

As the generation of human monoclonal antibodies to the novel MAPKAP-2 antigen may be difficult with conventional techniques, it may be desirable to transfer antigen binding regions of the non-human antibodies, e.g. the F(ab')₂ or hypervariable regions, to human constant regions (Fc) or framework regions by recombinant DNA techniques to produce substantially human molecules. Such methods are generally known in the art and are described in, for example, U.S. Pat. No. 4,816,397, EP publications 173,494 and 239,400, which are incorporated herein by reference. Alternatively, one may isolate DNA sequences which code for a human monoclonal antibody or portions thereof that specifically bind to the human polypeptide by screening a DNA library from human B cells according to the general protocol outlined by Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989), incorporated herein by reference, and then cloning and amplifying the sequences which encode the antibody (or binding fragment) of the desired specificity.

Antibody fragments also within the scope of the present invention. These may be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed (Huse et al., 1989, Science, 246:1275-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity to the PTK/adaptor complex.

Fragments also include single chain antibodies, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies, and epitope-binding fragments of any of the above. Techniques for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778) can also be adapted to produce single chain antibodies to polypeptides of this invention. Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778; Bird, Science 242:423-426, 1988; Houston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; and Ward et al., Nature 334:544-546, 1989) can be adapted to produce complex-specific single chain antibodies. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragment of the Fc region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide.

"Humanized antibodies" are also within the scope of the present invention as are chimeric antibodies. Techniques for making "humanized antibodies" are well known and within the skill of one skilled in the art. Humanized forms of the

WO 02/090524

PCT/US02/05670

antibodies of the present invention may be generated using one of the procedures known in the art such as chimerization or CDR grafting. As well, transgenic mice, or other organisms including other mammals, may be used to express humanized antibodies. The antibodies are preferably "substantially human" to minimize immunogenicity and are in substantially pure form. By "substantially human" is meant generally containing at least about 70% human antibody sequence, preferably at least about 80% human, and most preferably at least about 90-95% or more of a human antibody sequence to minimize immunogenicity in humans.

- Techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855, 1984; Neuberger et al., Nature, 312:604-608, 1984; Takeda et al., Nature, 314:452-454, 1985) by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. A chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine mAb and a human immunoglobulin constant region.

- In another embodiment, the present invention relates to a method of detecting an MAPKAP-2 kinase in a sample, comprising: a) contacting the sample with an above-described antibody, under conditions such that immunocomplexes form, and b) detecting the presence of said antibody bound to the polypeptide. In detail, the methods comprise incubating a test sample with one or more of the antibodies of the present invention and assaying whether the antibody binds to the test sample. Altered levels of MAPKAP-2 in a sample as compared to normal levels may indicate muscular disease. Conditions for incubating an antibody with a test sample vary. Incubation conditions depend on the format employed in the assay, the detection methods employed, and the type and nature of the antibody used in the assay. One skilled in the art will recognize that any one of the commonly available immunological assay formats (such as radioimmunoassays, enzyme-linked immunosorbent assays, diffusion based Ouchterlony, or rocket immunofluorescent assays) can readily be adapted to employ the antibodies of the present invention. Examples of such assays can be found in Chard, "An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques" Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock et al., "Techniques in Immunocytochemistry," Academic Press, Orlando, Fla. Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983),

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Vol. 3 (1985); Tijssen, "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology," Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985).

5 The immunological assay test samples of the present invention include cells, protein or membrane extracts of cells, or biological fluids such as blood, serum, plasma, or urine. The test sample used in the above-described method will vary based on the assay format, nature of the detection method and the tissues, cells or extracts used as the sample to be assayed. Methods for preparing protein extracts or membrane extracts of cells are well known in the art and can be readily be adapted in
10 order to obtain a sample which is capable with the system utilized.

In another embodiment, the present invention relates to a hybridoma which produces the above-described monoclonal antibody, or binding fragment thereof. A hybridoma is an immortalized cell line which is capable of secreting a specific monoclonal antibody. In general, techniques for preparing monoclonal
15 antibodies and hybridomas are well known in the art (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)).

Any one of a number of methods well known in the art can be used to
20 identify the hybridoma cell which produces an antibody with the desired characteristics. These include screening the hybridomas with an ELISA assay, western blot analysis, or radioimmunoassay (Lutz et al., Exp. Cell Res. 175:109-124 (1988)). Hybridomas secreting the desired antibodies are cloned and the class and subclass is determined using procedures known in the art (Campbell, Monoclonal
25 Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, supra (1984)). For polyclonal antibodies, antibody-containing antisera is isolated from the immunized animal and is screened for the presence of antibodies with the desired specificity using one of the above-described procedures.

An alternative embodiment contemplates detectably labeling the
30 above-described antibodies. For example, a detectable marker can be directly or indirectly attached to the antibody. Useful markers include, for example, radioisotopes, affinity labels (such as biotin, avidin, and the like), enzymatic labels (such as horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, and the like) fluorescent labels (such as FITC or rhodamine, and the like), paramagnetic atoms, and the like.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Procedures for accomplishing such labeling are well known in the art, for example, see (Stemberger et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer et al., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval et al., Immunot. 109:129 (1972); Goding, J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)). The labeled antibodies of the present invention can be used for
5 in vitro, in vivo, and *in situ* assays to identify cells or tissues which express a specific peptide.

Accordingly, methods are contemplated herein for detecting the presence of the novel polypeptides on the surface of a cell. In one assay format invention polypeptide is identified and/or quantified by using labeled antibodies,
10 preferably monoclonal antibodies which are reacted with body tissue known to express high levels hMAPKAP-2 and determining the specific binding thereto, the assay typically being performed under conditions conducive to immune complex formation. Unlabeled primary antibody can be used in combination with labels that are reactive with primary antibody to detect the receptor. For example, the primary
15 antibody may be detected indirectly by a labeled secondary antibody made to specifically detect the primary antibody. Alternatively, the anti-MAPKAP-2 antibody can be directly labeled, as described above. A wide variety of labels may be employed, such as radionuclides, particles (e.g., gold, ferritin, magnetic particles, red blood cells), fluorophores, chemiluminescers, enzymes, enzyme substrates, enzyme
20 cofactors, enzyme inhibitors, ligands (particularly haptens), etc.

In another embodiment of the present invention the above-described antibodies are immobilized on a solid support. Examples of such solid supports include plastics such as polycarbonate, complex carbohydrates such as agarose and sepharose, acrylic resins and such as polyacrylamide and latex beads. Techniques for
25 coupling antibodies to such solid supports are well known in the art (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)). The immobilized antibodies of the present invention can be used for in vitro, in vivo, and *in situ* assays as well as in immunochromatograph.

30 "Immunologically active fragment(s)" of the invention polypeptides are also embraced by the invention. Such fragments are those proteins that are capable of raising MAPKAP-2-specific antibodies in a target immune system (e.g., murine or rabbit) or of competing with native MAPKAP-2 for binding to invention-polypeptide specific antibodies, and is thus useful in immunoassays for detecting the

WO 02/090524

PCT/US02/05670

presence of MAPKAP-2 kinases in a biological sample. Such immunologically active fragments typically have a minimum size of 8 to 11 consecutive amino acids.

Furthermore, one skilled in the art can readily adapt currently available procedures, as well as the techniques, methods and kits disclosed above with regard to antibodies, to generate peptides capable of binding to a specific peptide sequence in order to generate rationally designed antipeptide peptides, for example see Hurby et al., "Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides", In Synthetic Peptides, A User's Guide, W. H. Freeman, N.Y., pp. 289-307(1992), and Kaspczak et al., Biochemistry 28:9230-8 (1989).

Anti-peptide peptides can be generated in one of many ways. A an aside, the anti-peptide peptides can be generated by replacing the basic amino acid residues found in the MAPKAP-2 kinase sequence with acidic residues, while maintaining hydrophobic and uncharged polar groups. For example, lysine, arginine, and/or histidine residues are replaced with aspartic acid or glutamic acid and glutamic acid residues are replaced by lysine, arginine or histidine.

Such antibodies can also be used for the immunoaffinity or affinity chromatography purification of the invention polypeptides. Antibodies so produced can also be used, *inter alia*, in diagnostic methods and systems to detect the level of the invention polypeptide(s) present in a mammalian, preferably human, body sample, such as tissue. With respect to the detection of such polypeptides, the antibodies can be used for *in vitro* diagnostic or *in vivo* imaging methods.

Immunological procedures useful for *in vitro* detection of invention polypeptides in a sample include immunoassays that employ a detectable antibody. Such immunoassays include, for example, competitive assays, sandwich assays, and the like, as generally described in, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,642,285; 4,376,110; 4,016,043; 3,879,262; 3,852,157; 3,850,752; 3,839,153; 3,791,932; and Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, N.Y. (1988), each incorporated by reference herein. Also included are Pandex microfluorimetric assay, agglutination assays, flow cytometry, serum diagnostic assays and immunohistochemical staining procedures, which are well known in the art.

Thus, an anti-MAPKAP-2 antibody (e.g., monoclonal antibody) can be used to isolate native MAPKAP-2 by standard techniques, such as affinity chromatography or immunoprecipitation. An anti-MAPKAP-2 antibody can facilitate

WO 02/090524

PCT/US02/05670

the purification of native MAPKAP-2 from cells and of recombinantly produced MAPKAP-2 expressed in host cells. Moreover, an anti-MAPKAP-2 antibody can be used to detect MAPKAP-2 protein (e.g., in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the MAPKAP-2 protein.

- 5 Anti-MAPKAP-2 antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, e.g., to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (i.e., physically linking) the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials,
- 10 luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an
- 15 example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include .sup.125 I, .sup.131 I, .sup.35 S or .sup.3 H.

- There are a variety of assay formats known to those of ordinary skill in
- 20 the art for using an antibody to detect a polypeptide in a sample. See, e.g., Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. For example, the antibody may be immobilized on a solid support such that it can bind to and remove the polypeptide from the sample. The bound polypeptide may then be detected using a second antibody that binds to the antibody/peptide complex
- 25 and contains a detectable reporter group. Alternatively, a competitive assay may be utilized, in which polypeptide that binds to the immobilized antibody is labeled with a reporter group and allowed to bind to the immobilized antibody after incubation of the antibody with the sample. The extent to which components of the sample inhibit the binding of the labeled polypeptide to the antibody is indicative of the level of
- 30 polypeptide within the sample. Suitable reporter groups for use in these methods include, but are not limited to, enzymes (e.g., horseradish peroxidase), substrates, cofactors, inhibitors, dyes, radionuclides, luminescent groups, fluorescent groups and biotin.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

In another embodiment of the present invention, a kit is provided which contains all the necessary reagents to carry out the previously described methods of detection. The kit may comprise: i) a first container means containing an above-described antibody, and ii) second container means containing a conjugate comprising a binding partner of the antibody and a label.

In an alternative embodiment, the kit further comprises one or more other containers comprising one or more of the following: wash reagents and reagents capable of detecting the presence of bound antibodies. Examples of detection reagents include, but are not limited to, labeled secondary antibodies, or in the alternative, if the primary antibody is labeled, the chromophoric, enzymatic, or antibody binding reagents which are capable of reacting with the labeled antibody. The compartmentalized kit may be as described above for nucleic acid probe kits.

One skilled in the art will readily recognize that the antibodies described in the present invention can readily be incorporated into one of the established kit formats which are well known in the art.

VI. Uses and Methods of the Invention

The invention polypeptide(s) (kinase polypeptide) are hypothesized to be ubiquitous in the mammalian host and are responsible for many biological functions, including many pathologies. Accordingly, it is desirous to find compounds and drugs which stimulate invention polypeptide on the one hand and which can inhibit the function of invention polypeptide on the other hand.

Specifically, the nucleic acid molecules, proteins, protein homologs, and antibodies described herein can be used in one or more of the following methods : a) screening assays ; b) predictive medicine i.e., diagnostic assays, prognostic assays, monitoring clinical trials and c) method of treatment, i.e., therapeutic and prophylactic.)

The invention nucleic acids can be used, for example, to express the invention polypeptides, to detect MAPKAP-2 mRNA or a genetic alteration in MAPKAP-2 encoding gene, and to modulate MAPKAP-2 activity, as described below. The MAPKAP-2 kinases can be used to treat disorders characterized by insufficient or excessive expression of MAPKAP-2 kinase or its native substrate or production of MAPKAP-2 kinase specific inhibitors or agonists. As well, the

WO 02/090524

PCT/US02/05670

invention polypeptide may be used to screen for naturally occurring MAPKAP-2 substrates, screen for therapeutics or compounds that modulate MAPKAP-2 activity, or production of MAPKAP-2 kinases that have decreased or aberrant activity compared to wild type MAPKAP-2. More, the anti-MAPKAP-2 antibodies may be useful for detecting and isolating MAPKAP-2 kinases, imaging, regulating bioavailability of MAPKAP-2 polypeptides, and modulating MAPKAP-2 activity. It is understood that the term "MAPKAP-2 polypeptide or kinase" is preferably the polypeptide having the sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:2.

10 A. Screening Assays

The signal-transduction kinase described herein – invention polypeptide or MAPKAP-2 kinase, its immunogenic fragments or oligopeptides can be used for screening therapeutic compounds in any of a variety of drug screening techniques. The fragment employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly.

Cell-Based Assays

20 Cell based assays can be used for identifying modulators, i.e., candidate or test compounds or agents (e.g., peptides, peptidomimetics, small molecules or other drugs) which bind to MAPKAP-2 kinases, have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, MAPKAP-2 expression or MAPKAP-2 activity, or have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, the expression or activity of a
25 MAPKAP-2 substrate.

As used herein, a compound or a signal that "modulates the activity" of invention polypeptide refers to a compound or a signal that alters the activity of invention polypeptide so that the activity of the invention polypeptide is different in the presence of the compound or signal than in the absence of the compound or signal.

30 In particular, such compounds or signals include agonists and antagonists. Such activity is generally detected using conventional assays described herein.

Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: *DeWitt et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909 (1993); *Zuckermann et al.* J. Med. Chem. 37:2678 (1994).

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Libraries of compounds may be presented in solution (e.g., *Houghten* Biotechniques 13:412-421 (1992), or on beads (*Lam*, *Nature* 354:82-84 (1991)), chips (*Fodor* *Nature* 364:555-556 (1993)), bacteria (U.S. Pat. No. 5,223,409), spores (U.S. Pat. No. 4,099), plasmids (*Cull et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869 (1992)) or
5 on phage (*Scott and Smith*, *Science* 249:386-390 (1990)).

Thus, methods for screening for compounds which modulate the expression of DNA or RNA encoding recombinant or native MAPKAP-2 kinase, as well as the function of the invention polypeptide *in vivo* are included within the scope of the present invention. Compounds which modulate these activities may be DNA,
10 RNA, peptides, proteins, or non-proteinaceous organic molecules. Compounds may modulate by increasing or attenuating the expression of DNA or RNA encoding the novel signal-transduction kinase polypeptide, or the function thereof. Compounds that modulate the expression of DNA or RNA encoding the invention polypeptide or the function of the polypeptide may be detected by a variety of assays.

15 The assay may be a simple "yes/no" assay to determine whether there is a change in expression or function. The assay may be made quantitative by comparing the expression or function of a test sample with the levels of expression or function in a standard sample.

Consequently, an embodiment of the invention promises methods of
20 identifying compounds that modulate the activity of a signal-transduction kinase polypeptide, which comprise combining a candidate compound suspected of being a modulator of a signal-transduction kinase activity with a signal-transduction kinase having the sequence substantially as depicted in SEQ ID NO:2, and measuring an effect of the candidate compound modulator on the kinase activity, i.e. ability of
25 MAPKAP-2 to phosphorylate a MAPKAP-2 substrate such as Hsp-27.

Accordingly, in one aspect, the invention features methods for identifying a reagent which modulates MAPKAP-2 kinase activity, comprising incubating MAPKAP-2 kinase with the test reagent and measuring the effect of the test reagent on the ability of MAPKAP-2 kinase to phosphorylate a MAPKAP-2
30 substrate.

Alternatively, methods of identifying compounds that modulate the activity of a signal-transduction kinase, comprise combining a candidate compound modulator of a signal-transduction kinase activity with a host-cell expressing the signal-transduction kinase molecule having the sequence substantially as depicted in

WO 02/090524

PCT/US02/05670

SEQ ID NO:2, and measuring an effect of the candidate compound modulator on the kinase activity. Preferred cellular assays for inhibitors of the kinase fall into two general categories: 1) direct measurement of the kinase activity, and 2) measurement of downstream events in the signaling cascade. These methods can employ the endogenous kinase, or the overexpressed recombinant kinase. Thus, activation of the MAPKAP-2 signal-transduction pathway may include measuring MAPKAP-2 kinase activity by the rate of substrate phosphorylation, e.g., Hsp-27 as determined by quantification of the rate of ³²P incorporation. Hsp-27 or another suitable MAPKAP-2 substrate may be co-expressed by the host cell, or in the alternative it may be added exogenously.

The term "MAPKAP-2 substrate" as used herein include MAPKAP-2 substrates, e.g., native substrates such as Hsp-27, Hsp-25 as well as artificial substrates well known to a skilled artisan.

The term "modulation of MAPKAP-2 activity" includes inhibitory or stimulatory effects. The invention is particularly useful for screening reagents that inhibit MAPKAP-2 activity. Such reagents are useful for the treatment or prevention of MAPKAP-2-mediated disorders, for example, inflammation and oxidative damage.

MAPKAP-2 kinase assays, for use in evaluating the polypeptide variants and other agents discussed herein, include any assays that evaluate a compound's ability to phosphorylate Hsp-27 or other MAPKAP-2 substrates, thereby rendering the MAPKAP-2 active (i.e., capable of phosphorylating in vivo substrates such as Hsp-27). MAPKAP-2 kinase for use in such methods may be endogenous proteins or variants thereof, may be purified or recombinant, and may be prepared using any of a variety of techniques that will be apparent to those of ordinary skill in the art.

For example, cDNA-encoding MAPKAP-2 may be cloned by PCR amplification from a suitable human cDNA library, using polymerase chain reaction (PCR) and methods well known to those of ordinary skill in the art. MAPKAP-2 may be cloned using primers based on the published sequence (*Derijard et al.*, Science 267:682-685, 1995). MAPKAP-2 cDNA may then be cloned into a bacterial expression vector and the protein produced in bacteria, such as *E. coli*, using standard techniques. The bacterial expression vector may, but need not, include DNA encoding an epitope such as glutathione-S transferase protein (GST) such that the recombinant protein contains the epitope at the N- or C-terminus.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

The ability of the MAPKAP-2 kinase to phosphorylate a MAPKAP-2 target molecule/substrate can be determined by, for example, an *in vitro* kinase assay. Briefly, a MAPKAP-2 substrate molecule, e.g., an immunoprecipitated MAPKAP-2 substrate molecule (Hsp-27, for example) from a cell line expressing such a molecule, can be incubated with the MAPKAP-2 kinase and radioactive ATP, e.g., [γ - ^{32} P] ATP, in a suitable buffer containing 50 mM HEPES pH 8, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 μ M ATP for 60 minutes at 30°C. In general, approximately 50 ng to 1 μ g of the polypeptide and 50 ng recombinant MAPKAP-2, with 2-7 cpm/fmol [γ - ^{32} P]ATP, is sufficient. Following the incubation, the immunoprecipitated MAPKAP-2 substrate molecule can be separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions, transferred to a membrane, e.g., a PVDF membrane, and autoradiographed. The appearance of detectable bands on the autoradiograph indicates that the MAPKAP-2 substrate i.e., Hsp-27 has been phosphorylated.

Incorporation of [^{32} P]phosphate into the MAPKAP-2 target substrate may be quantitated using techniques well known to those of ordinary skill in the art, such as with a phosphorimager. To evaluate the substrate specificity of polypeptide variants, a kinase assay may generally be performed as described above except that other MAPKAP-2 substrates are substituted for the Hsp-27.

Phosphoaminoacid analysis of the phosphorylated substrate can also be performed in order to determine which residues on the MAPKAP-2 substrate are phosphorylated. Briefly, the radiophosphorylated protein band can be excised from the SDS gel and subjected to partial acid hydrolysis. The products can then be separated by one-dimensional electrophoresis and analyzed on, for example, a phosphorimager and compared to ninhydrin-stained phosphoaminoacid standards.

In order to measure the cellular activity of the kinase, the source may be a whole cell lysate, prepared by one to three freeze-thaw cycles in the presence of standard protease inhibitors. Alternatively, the kinase may be partially or completely purified by standard protein purification methods. Finally, the kinase may be purified by affinity chromatography using specific antibody for the C terminal regulatory domain described herein or by ligands specific for the epitope tag engineered into the recombinant kinase moreover described herein. The kinase preparation may then be assayed for activity as described in the prior art.

To determine whether MAPKAP-2 phosphorylation results in activation, a coupled *in vitro* kinase assay may be performed using a substrate for

WO 02/090524

PCT/US02/05670

MAPKAP-2, such as Hsp-27, with or without an epitope tag. It should be noted that alternative buffers may be used and that buffer composition can vary without significantly altering kinase activity. Reactions may be separated by SDS-PAGE, visualized by autoradiography and quantitated using any of a variety of known techniques. Activated MAPKAP-2 will be capable of phosphorylating Hsp-27 at a level that is at least 5% above background using such an assay.

The specificity of MAPKAP-2 substrate phosphorylation can be tested not only by measuring Hsp-27 activation, but instead by employing mutated Hsp-27 molecules that lack the sites of MAPKAP-2 phosphorylations. Altered phosphorylation of the substrate relative to control values indicates alteration of the MAPKAP-2 signal transduction pathway, and increased risk in a subject of an MAPKAP-2-mediated disorder.

An embodiment of the invention pertains to detecting an active MAPKAP-2 kinase in a sample, in which an immunokinase assay is employed. Briefly, polyclonal or monoclonal antibodies may be raised against a unique sequence of a MAPKAP-2 kinase using standard techniques. A sample to be tested, such as a cellular extract, is incubated with the anti-MAPKAP-2 antibodies to immunoprecipitate a MAPKAP-2 kinase, and the immunoprecipitated material is then incubated with a substrate (e.g., Hsp-27) under suitable conditions for substrate phosphorylation. The level of substrate phosphorylation may generally be determined using any of a variety of assays, as described herein.

Methods of identifying compounds that modulate the biological activity of a signal-transduction kinase are also preferred, which comprise combining a candidate compound modulator of a signal-transduction kinase activity with a signal-transduction kinase having the sequence substantially as depicted in SEQ ID NO:2, and measuring an effect of the candidate compound modulator on the biological activity, which may include its synthesis, function, or activity.

In one embodiment, the screening assay comprises contacting a cell transfected with a reporter gene operably linked to an MAPKAP-2 promoter with a test compound and determining the level of expression of the reporter gene. The reporter gene can encode, e.g., a gene product that gives rise to a detectable signal such as: color, fluorescence, luminescence, cell viability, relief of a cell nutritional requirement, cell growth, and drug resistance. For example, the reporter gene can

WO 02/090524

PCT/US02/05670

encode a gene product selected from the group consisting of chloramphenicol acetyl transferase, luciferase, beta-galactosidase and alkaline phosphatase.

Methods of identifying compounds that modulate the pharmacological activity of a signal-transduction kinase are also preferred, which comprise combining
 5 a candidate compound modulator of a signal-transduction kinase activity with a signal-transduction kinase having the sequence substantially as depicted in SEQ ID NO:2, and measuring an effect of the candidate compound modulator on the pharmacological activity.

In addition to detecting MAPKAP-2 kinase activity in a sample,
 10 methods for detecting the level of MAPKAP-2 in a sample are also provided. The level of a MAPKAP-2 kinase or polynucleotide may generally be determined using a reagent that binds to the MAPKAP-2 kinase, DNA or mRNA.

An exemplary cell-based assay is based upon determining the ability of the test compound to modulate activity of MAPKAP-2 wherein the step of
 15 determining the ability of the test compound to modulate activity of MAPKAP-2 is accomplished, for example, by determining the ability of a signal-transduction kinase molecule having the sequence substantially as depicted in SEQ ID NO:2, to bind to or interact with the test compound or reagent. To detect MAPKAP-2 kinase, the reagent is typically an antibody, which may be prepared as described herein.

20 In a preferred embodiment, determining the ability of the MAPKAP-2 kinase to bind to or interact with a MAPKAP-2 target molecule can be accomplished by determining the activity of the target molecule. For example, the activity of the target molecule (substrate) can be determined by detecting induction of a cellular second messenger of the target (e.g., intracellular Ca.sup.2+, diacylglycerol, JP.sub.3, etc.), detecting catalytic/enzymatic activity of the target and appropriate substrate,
 25 detecting the induction of a reporter gene (comprising a target-responsive regulatory element operatively linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, e.g., chloramphenicol acetyl transferase), or detecting a target-regulated cellular response.

Compounds which are identified generally according to methods
 30 described, contemplated, and referenced herein that modulate the biological and/or pharmacological activity of a signal-transduction molecule of the sequence substantially as depicted in SEQ ID NO:2 are especially preferred embodiments of the present invention.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Another embodiment provides a method for screening a plurality of compounds for specific binding affinity with the signal-transduction kinase polypeptide or a fragment thereof, comprising providing

- 5 i) a plurality of compounds;
- ii) combining the invention polypeptide or a fragment thereof with each of a plurality of compounds for a time sufficient to allow binding under suitable conditions; and
- 10 iii) detecting binding of the kinase polypeptide, or fragment thereof, to each of the plurality of compounds, thereby identifying the compounds which specifically bind the signal-transduction kinase polypeptide.

A still further embodiment of the present invention provides a method of detecting an agonist or antagonist of MAPKAP-2 activity comprising incubating
 15 cells that express a polypeptide having the sequence substantially as set forth in SEQ ID NO: 2 in the presence of a compound and detecting changes in the level of polypeptide activity. The compounds thus identified would produce a change in activity indicative of the presence of the compound. In a preferred embodiment, the compound is present within a complex mixture, for example, serum, body fluid, or
 20 cell extracts. Once the compound is identified it can be isolated using techniques well known in the art.

In a preferred embodiment, the method includes the steps of (a) forming a reaction mixture, which includes: (i) a polypeptide having the sequence substantially as set forth on SEQ ID NO:2, (ii) a MAPKAP-2 binding
 25 partner/substrate and (iii) a test compound; and (b) detecting interaction between the polypeptide and the binding partner. A statistically significant change (potentiation or inhibition) in the interaction of the polypeptide and binding partner in the presence of the test compound, relative to the interaction in the absence of the test compound, indicates a potential agonist (mimetic or potentiator) or antagonist (inhibitor) of
 30 MAPKAP-2 bioactivity for the test compound. The reaction mixture can be a cell-free protein preparation, e.g., a reconstituted protein mixture or a cell lysate, or it can be a recombinant cell including a heterologous nucleic acid recombinantly expressing the MAPKAP-2 binding partner.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

In preferred embodiments, the step of detecting interaction of the MAPKAP-2 and MAPKAP-2 binding partner is a competitive binding assay. In other preferred embodiments, at least one of the MAPKAP-2 polypeptide and the MAPKAP-2 binding partner comprises a detectable label, and interaction of the

5 MAPKAP-2 and MAPKAP-2 binding partner is quantified by detecting the label in the complex. The detectable label can be, e.g., a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. In other embodiments, the complex is detected by an immunoassay.

In a further embodiment, the present invention provides a method of

10 agonizing (stimulating) or antagonizing MAPKAP-2 associated activity in a mammal comprising administering to said mammal an agonist or antagonist to a polypeptide having the sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:2 in an amount sufficient to effect said agonism or antagonism.

A preferred embodiment of the present invention is a method for

15 treatment of a patient in need of such treatment for a condition which is mediated by the human signal-transduction polypeptide described herein, e.g., SEQ ID NO:2, comprising administration of a therapeutically effective amount of a human signal-transduction modulating compound identified using sequence substantially as depicted in SEQ ID NO:2 as a pharmacological target in methods contemplated

20 herein.

In a preferred embodiment, the present invention relates to a method of treating inflammatory related diseases including rheumatoid arthritis in a mammal with an agonist or antagonist of MAPKAP-2 activity comprising administering the agonist or antagonist to a mammal in an amount sufficient to agonize or antagonize

25 MAPKAP-2 associated functions.

Cell-Free Assays

Cell-free assays can also be used to identify compounds capable of

30 interacting with a MAPKAP-2 kinase or its binding partner or substrate, to thereby modify activity of the polypeptide or binding partner. Such a compound can effect the activity of the polypeptide. Cell-free assays will also find use in identifying compounds which modulate the interaction between a MAPKAP-2 kinase and its natural binding partner/target molecule/substrate, i.e., Hsp-27.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

An exemplary cell-free screening assay includes the steps of contacting a MAPKAP-2 kinase polypeptide or functional fragment thereof with a test compound or library of test compounds under conditions favoring formation of a complex there between and detecting the formation of complexes. For detection purposes, the polypeptide can be labeled with a specific marker and the test compound or library of test compounds labeled with a different marker. Interaction of a test compound with the MAPKAP-2 kinase or fragment thereof partner can then be detected by determining the level of the two labels after an incubation step and a washing step. The presence of two labels after the washing step is indicative of an interaction.

In another embodiment, the assay includes the steps of contacting the MAPKAP-2 kinase polypeptide or biologically active portion thereof with a known compound which binds the MAPKAP-2 kinase to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with the MAPKAP-2 kinase, wherein determining the ability of the test compound to interact with the polypeptide comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to the MAPKAP-2 kinase polypeptide or biologically active portion thereof as compared to the known compound.

In an alternative cell-free assay, a MAPKAP-2 kinase polypeptide or biologically active portion thereof is contacted with a test compound and the ability of the test compound to modulate (e.g., stimulate or inhibit) the activity of the MAPKAP-2 kinase or biologically active portion thereof is determined. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of a MAPKAP-2 kinase can be accomplished, for example, by determining the ability of the MAPKAP-2 kinase to bind to a MAPKAP-2 target molecule (substrate) by one of the methods described above for determining direct binding.

Determining the ability of the MAPKAP-2 kinase polypeptide to bind to a MAPKAP-2 target molecule can also be accomplished using a technology such as real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIA). *Sjolander, S. and Urbaniczky, C.* Anal. Chem. 63:2338-2345 (1991). As used herein, "BIA" is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (e.g., BIAcore). Changes in the optical phenomenon of surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

An alternative embodiment to determine the ability of a compound to modulate the interaction between MAPKAP-2 kinase and its target molecule, without the labeling of any of the interactants, proposes the use of a microphysiometer to detect the interaction of MAPKAP-2 kinase with its target molecule. A

5 microphysiometer is useful in that it allows detection of the interaction without the labeling of either MAPKAP-2 or the target molecule. McConnell, H. M. et al. (1992) Science 257:1906-1912. As used herein, a "microphysiometer" (e.g., Cytosensor) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this
10 acidification rate can be used as an indicator of the interaction between the compound and its binding partner.

In more than one embodiment of the above assay methods of the present invention, it may be desirable to immobilize either MAPKAP-2 kinase or its target molecule to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of the
15 proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to the MAPKAP-2 kinase, or interaction of a MAPKAP-2 kinase with a target molecule in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtitre plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one
20 embodiment, a fusion protein can be provided which adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, glutathione-S-transferase/MAPKAP-2 fusion proteins or glutathione-S-transferase/target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) or glutathione derivatized microtitre plates, which are then combined
25 with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or MAPKAP-2 kinase, and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtitre plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either
30 directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of MAPKAP-2 kinase binding activity determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either a MAPKAP-2

WO 02/090524

PCT/US02/05670

kinase or a MAPKAP-2 target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated MAPKAP-2 kinase or target molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques well known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical).

Alternatively, antibodies reactive with MAPKAP-2 kinase or target molecules but which do not interfere with binding of the MAPKAP-2 kinase to its target molecule can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or MAPKAP-2 kinase trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the MAPKAP-2 kinase or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with the MAPKAP-2 kinase or target molecule.

One such method included within the scope of the invention is a method for identifying an agent to be tested for an ability to modulate a signal transduction pathway disorder. The method involves exposing at least one agent to a MAPKAP-2 kinase for a time sufficient to allow binding of the agent to the protein; removing non-bound agents; and determining the presence of the compound bound to the protein, thereby identifying an agent to be tested for an ability to modulate a disorder involving a MAPKAP-2 kinase complex.

In an alternative embodiment, determining the ability of the test compound to modulate the activity of a MAPKAP-2 kinase can be accomplished by determining the ability of the MAPKAP-2 kinase to further modulate the activity of a MAPKAP-2 target molecule (e.g., a MAPKAP-2 mediated signal transduction pathway component – Hsp-27 for example). For example, the activity of the effector molecule on an appropriate target can be determined, or the binding of the effector to an appropriate target can be determined as previously described.

In yet another embodiment, modulators of MAPKAP-2 expression are identified in a method wherein a cell is contacted with a candidate compound and the expression of MAPKAP-2 mRNA or protein in the cell is determined. The level of expression of MAPKAP-2 mRNA or protein in the presence of the candidate compound is compared to the level of expression of MAPKAP-2 mRNA or protein in the absence of the candidate compound. The candidate compound can then be

WO 02/090524

PCT/US02/05670

identified as a modulator of MAPKAP-2 expression based on this comparison. For example, when expression of MAPKAP-2 mRNA or polypeptide is greater (statistically significantly greater) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator (agonist) of MAPKAP-2 mRNA or polypeptide expression. Alternatively, when expression of MAPKAP-2 mRNA or polypeptide is less (statistically significantly less) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor (antagonist) of MAPKAP-2 mRNA or polypeptide expression. The level of MAPKAP-2 mRNA or polypeptide expression in the cells can be determined by methods described herein for detecting MAPKAP-2 mRNA or polypeptide.

In yet another aspect of the invention, the MAPKAP-2 kinase can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,283,317; *Zervos et al.* Cell 72:223-232 (1993); and Brent WO94/10300), to identify other proteins, which bind to or interact with MAPKAP-2 ("MAPKAP-2-binding proteins" or "MAPKAP-2-bp") and are involved in MAPKAP-2 activity. Such MAPKAP-2-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the MAPKAP-2 kinases or MAPKAP-2 targets as, for example, downstream elements of a MAPKAP-2-mediated signaling pathway. Alternatively, such MAPKAP-2-binding proteins are likely to be MAPKAP-2 inhibitors.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for a MAPKAP-2 protein is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (e.g., GAL-4). In the other construct, a DNA sequence, from a library of DNA sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, *in vivo*, forming a MAPKAP-2-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (e.g., LacZ) which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional

WO 02/090524

PCT/US02/05670

transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene, which encodes the protein, which interacts with the MAPKAP-2 kinase.

Accordingly, it is within the scope of this invention to further use an agent identified as described herein in an appropriate animal model. For example, an agent identified as described herein (e.g., a MAPKAP-2 modulating agent, an antisense MAPKAP-2 nucleic acid molecule, a MAPKAP-2-specific antibody, or a MAPKAP-2-binding partner) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent.

Alternatively, an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such an agent. Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents identified by the above-described screening assays for treatments as described herein.

B. Detection Assays

Portions or fragments of the cDNA sequences identified herein (and the corresponding complete gene sequences) can be used in numerous ways as polynucleotide reagents. For example, these sequences can be used to: (i) detect MAPKAP-2 encoding nucleotide sequences in a sample; (ii) map their respective genes on a chromosome, and, thus, locate gene regions associated with genetic disease; and (iii) identify an individual from a minute biological sample (tissue typing). These applications are described in the subsections below. Gene products can likewise be used as herein described.

(i) Detection in a sample

To detect nucleic acid encoding a polypeptide having the sequence substantially as set forth in SEQ ID NO: 2, standard hybridization and/or PCR techniques may be employed using a nucleic acid probe or a PCR primer. Suitable probes and primers may be designed by those of ordinary skill in the art based on the MAPKAP-2 cDNA sequences provided herein.

Consequently, determining the level of MAPKAP-2 expression may be accomplished by Northern blot analysis. Polyadenylated [poly(A)+] mRNA is isolated from a test sample. The mRNA is fractionated by electrophoresis and

WO 02/090524

PCT/US02/05670

transferred to a membrane. The membrane is probed with labeled MAPKAP-2 cDNA. In another embodiment, MAPKAP-2 expression is measured by quantitative PCR applied to expressed mRNA.

5 In another embodiment, the test reagent is incubated with a cell transfected with an MAPKAP-2 polynucleotide expression vector, and the effect of the test reagent on MAPKAP-2 transcription is measured by Northern blot analysis, as described above.

10 In another embodiment, activation of the MAPKAP-2 signal transduction pathway is determined by measuring the level of MAPKAP-2 expression in a test sample. In a specific embodiment, the level of MAPKAP-2 expression is measured by Western blot analysis. The proteins present in a sample are fractionated by gel electrophoresis, transferred to a membrane, and probed with labeled antibodies to MAPKAP-2.

15 Determining the ability of the MAPKAP-2 kinase to bind to or interact with a MAPKAP-2 target molecule can be accomplished by determining direct binding. Determining the ability of the MAPKAP-2 kinase to bind to or interact with a MAPKAP-2 target molecule can be accomplished, for example, by coupling the MAPKAP-2 kinase with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the MAPKAP-2 kinase to a MAPKAP-2 target molecule can be determined by detecting
20 the labeled MAPKAP-2 kinase in a complex. For example, MAPKAP-2 molecules, e.g., MAPKAP-2 kinase, can be labeled with ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , or ^3H , either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting.

25 Alternatively, MAPKAP-2 kinase molecules can be enzymatically labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product.

30 (ii) Chromosome Mapping

The nucleic acid molecules of the present invention may be valuable for chromosome identification. The sequence(s) is specifically targeted to and can hybridize with a particular location on an individual human chromosome. The mapping of relevant sequences to chromosomes according to the present invention is

WO 02/090524

PCT/US02/05670

an important first step in correlating those sequences with gene associated disease. Upon mapping a sequence to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data. (Such data are found, for example, in *V. McKusick*, Mendelian Inheritance in Man, available on-line through Johns Hopkins University Welch Medical Library). The relationship between a gene and a disease, mapped to the same chromosomal region, can then be identified through linkage analysis (co-inheritance of physically adjacent genes), described in, for example, *Egeland, J. et al. Nature*, 325:783-787 (1987). The differences in the cDNA or genomic sequence between affected and unaffected individuals can also be determined. If a mutation is observed in some or all of the affected individuals but not in any normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the disease.

For example, upon isolation of a sequence (or a portion of the sequence) of a gene, the isolated sequence can be used to map the location of the gene on a chromosome. This process is called chromosome mapping. Accordingly, portions or fragments of the MAPKAP-2 encoding nucleotide sequence(s) (SEQ ID NO: 1), described herein, can be used to map the location of the MAPKAP-2 encoding genes on a chromosome.

As an example, MAPKAP-2 encoding genes can be mapped to chromosomes by preparing PCR primers (preferably 15-25 bp in length) from the herein disclosed MAPKAP-2 nucleotide sequences. Computer analysis of the MAPKAP-2 sequences can be used to predict primers that do not span more than one exon in the genomic DNA, thus complicating the amplification process. Thereafter, these primers can be used for PCR screening of somatic cell hybrids containing individual human chromosomes. Only those hybrids containing the human gene corresponding to the MAPKAP-2 sequences will yield an amplified fragment.

Somatic cell hybrids are prepared by fusing somatic cells from different mammals (e.g., human and mouse cells). As hybrids of human and mouse cells grow and divide, they gradually lose human chromosomes in random order, but retain the mouse chromosomes. By using media in which mouse cells cannot grow, because they lack a particular enzyme, but human cells can, the one human chromosome that contains the gene encoding the needed enzyme, will be retained. By using various media, panels of hybrid cell lines can be established. Each cell line in a panel will contain either a single human chromosome or a small number of human

WO 02/090524

PCT/US02/05670

chromosomes, and a full set of mouse chromosomes, allowing easy mapping of individual genes to specific human chromosomes. (D'Eustachio P. et al. (1983) Science 220:919-924).

- Somatic cell hybrids containing only fragments of human
- 5 chromosomes can also be produced by using human chromosomes with translocations and deletions. PCR mapping of somatic cell hybrids is a rapid procedure for assigning a particular sequence to a particular chromosome. Three or more sequences can be assigned per day using a single thermal cycler. Using the MAPKAP-2 nucleotide sequences to design oligonucleotide primers, sublocalization can be
- 10 achieved with panels of fragments from specific chromosomes. Other mapping strategies include *in situ* hybridization (described in Fan, Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6223-27(1990)), pre-screening with labeled flow-sorted chromosomes, and pre-selection by hybridization to chromosome specific cDNA libraries.

- Fluorescence in situ hybridization (FISH)* of a DNA sequence to a
- 15 metaphase chromosomal spread can further be used to provide a precise chromosomal location in one step. Chromosome spreads can be made using cells whose division has been blocked in metaphase by a chemical such as colcemid that disrupts the mitotic spindle.

- The chromosomes can be treated briefly with trypsin, and then stained
- 20 with Giemsa. A pattern of light and dark bands develops on each chromosome, so that the chromosomes can be identified individually. The FISH technique can be used with a DNA sequence as short as 500 or 600 bases. However, clones larger than 1,000 bases have a higher likelihood of binding to a unique chromosomal location with sufficient signal intensity for simple detection. Preferably 1,000 bases, and more
- 25 preferably 2,000 bases will suffice to get good results at a reasonable amount of time. For a review of this technique, see Verma et al., Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York 1988).

- Reagents for chromosome mapping can be used individually to mark a
- 30 single chromosome or a single site on that chromosome, or panels of reagents can be used for marking multiple sites and/or multiple chromosomes. Reagents corresponding to noncoding regions of the genes actually are preferred for mapping purposes. Coding sequences are more likely to be conserved within gene families, thus increasing the chance of cross hybridizations during chromosomal mapping.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

More, differences in the DNA sequences between individuals affected and unaffected with a disease associated with the MAPKAP-2 encoding gene, can be determined. If a mutation is observed in some or all of the affected individuals but not in any unaffected individuals, then it is save to assume that the mutation is likely the causative agent of the particular disease. Comparison of affected and unaffected individuals generally involves first looking for structural alterations in the chromosomes, such as deletions or translocations that are visible from chromosome spreads or detectable using PCR based on that DNA sequence. Ultimately, complete sequencing of genes from several individuals can be performed to confirm the presence of a mutation and to distinguish mutations from polymorphisms.

(iii) Tissue Typing

The MAPKAP-2 sequences of the present invention can also be used to identify individuals from minute biological samples. The United States military, for example, is considering the use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) for identification of its personnel. In this technique, an individual's genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes, and probed on a Southern blot to yield unique bands for identification. This method does not suffer from the current limitations of "Dog Tags" which can be lost, switched, or stolen, making positive identification difficult. The sequences of the present invention are useful as additional DNA markers for RFLP (described in U.S. Pat. No. 5,272,057).

Furthermore, the sequences of the present invention can be used to provide an alternative technique which determines the actual base-by-base DNA sequence of selected portions of an individual's genome. Thus, the MAPKAP-2 nucleotide sequences described herein can be used to prepare two PCR primers from the 5' and 3' ends of the sequences. These primers can then be used to amplify an individual's DNA and subsequently sequence it.

Panels of corresponding DNA sequences from individuals, prepared in this manner, can provide unique individual identifications, as each individual will have a unique set of such DNA sequences due to allelic differences. The sequences of the present invention can be used to obtain such identification sequences from individuals and from tissue. The MAPKAP-2 nucleotide sequences of the invention uniquely represent portions of the human genome.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Allelic variation occurs to some degree in the coding regions of these sequences, and to a greater degree in the noncoding regions. It is estimated that allelic variation between individual humans occurs with a frequency of about once per each 500 bases. Each of the sequences described herein can, to some degree, be used as a standard against which DNA from an individual can be compared for identification purposes. Because greater numbers of polymorphisms occur in the noncoding regions, fewer sequences are necessary to differentiate individuals.

If a panel of reagents from MAPKAP-2 nucleotide sequences described herein is used to generate a unique identification database for an individual, those same reagents can later be used to identify tissue from that individual. Using the unique identification database, positive identification of the individual, living or dead, can be made from extremely small tissue samples.

The MAPKAP-2 nucleotide sequences described herein can further be used to provide polynucleotide reagents, e.g., labeled or labelable probes which can be used in, for example, an *in situ* hybridization technique, to identify a specific tissue, e.g., brain tissue.

In a similar fashion, the above referenced probes or MAPKAP-2 primers can also be used to screen tissue culture for contamination (i.e. screen for the presence of a mixture of different types of cells in a culture).

C. Predictive Medicine

The invention further features predictive medicines, which features diagnostic assays, prognostic assays and monitoring clinical trials used for prognostic (predictive) purposes with a view towards treating an individual prophylactically are based, at least in part, on the identity of the novel MAPKAP-2 gene and alterations in the genes and related pathway genes, which affect the expression level and/or function of the encoded MAPKAP-2 kinase in a subject.

Detection of a mutated form of a human MAPKAP-2 encoding gene associated with a dysfunction will provide a diagnostic tool that can add to or define a diagnosis of a disease or susceptibility to a disease which results from under-expression, over-expression or altered expression of human MAPKAP-2 kinase. Individuals carrying mutations in the MAPKAP-2 encoding gene may be detected at the DNA level by a variety of techniques.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Information obtained using the diagnostic assays described herein (alone or in conjunction with information on another genetic defect, which contributes to the same disease) is useful for prognosing, diagnosing or confirming that a subject has a genetic defect (e.g. in a MAPKAP-2 gene or in a gene that regulates the expression of a MAPKAP-2 gene), which causes or contributes to the development of inflammatory related disorders. Based on prognostic information, a doctor can recommend a regimen (e.g. diet or exercise) or therapeutic protocol, which is useful for preventing or prolonging onset of a pathological condition characterized by aberrant expression of a MAPKAP-2 gene in the individual.

In addition, knowledge of the particular alteration or alterations, resulting in defective or deficient MAPKAP-2 gene(s) or proteins in an individual (the MAPKAP-2 genetic profile), alone or in conjunction with information on other genetic defects contributing to an inflammatory related disorder allows customization of therapy to the individual's genetic profile, the goal of "pharmacogenomics". For example, an individual's MAPKAP-2 genetic profile, can enable a doctor to: 1) more effectively prescribe a drug that will address the underlying MAPKAP-2 associated disorder; and 2) better determine the appropriate dosage of a particular drug for the particular individual.

For example, the expression level of MAPKAP-2 kinase proteins, alone or in conjunction with the expression level of other genes, known to contribute to the same disease, can be measured in many patients at various stages of the disease to generate a transcriptional or expression profile of the disease. Expression patterns of individual patients can then be compared to the expression profile of the disease to determine the appropriate drug and dose to administer to the patient.

The ability to target populations expected to show the highest clinical benefit, based on the MAPKAP-2 or disease genetic profile, can enable: 1) the repositioning of marketed drugs with disappointing market results; 2) the rescue of drug candidates whose clinical development has been discontinued as a result of safety or efficacy limitations, which are patient subgroup-specific; and 3) an accelerated and less costly development for drug candidates and more optimal drug labeling (e.g. since the use of MAPKAP-2 as a marker is useful for optimizing effective dose).

Consequently, an aspect of the present invention relates to diagnostic assays for determining MAPKAP-2 kinase and/or nucleic acid expression as well as

WO 02/090524

PCT/US02/05670

MAPKAP-2 activity, in the context of a biological sample (e.g., blood, serum, cells, tissue) to thereby determine whether an individual is afflicted with a disease or disorder, or is at risk of developing a disorder, associated with aberrant MAPKAP-2 expression or activity.

5 The invention further provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a disorder associated with MAPKAP-2 kinase, nucleic acid expression or activity. For example, mutations in a MAPKAP-2 gene can be assayed in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purpose to thereby prophylactically treat an individual prior
10 to the onset of a disorder characterized by or associated with MAPKAP-2 kinase, nucleic acid expression or activity. Another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of agents (e.g., drugs, compounds) on the expression or activity of MAPKAP-2 in clinical trials.

15 These and other agents are described in further detail in the following sections.

(i) Diagnostic Assays

20 The present invention provides means for determining if a subject has (diagnostic) or is at risk of developing (prognostic) a disease, condition or disorder that is associated with an aberrant MAPKAP-2 activity, e.g., an aberrant level of MAPKAP-2 protein or an aberrant bioactivity, such as results in the development of an immune related inflammatory disorder.

25 Accordingly, an aspect of the invention provides methods for determining whether a subject has or is likely to develop an immune related disorder, comprising determining the level of an MAPKAP-2 gene or protein, an MAPKAP-2 bioactivity and/or the presence of a mutation or particular polymorphic variant in the MAPKAP-2 gene.

30 In one embodiment, the method comprises determining whether a subject has an abnormal mRNA and/or protein level of MAPKAP-2, such as by Northern blot analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), *in situ* hybridization, immunoprecipitation, Western blot hybridization, or immunohistochemistry.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

According to the method, cells are obtained from a subject and the MAPKAP-2 protein or mRNA level is determined and compared to the level of MAPKAP-2 protein or mRNA level in a healthy subject. An abnormal level of MAPKAP-2 kinase or mRNA level is likely to be indicative of an aberrant

5 MAPKAP-2 activity.

In another embodiment, the method comprises measuring at least one activity of MAPKAP-2. For example, regulation of the expression of MAPKAP-2 gene can be determined, e.g., as described herein. Comparison of the results obtained with results from similar analysis performed on MAPKAP-2 proteins from healthy

10 subjects is indicative of whether a subject has an abnormal MAPKAP-2 activity.

Another embodiment of the invention provides for a method for detecting the presence or absence of MAPKAP-2 kinase or nucleic acid in a biological sample entails obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a compound or an agent capable of detecting

15 MAPKAP-2 kinase or nucleic acid (e.g., mRNA, genomic DNA) that encodes a MAPKAP-2 kinase such that the presence of MAPKAP-2 kinase or nucleic acid is detected in the biological sample. Preferably, the agent used for detecting MAPKAP-2 mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to any MAPKAP-2 mRNA or genomic DNA that may be present in the sample. The

20 nucleic acid probe can be, for example, a human MAPKAP-2 nucleic acid, such as the nucleic acid of SEQ ID NO:1 or a portion thereof, preferably of a length sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to any MAPKAP-2 mRNA or genomic DNA suspected of being present in the sample. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

25 Alternatively, the agent may be a labeled probe such as an antibody that is specific for the gene product of SEQ ID NO: 1 - that is human MAPKAP-2 kinase. The antibody can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (e.g., Fab or F(ab').sub.2) can also be used. As noted *supra*, the term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (i.e., physically

30 linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently labeled secondary antibody and end labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently labeled streptavidin.

- The term "biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. That is, the detection method of the invention can be used to detect MAPKAP-2 mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. *In vitro* techniques for detection of MAPKAP-2 mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detecting the presence or absence of a MAPKAP-2 kinase or a fragment thereof in a sample include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence. Likewise, *in vitro* techniques for detecting MAPKAP-2 genomic DNA include Southern hybridizations.

- Thus, an embodiment of the invention relates to a method of detecting the presence of MAPKAP-2 in a sample comprising a) contacting said sample with the above-described nucleic acid probe, under conditions such that hybridization occurs, and b) detecting the presence of said probe bound to said nucleic acid molecule. One skilled in the art would select the nucleic acid probe according to techniques known in the art as described above. Samples to be tested include but should not be limited to RNA samples of human tissue.

- In another embodiment, the methods further involve obtaining a control biological sample from a control subject, contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting MAPKAP-2 kinase, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of MAPKAP-2 kinase, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and comparing the presence of MAPKAP-2 kinase, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of MAPKAP-2 kinase, mRNA or genomic DNA in the test sample.

- In vivo* techniques for detecting MAPKAP-2 kinase include introducing into a subject a labeled anti-MAPKAP-2 kinase specific-antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

Kits for detecting the presence or absence of human MAPKAP-2 kinase in a biological sample are also provided. For example, the kit can comprise a labeled compound or agent capable of detecting MAPKAP-2 kinase or mRNA in a

WO 02/090524

PCT/US02/05670

biological sample; means for determining the amount of MAPKAP-2 in the sample; and means for comparing the amount of MAPKAP-2 in the sample with a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect MAPKAP-2 kinase or nucleic acid.

5

(ii) Prognostic Assay

The diagnostic methods described herein can furthermore be utilized to identify subjects having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant MAPKAP-2 expression or activity. For example, the assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be utilized to identify a subject having or at risk of developing a disorder associated with MAPKAP-2 kinase, nucleic acid expression or activity.

As a consequence, there is provided a method for identifying a disease or disorder associated with aberrant MAPKAP-2 kinase expression or activity in which a test sample is obtained from a subject and MAPKAP-2 kinase or nucleic acid (e.g., mRNA, genomic DNA) is detected, wherein the presence of MAPKAP-2 kinase or nucleic acid is diagnostic for a subject having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant MAPKAP-2 expression or activity.

As used herein, a "test sample" refers to a biological sample obtained from a subject of interest. For example, a test sample can be a biological fluid (e.g., serum), cell sample, or tissue.

More, the prognostic assays described herein can also be used to determine whether a subject can be administered an agent (e.g., an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate) to treat a disease or disorder associated with aberrant MAPKAP-2 expression or activity.

In accordance with the above, there are provided methods for determining whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder associated with aberrant MAPKAP-2 expression or activity. The method comprises obtaining a test sample from a subject suspected of being at risk of developing a pathological condition associated with aberrant MAPKAP-2 activity or expression followed by detecting MAPKAP-2 kinase or nucleic acid expression or activity e.g., wherein the abundance of MAPKAP-2 kinase or nucleic acid expression or activity is

WO 02/090524

PCT/US02/05670

diagnostic for the subject who, can, in turn, be administered the agent to treat a disorder associated with aberrant MAPKAP-2 expression or activity.

The methods of the invention as noted *supra* can also be used to detect genetic alterations in a MAPKAP-2 gene, thereby determining if a subject with the altered gene is at risk for a disorder associated with the MAPKAP-2 gene. In preferred embodiments, the methods include detecting, in a sample of cells from the subject, the presence or absence of a genetic alteration characterized by at least one of an alteration affecting the integrity of a gene encoding a MAPKAP-2-polypeptide, or the mis-expression of the MAPKAP-2 gene.

Such genetic alterations can be detected by ascertaining the existence of at least one of 1) a deletion of one or more nucleotides from a MAPKAP-2 encoding gene; 2) an addition of one or more nucleotides to a MAPKAP-2 gene; 3) a substitution of one or more nucleotides of a MAPKAP-2 gene, 4) a chromosomal rearrangement of a MAPKAP-2 gene; 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a MAPKAP-2 gene, 6) aberrant modification of a MAPKAP-2 gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA, 7) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of a MAPKAP-2 gene, 8) a non-wild type level of a MAPKAP-2-polypeptide, 9) allelic loss of a MAPKAP-2 gene, and 10) inappropriate post-translational modification of a MAPKAP-2-polypeptide.

Additional MAPKAP-2 related diseases or pathological condition's associated with its aberrant expression can be diagnosed by methods comprising determining from a sample derived from a subject an abnormally decreased or increased level of MAPKAP-2 expression. Decreased or increased expression can be measured at the RNA level using any of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting and other hybridization methods. Assay techniques that can be used to determine levels of a polypeptide having a sequence as substantially set forth in SEQ ID NO:2 in a sample derived from a host are well known to those of skill in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays.

In an exemplary embodiment, detection of the alteration involves the use of a probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a

WO 02/090524

PCT/US02/05670

ligation chain reaction (LCR) (see, e.g., Landegran et al. (1988) *Science* 241:1077-1080; and Nakazawa et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in the MAPKAP-2-gene (see Abravaya et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682). This method can
 5 include the steps of collecting a sample of cells from a subject, isolating nucleic acid (e.g., genomic, mRNA or both) from the cells of the sample, contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to a MAPKAP-2 encoding gene under conditions such that hybridization and amplification of the MAPKAP-2-gene (if present) occurs, and detecting the presence or absence of an
 10 amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR may be desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.

Alternative amplification methods include: self sustained sequence
 15 replication (Guatelli, J. C. et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh, D. Y. et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi, P. M. et al. (1988) *Bio-Technology* 6:1197), or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art.
 20 These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low numbers.

Mutations in a MAPKAP-2 gene from a sample cell can also be identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA may be isolated, amplified (optionally), digested with one or more
 25 restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by gel electrophoresis and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (see, for example, U.S. Pat. No. 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme
 30 cleavage site.

In other embodiments, genetic mutations in MAPKAP-2 encoding gene can be identified by hybridizing a sample and control nucleic acids, e.g., DNA or RNA, to high density arrays containing hundreds or thousands of oligonucleotides

WO 02/090524

PCT/US02/05670

probes (Cronin, M. T. et al. (1996) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal, M. J. et al. (1996) *Nature Medicine* 2: 753-759).

For example, genetic mutations in MAPKAP-2 can be identified in two-dimensional arrays containing light-generated DNA probes as described in
 5 Cronin, M. T. et al. *supra*. Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential overlapping probes. This step allows the identification of point mutations. This step is followed by a second hybridization array that allows the characterization of specific mutations by
 10 using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the MAPKAP-2 encoding gene and
 15 detect mutations by comparing the sequence of the sample MAPKAP-2 with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on techniques developed by *Maxam and Gilbert*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560 (1977) or *Sanger*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463(1977). It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures can
 20 be utilized when performing the diagnostic assays (*Biotechniques* 19:448, (1995), including sequencing by mass spectrometry (see, e.g., PCT International Publication No. WO 94/16101; *Cohen et al.* *Adv. Chromatogr.* 36:127-162(1996); and *Griffin et al.* *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159 (1993)).

Other methods for detecting mutations in the MAPKAP-2 gene include
 25 methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (*Myers et al.* *Science* 230:1242, (1995)). In general, the art technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes formed by hybridizing (labeled) RNA or DNA containing the wild-type MAPKAP-2 sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a
 30 tissue sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent which cleaves single-stranded regions of the duplex such as which will exist due to base pair mismatches between the control and sample strands. For instance, RNA/DNA duplexes can be treated with RNase and DNA/DNA hybrids treated with S1 nuclease to enzymatically digesting the mismatched regions. In other embodiments, either

WO 02/090524

PCT/US02/05670

DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. After digestion of the mismatched regions, the resulting material is then separated by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation. See, for example, 5 *Cotton et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:4397(1988)*; *Saleeba et al. Methods Enzymol. 217:286-295(1992)*. In a preferred embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for detection.

In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA 10 (so called "DNA mismatch repair" enzymes) in defined systems for detecting and mapping point mutations in MAPKAP-2 cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (*Hsu et al. Carcinogenesis 15:1657-1662 (1994)*). According to an exemplary embodiment, a 15 probe based on a MAPKAP-2 sequence, e.g., a wild-type MAPKAP-2 sequence, is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is treated with a DNA mismatch repair enzyme, and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like. See, for example, U.S. Pat. No. 5,459,039.

20 In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility may be employed to identify mutations in MAPKAP-2 encoding genes.

Another method employs single strand conformation polymorphism (SSCP) to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (*Orita et al. Proc Natl. Acad. Sci USA: 86:2766(1989)*, *Hayashi Genet 25 Anal Tech Appl 9:73-79 (1992)*). Single-stranded DNA fragments of sample and control MAPKAP-2 nucleic acids are allowed to denature and then allowed to renature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility will enable one to detect even a single base change. The DNA fragments may be labeled or detected with 30 labeled probes. The sensitivity of the assay may be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In a preferred embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (*Keen et al., Trends Genet 7:5, (1991)*).

WO 02/090524

PCT/US02/05670

In yet another embodiment the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Myers et al. (1985) Nature 313:495). When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to insure that it does not completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 bp of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA (*Rosenbaum and Reissner*, Biophys Chem 265:12753(1987)), US 6,146,841.

Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension. For example, oligonucleotide primers may be prepared in which the known mutation is placed centrally and then hybridized to target DNA under conditions which permit hybridization only if a perfect match is found (Saiki et al. (1986) Nature 324:163); Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:6230). Such allele specific oligonucleotides are hybridized to PCR amplified target DNA or a number of different mutations when the oligonucleotides are attached to the hybridizing membrane and hybridized with labeled target DNA.

Alternatively, one may employ allele specific amplification technology which depends on selective PCR amplification in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as primers for specific amplification may carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization) (*Gibbs et al.* Nucleic Acids Res. 17:2437-2448 (1989)) or at the extreme 3' end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension. See *Prossner et al.* Tibtech 11:238(1993). In addition it may be desirable to introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection (*Gasparini et al.*, Mol. Cell Probes 6:1 (1992)). It is anticipated that in certain embodiments amplification may also be performed using Taq ligase for amplification, see *Barany*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189 (1991). In such cases, ligation will occur only if there is a perfect match at the 3' end of the 5' sequence making it possible to detect the presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

The methods described herein may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one probe nucleic acid or antibody reagent described herein, which may be conveniently used, e.g., in clinical settings to diagnose patients exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving a MAPKAP-2 gene.

Furthermore, any cell type or tissue in which MAPKAP-2 is expressed may be utilized in the prognostic assays described herein.

(iii) Antisense Molecules/Gene Therapy

10

Antisense Molecules

Agents which decrease the cellular level and/or the activity of the overexpressed and/or overactive MAPKAP-2 kinase or nucleic acid expression or activity will find use in various treatment regimens. Techniques for decreasing the cellular level and/or the activity MAPKAP-2 may include, but are not limited to antisense or ribozyme approaches, and/or gene therapy approaches, each of which is well known to those of skill in the art.

15

Provided herein are antisense oligonucleotides having a nucleotide sequence capable of binding specifically with any portion of an mRNA that encodes a MAPKAP-2 kinase of SEQ ID NO:2 so as to prevent translation of the mRNA. The antisense oligonucleotide may have a sequence capable of binding specifically with any portion of the sequence of the cDNA encoding the MAPKAP-2 kinase of the invention.

20

The cDNA sequence SEQ ID NO:1 provided herein, may be used in another embodiment of the invention to study the physiological relevance of the novel human signal-transduction kinase in cells, especially cells of hematopoietic origin, by knocking out the endogenous gene by use of anti-sense constructs.

25

Some methods of delivering the proposed antisense reagents include:

30

1) encapsulation in liposomes; 2) transduction by retroviral vectors; 3) localization to nuclear compartment utilizing nuclear targeting site found on most nuclear proteins; 4) transfection of cells ex vivo with subsequent re-implantation or administration of the transfected cells; and 5) a DNA transporter system.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Consequently, included in the scope of the invention are oligoribonucleotides, including antisense RNA and DNA molecules and ribozymes that function to inhibit translation of MAPKAP-2 encoding mRNA. Anti-sense RNA and DNA molecules act to directly block the translation of mRNA by binding to targeted mRNA and preventing protein translation. With respect to antisense DNA, oligodeoxyribonucleotides derived from the translation initiation site, e.g., between -10 and +10 regions of the relevant nucleotide sequence, are preferred.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence specific interaction of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by an endonucleolytic cleavage. Within the scope of the invention are engineered hammerhead or other motif ribozyme molecules that specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of RNA sequences encoding protein complex components.

Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences, GUA, GUU and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site may be evaluated for predicted structural features, such as secondary structure, that may render the oligonucleotide sequence unsuitable. The suitability of candidate targets may also be evaluated by testing their accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides, using ribonuclease protection assays. See, Draper, PCT WO 93/23569.

Both anti-sense RNA and DNA molecules and ribozymes of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of RNA molecules. See, Draper, *id.* hereby incorporated by reference herein. These include techniques for chemically synthesizing oligodeoxyribonucleotides well known in the art such as for example solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* and *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors which incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly, depending on the promoter used, can be introduced stably into cell lines.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Various modifications to the DNA molecules may be introduced as a means of increasing intracellular stability and half-life. Possible modifications include but are not limited to the addition of flanking sequences of ribo- or deoxy-nucleotides to the 5' and/or 3' ends of the molecule or the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the oligodeoxyribonucleotide backbone.

Oligomers of 12-21 nucleotides are most preferred in the practice of the present invention, particularly oligomers of 12-18 nucleotides. Oligos are, in principle, effective for inhibiting translation of the transcript, and capable of inducing the effects herein described. Translation is most effectively inhibited by blocking the mRNA at a site at or near the initiation codon. Thus, oligonucleotides complementary to the 5'-terminal region of the human kinase mRNA transcript are preferred. Secondary or tertiary structure which might interfere with hybridization is minimal in this region. Moreover, sequences that are too distant in the 3' direction from the initiation site can be less effective in hybridizing the mRNA transcripts because of a "read-through" phenomenon whereby the ribosome appears to unravel the antisense/sense duplex to permit translation of the message. Oligonucleotides which are complementary to and hybridizable with any portion of the novel human signal-transduction kinase mRNA are contemplated for therapeutic use.

U.S. Pat. No. 5,639,595, Identification of Novel Drugs and Reagents, issued Jun. 17, 1997, teaches methods of identifying oligonucleotide sequences that display *in vivo* activity. Expression vectors containing random oligonucleotide sequences derived from previously known polynucleotides are transformed/transfected into cells. The cells are then assayed for a phenotype resulting from the desired activity of the oligonucleotide. Once cells with the desired phenotype have been identified, the sequence of the oligonucleotide having the desired activity can be identified. Identification may be accomplished by recovering the vector or by polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing the region containing the inserted nucleic acid material.

Nucleotide sequences that are complementary to the novel signal-transduction kinase polypeptide encoding polynucleotide sequence described can be synthesized for antisense therapy. These antisense molecules may be DNA, stable derivatives of DNA such as phosphorothioates or methylphosphonates, RNA, stable derivatives of RNA such as 2'-O-alkylRNA, or other oligonucleotide mimetics. U.S.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Pat. No. 5,652,355, Hybrid Oligonucleotide Phosphorothioates, issued Jul. 29, 1997, and U.S. Pat. No. 5,652,356, Inverted Chimeric and Hybrid Oligonucleotides, issued Jul. 29, 1997, which describe the synthesis and effect of physiologically-stable antisense molecules, are incorporated by reference. Signal-transduction kinase antisense molecules may be introduced into cells by microinjection, liposome encapsulation or by expression from vectors harboring the antisense sequence. Antisense therapy may be particularly useful for the treatment of diseases where it is beneficial to reduce the signal-transduction kinase activity.

10 Gene Therapy

The human signal-transduction kinase described herein may administered to a subject via gene therapy. Moreover, the invention polypeptide may be delivered to the cells of target organs in this manner. Conversely, signal-transduction kinase antisense gene therapy may be used to reduce the expression of the polypeptide in the cells of target organs. See *Miller*, Nature 357:455-460, (1992). According to Miller, advances have resulted in practical approaches to human gene therapy that have demonstrated positive initial results.

In its simplest form, gene transfer can be performed by simply injecting minute amounts of DNA into the nucleus of a cell, through a process of microinjection. *Capecchi, MR*, Cell 22:479-88 (1980). Once recombinant genes are introduced into a cell, they can be recognized by the cells normal mechanisms for transcription and translation, and a gene product will be expressed.

Other methods have also been attempted for introducing DNA into larger numbers of cells. These methods include: transfection, wherein DNA is precipitated with CaPO₄ and taken into cells by pinocytosis (*Chen C. and Okayama H*, Mol. Cell Biol. 7:2745-52 (1987)); electroporation, wherein cells are exposed to large voltage pulses to introduce holes into the membrane (*Chu G. et al.*, Nucleic Acids Res., 15:1311-26 (1987)); lipofection/liposome fusion, wherein DNA is packaged into lipophilic vesicles which fuse with a target cell (*Felgner PL., et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413-7 (1987)); and particle bombardment using DNA bound to small projectiles (*Yang NS. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9568-72 (1990)). Another method for introducing DNA into cells is to couple the DNA to chemically modified proteins.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

It has also been shown that adenovirus proteins are capable of destabilizing endosomes and enhancing the uptake of DNA into cells. The admixture of adenovirus to solutions containing DNA complexes, or the binding of DNA to polylysine covalently attached to adenovirus using protein crosslinking agents substantially improves the uptake and expression of the recombinant gene. *Curiel DT*, et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 6:247-52 (1992).

As used herein "gene transfer" means the process of introducing a foreign nucleic acid molecule into a cell. Gene transfer is commonly performed to enable the expression of a particular product encoded by the gene. The product may include a protein, polypeptide, anti-sense DNA or RNA, or enzymatically active RNA. Gene transfer can be performed in cultured cells or by direct administration into animals. Generally gene transfer involves the process of nucleic acid contact with a target cell by non-specific or receptor mediated interactions, uptake of nucleic acid into the cell through the membrane or by endocytosis, and release of nucleic acid into the cytoplasm from the plasma membrane or endosome. Expression may require, in addition, movement of the nucleic acid into the nucleus of the cell and binding to appropriate nuclear factors for transcription.

As used herein "gene therapy" is a form of gene transfer and is included within the definition of gene transfer as used herein and specifically refers to gene transfer to express a therapeutic product from a cell in vivo or in vitro. Gene transfer can be performed ex vivo on cells which are then transplanted into a patient, or can be performed by direct administration of the nucleic acid or nucleic acid-protein complex into the patient.

The MAPKAP-2 kinase-coding region can be ligated into viral vectors which mediate transfer of the kinase polypeptide DNA by infection of recipient host cells. Suitable viral vectors include retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus, herpes virus, vaccinia virus, polio virus and the like. See, e.g., U.S. Pat. No. 5,624,820, Episomal Expression Vector for Human Gene Therapy, issued Apr. 29, 1997. Nucleic acid coding regions of the present invention are incorporated into effective eukaryotic expression vectors, which are directly administered or introduced into somatic cells for gene therapy (a nucleic acid fragment comprising a coding region, preferably mRNA transcripts, may also be administered directly or introduced into somatic cells). See, e.g., U.S. Pat. No. 5,589,466, issued Dec. 31, 1996. Such nucleic acids and vectors may remain episomal or may be incorporated into the host

WO 02/090524

PCT/US02/05670

chromosomal DNA as a provirus or portion thereof that includes the gene fusion and appropriate eukaryotic transcription and translation signals, i.e., an effectively positioned RNA polymerase promoter 5' to the transcriptional start site and ATG translation initiation codon of the gene fusion as well as termination codon(s) and
 5 transcript polyadenylation signals effectively positioned 3' to the coding region.

Alternatively, the invention polypeptide encoding DNA can be transferred into cells for gene therapy by non-viral techniques including receptor-mediated targeted DNA transfer using ligand-DNA conjugates or adenovirus-ligand-DNA conjugates, lipofection membrane fusion or direct microinjection. These
 10 procedures and variations thereof are suitable for *ex vivo*, as well as *in vivo* human signal-transduction kinase polypeptide gene therapy according to established methods in this art. See Chowdhury *et al.*, Science 254:1802-1805, 1991 and Wilson, Hum. Gene Ther. 3:179-222, 1992) *ex vivo* approaches, which can be modified to transfer the MAPKAP-2 nucleic acid sequence disclosed herein and re-implanted into an
 15 animal.

Other nonviral techniques for the delivery of a MAPKAP-2 nucleic acid sequence into a cell can be used, including direct naked DNA uptake (e.g., Wolff *et al.*, Science 247: 1465-1468, (1990)), receptor-mediated DNA uptake, e.g., using DNA coupled to asialoorosomucoid which is taken up by the asialoglycoprotein
 20 receptor in the liver (Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, (1987) and liposome-mediated delivery (Kaneda *et al.*, Expt. Cell Res. 173:56-69, (1987) and Kaneda *et al.*, Science 243:375-378, (1989). Many of these physical methods can be combined with one another and with viral techniques; enhancement of receptor-mediated DNA uptake can be effected, for example, by combining its use with adenovirus (Curiel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8850-8854, (1991)).
 25

The MAPKAP-2 kinase or nucleic acid encoding the MAPKAP-2 kinase may also be administered via an implanted device that provides a support for growing cells. Thus, the cells may remain in the implanted device and still provide the useful and therapeutic agents of the present invention.

30 In an exemplary embodiment, an expression vector containing the MAPKAP-2 coding sequence (SEQ ID NO: 1) is inserted into cells, the cells are grown *in vitro* and then infused in large numbers into patients. In another preferred embodiment, a DNA segment containing a promoter of choice (for example a strong promoter) is transferred into cells containing an endogenous MAPKAP-2 gene in such

WO 02/090524

PCT/US02/05670

a manner that the promoter segment enhances expression of the endogenous MAPKAP-2 gene (for example, the promoter segment is transferred to the cell such that it becomes directly linked to the endogenous MAPKAP-2 gene).

- 5 Target cell populations (e.g., cells of the immune system) may be modified by introducing altered forms of MAPKAP-2 kinase in order to modulate the activity of such cells.

- In another preferred embodiment, a method of gene replacement is set forth. "Gene replacement" as used herein means supplying a nucleic acid sequence which is capable of being expressed *in vivo* in an animal and thereby providing or
10 augmenting the function of an endogenous gene which is missing or defective in the animal.

PCR Diagnostics

- 15 The nucleic acid sequence, oligonucleotides, fragments, portions or antisense molecules thereof, may be used in diagnostic assays of body fluids or biopsied tissues to detect the expression level of the novel human signal-transduction kinase molecule. For example, sequences designed from the cDNA sequence SEQ ID NO:1 or sequences comprised in SEQ ID NO:2 can be used to detect the presence of
20 the mRNA transcripts in a patient or to monitor the modulation of transcripts during treatment.

- One method for amplification of target nucleic acids, or for later analysis by hybridization assays, is known as the polymerase chain reaction ("PCR") or PCR technique. The PCR technique can be applied to detect sequences of the
25 invention in suspected samples using oligonucleotide primers spaced apart from each other and based on the genetic sequence, e.g., SEQ ID NO:1, set forth herein. The primers are complementary to opposite strands of a double stranded DNA molecule and are typically separated by from about 50 to 450 nucleotides or more (usually not more than 2000 nucleotides). This method entails preparing the specific
30 oligonucleotide primers followed by repeated cycles of target DNA denaturation, primer binding, and extension with a DNA polymerase to obtain DNA fragments of the expected length based on the primer spacing. The degree of amplification of a target sequence is controlled by the number of cycles that are performed and is theoretically calculated by the simple formula 2^n where n is the number of cycles.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

See, e.g., *Perkin Elmer*, PCR Bibliography, Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J.; CLONTECH products, Palo Alto, Calif.; U.S. Pat. No. 5,629,158, Solid Phase Diagnosis of Medical Conditions, issued May 13, 1997.

5 Monitoring of Effects During Clinical Trials

 The ability to target populations expected to show the highest clinical benefit, based on the MAPKAP-2 or disease genetic profile, can enable: 1) the repositioning of marketed drugs with disappointing market results; 2) the rescue of
10 drug candidates whose clinical development has been discontinued as a result of safety or efficacy limitations, which are patient subgroup-specific; and 3) an accelerated and less costly development for drug candidates and more optimal drug labeling (e.g. since the use of MAPKAP-2 as a marker is useful for optimizing effective dose).

15 The treatment of an individual with an MAPKAP-2 therapeutic can be monitored by determining MAPKAP-2 characteristics, such as MAPKAP-2 protein level or activity, MAPKAP-2 mRNA level, and/or MAPKAP-2 transcriptional level. This measurements will indicate whether the treatment is effective or whether it should be adjusted or optimized. Thus, MAPKAP-2 can be used as a marker for the
20 efficacy of a drug during clinical trials.

 Monitoring the influence of agents (e.g., drugs or compounds) on the expression or activity of a MAPKAP-2 kinase are also contemplated by the invention and can be applied not only in basic drug screening, but also in clinical trials. For example, the effectiveness of an agent determined by a screening assay as described
25 above to increase MAPKAP-2 gene expression, protein levels, or upregulate MAPKAP-2 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased MAPKAP-2 gene expression, polypeptide levels, or downregulated MAPKAP-2 activity. Alternatively, the effectiveness of an agent determined by a screening assay to decrease MAPKAP-2 gene expression, polypeptide levels, or
30 downregulate MAPKAP-2 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased MAPKAP-2 gene expression, polypeptide levels, or upregulated MAPKAP-2 activity. In such clinical trials, the expression or activity of a MAPKAP-2 gene, and preferably, other genes that have been implicated in a disorder can be used as a "read out" or markers of the phenotype of a particular cell.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

For example, and not by way of limitation, genes, including MAPKAP-2, that are modulated in cells by treatment with an agent (e.g., compound, drug or small molecule) which modulates MAPKAP-2 activity (e.g., identified in a screening assay as described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents on a MAPKAP-2 associated disorder, for example, in a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of MAPKAP-2 and other genes implicated in the MAPKAP-2 associated disorder, respectively. The levels of gene expression (i.e., a gene expression pattern) can be quantified by Northern blot analysis or RT-PCR, as described herein, or alternatively by measuring the amount of polypeptide produced, by one of the methods as described herein, or by measuring the levels of activity of MAPKAP-2 or other genes. In this way, the gene expression pattern can serve as a marker, indicative of the physiological response of the cells to the agent. Accordingly, this response state may be determined before, and at various points during treatment of the individual with the agent.

In a preferred embodiment, the present invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent (e.g., an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate identified by the screening assays described herein) comprising the steps of (i) obtaining a pre-administration sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression of a MAPKAP-2 kinase, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the MAPKAP-2 kinase, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the MAPKAP-2 kinase, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the MAPKAP-2 kinase, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or samples; and (vi) altering the administration of the agent to the subject accordingly.

For example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of MAPKAP-2 to higher levels than detected, i.e., to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of MAPKAP-2 to lower levels than detected, i.e. to decrease the effectiveness of the agent. According to such an embodiment, MAPKAP-2 expression or activity may be used as an indicator of the effectiveness of an agent, even in the absence of an observable phenotypic response.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Cells of a subject may also be obtained before and after administration of an MAPKAP-2 therapeutic to detect the level of expression of genes other than MAPKAP-2, to verify that the MAPKAP-2 therapeutic does not increase or decrease the expression of genes which could be deleterious. This can be done, e.g., by using the method of transcriptional profiling. Thus, mRNA from cells exposed *in vivo* to an MAPKAP-2 therapeutic and mRNA from the same type of cells that were not exposed to the MAPKAP-2 therapeutic could be reverse transcribed and hybridized to a chip containing DNA from numerous genes, to thereby compare the expression of genes in cells treated and not treated with an MAPKAP-2 -therapeutic. If, for example an MAPKAP-2 therapeutic turns on the expression of a proto-oncogene in an individual, use of this particular MAPKAP-2 therapeutic may be undesirable.

To reiterate, biological tissue may be repeatedly assayed over time and the levels of the desired parameters, e.g., MAPKAP-2 kinase or mRNA or DNA be recorded over time to assess the usefulness of a therapeutic regime or determine the usefulness of a treatment protocol.

An embodiment of the invention pertains to a method for following progress of a therapeutic régime designed to alleviate a condition characterized by aberrant MAPKAP-2 kinase expression comprising:

- 20 (a) assaying a sample from a subject to determine level of a parameter selected from the group consisting of (i) a polypeptide encoded by a the nucleotide sequence of SEQ. ID. NO. 1 and (ii) a polypeptide encoded by the degenerate sequence thereto, (iii) a polypeptide having the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2;
- 25 (b) assaying level of the parameter selected in (a) at a second time point and
- (c) comparing said level at said second time point to the level determined in (a) as a determination of effect of said therapeutic régime.
- 30 A method for determining regression, progression or onset of a pathological disorder characterized by a dysfunctional signal transduction comprising incubating a sample obtained from a patient with said disorder with a complimentary nucleic acid hybridization probe having a sequence of nucleotides that are substantially homologous to those of SEQ. ID. NO. 1 and determining binding

WO 02/090524

PCT/US02/05670

between the probe and any complimentary mRNA that may be present in said sample as determinative of the regression, progression or onset of the pathological disorder in the patient.

- 5 A method for determining regression, progression or onset of a pathological disorder characterized by a dysfunctional signal transduction comprising: contacting a sample, from a patient with the disorder, with a detectable probe that is specific for the gene product of the isolated nucleic acid molecule having a sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 1, under conditions favoring formation of a probe/gene product complex, the presence of which is indicative of the regression
10 progression or onset of the pathological disorder in the patient.

C. Methods of Treatment

- 15 The present invention also provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject at risk of (or susceptible to) a disorder or having a disorder associated with aberrant MAPKAP-2 expression or activity. With regards to both prophylactic and therapeutic methods of treatment, such treatments may be specifically tailored or modified, based on knowledge obtained from the field of pharmacogenomics.

- 20 The term "Pharmacogenomics", as used herein, refers to the application of genomics technologies such as gene sequencing, statistical genetics, and gene expression analysis to drugs in clinical development and on the market. More specifically, the term refers the study of how a patient's genes determine his or her response to a drug (e.g., a patient's "drug response phenotype", or "drug response
25 genotype".)

- In accordance with the above, there are provided methods for tailoring an individual's prophylactic or therapeutic treatment with either the MAPKAP-2 kinase(s) of the present invention or MAPKAP-2 modulators according to that individual's drug response genotype. Pharmacogenomics allows a clinician or
30 physician to target prophylactic or therapeutic treatments to patients who will most benefit from the treatment and to avoid treatment of patients who will experience toxic drug-related side effects.

(i) Prophylactic Methods

WO 02/090524

PCT/US02/05670

In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a disease or condition associated with an aberrant MAPKAP-2 expression or activity, by administering to the subject a MAPKAP-2 kinase (SEQ ID NO:2) or an agent which modulates MAPKAP-2 expression or at least one MAPKAP-2 activity. Subjects at risk for a disease which is caused or contributed to by aberrant MAPKAP-2 expression or activity can be identified by, for example, any or a combination of diagnostic or prognostic assays as described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of the MAPKAP-2 aberrancy, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of MAPKAP-2 aberrancy, for example, a MAPKAP-2, MAPKAP-2 agonist or MAPKAP-2 antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

15
(ii) Therapeutic Methods

Another aspect of the invention pertains to methods of modulating MAPKAP-2 expression or activity for therapeutic purposes. As a consequence, an exemplary embodiment teaches a modulatory method which involves contacting a cell with a MAPKAP-2 or agent that modulates one or more of the activities of MAPKAP-2 kinase activity associated with the cell. An agent that modulates MAPKAP-2 kinase activity can be an agent as described herein, such as a nucleic acid or a polypeptide, a naturally-occurring target molecule of a MAPKAP-2 kinase (e.g., a MAPKAP-2 phosphorylation substrate – Hsp-27 or another native substrate), a MAPKAP-2 antibody, a MAPKAP-2 agonist or antagonist, a peptidomimetic of a MAPKAP-2 agonist or antagonist, or other small molecule.

An exemplary embodiment is drawn to an agent that stimulates one or more MAPKAP-2 activities. Examples of such stimulatory agents include active MAPKAP-2 kinase and a nucleic acid molecule encoding MAPKAP-2 kinase having a sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:2 that has been introduced into the cell.

In another embodiment, the agent inhibits one or more MAPKAP-2 activities.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Examples of such inhibitory agents include antisense MAPKAP-2 nucleic acid molecules, anti-MAPKAP-2 antibodies, and MAPKAP-2 inhibitors.

These modulatory methods can be performed *in vitro* (e.g., by culturing the cell with the agent) or, alternatively, *in vivo* (e.g., by administering the agent to a subject). As such, the present invention provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder characterized by aberrant expression or activity of a MAPKAP-2 kinase or nucleic acid molecule.

An exemplary method of the present invention involves administering an agent (e.g., an agent identified by a screening assay described herein), or combination of agents that modulates (e.g., upregulates or downregulates) MAPKAP-2 expression or activity. In another embodiment, the method involves administering a MAPKAP-2 kinase or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced or aberrant MAPKAP-2 expression or activity.

Stimulation of MAPKAP-2 activity is desirable in situations in which MAPKAP-2 is abnormally downregulated and/or in which increased MAPKAP-2 activity is likely to have a beneficial effect. For example, stimulation of MAPKAP-2 activity is desirable in situations in which a MAPKAP-2 is downregulated and/or in which increased MAPKAP-2 activity is likely to have a beneficial effect. Likewise, inhibition of MAPKAP-2 activity is desirable in situations in which MAPKAP-2 is abnormally upregulated and/or in which decreased MAPKAP-2 activity is likely to have a beneficial effect.

(iii) Pharmacogenomics

Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons. See, for example, *Eichelbaum, M. et al. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23(10-11):983-985 (1996) and *Linder, M. W. et al. Clin. Chem.* 43(2):254-266 (1997). In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare genetic defects or as naturally-occurring polymorphisms.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Knowledge of the particular alteration or alterations, resulting in defective or deficient MAPKAP-2 genes or proteins in an individual (the MAPKAP-2 genetic profile), alone or in conjunction with information on other genetic defects contributing to the same disease (the genetic profile of the particular disease) allows a customization of the therapy for a particular disease to the individual's genetic profile, the goal of "pharmacogenomics".

For example, subjects having a specific allele of a MAPKAP-2 gene may or may not exhibit symptoms of a particular disease or be predisposed of developing symptoms of a particular disease. Further, if those subjects are symptomatic, they may or may not respond to a certain drug, e.g., a specific MAPKAP-2 therapeutic, but may respond to another. Thus, generation of an MAPKAP-2 genetic profile, (e.g., categorization of alterations in MAPKAP-2 genes which are associated with the development of rheumatoid arthritis, for example), from a population of subjects, who are symptomatic for a disease or condition that is caused by or contributed to by a defective and/or deficient MAPKAP-2 gene and/or protein (a MAPKAP-2 genetic population profile) and comparison of an individual's MAPKAP-2 profile to the population profile, permits the selection or design of drugs that are expected to be safe and efficacious for a particular patient or patient population (i.e., a group of patients having the same genetic alteration).

As an example, a MAPKAP-2 population profile can be performed, by determining the MAPKAP-2 profile, e.g., the identity of MAPKAP-2 genes, in a patient population having a disease, which is caused by or contributed to by a defective or deficient MAPKAP-2 gene. Optionally, the MAPKAP-2 population profile can further include information relating to the response of the population to a MAPKAP-2 therapeutic, using any of a variety of methods, including, monitoring: 1) the severity of symptoms associated with the MAPKAP-2 related disease, 2) MAPKAP-2 gene expression level, 3) MAPKAP-2 mRNA level, and/or 4) MAPKAP-2 protein level and (iii) dividing or categorizing the population based on the particular genetic alteration or alterations present in its MAPKAP-2 gene or a MAPKAP-2 pathway gene. The MAPKAP-2 genetic population profile can also, optionally, indicate those particular alterations in which the patient was either responsive or non-responsive to a particular therapeutic. This information or population profile, is then useful for predicting which individuals should respond to particular drugs, based on their individual MAPKAP-2 profile.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

5 In a preferred embodiment, the MAPKAP-2 profile is a transcriptional or expression level profile and step (i) is comprised of determining the expression level of MAPKAP-2 proteins, alone or in conjunction with the expression level of other genes, known to contribute to the same disease. The MAPKAP-2 profile can be measured in many patients at various stages of the disease.

10 Pharmacogenomic studies can also be performed using transgenic animals. For example, one can produce transgenic mice, e.g., as described herein, which contain a specific allelic variant of an MAPKAP-2 gene. These mice can be created, e.g., by replacing their wild-type MAPKAP-2 gene with an allele of the human MAPKAP-2 gene. The response of these mice to specific MAPKAP-2 therapeutics can then be determined.

15 One pharmacogenomics approach to identifying genes that predict drug response, known as "a genome-wide association", relies primarily on a high-resolution map of the human genome consisting of already known gene-related markers (e.g., a "bi-allelic" gene marker map which consists of 60,000-100,000 polymorphic or variable sites on the human genome, each of which has two variants.) Such a high-resolution genetic map can be compared to a map of the genome of each of a statistically significant number of patients taking part in a Phase II/III drug trial to identify markers associated with a particular observed drug response or side effect.

20 Alternatively, such a high resolution map can be generated from a combination of some ten-million known single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome. As used herein, a "SNP" is a common alteration that occurs in a single nucleotide base in a stretch of DNA. For example, a SNP may occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP may be involved in a disease process, however, the vast majority may not be disease-associated. Given a genetic map based on the occurrence of such SNPs, individuals can be grouped into genetic categories depending on a particular pattern of SNPs in their individual genome. In such a manner, treatment regimens can be tailored to groups of genetically similar individuals, taking into account traits that may be common among such genetically similar individuals.

30 Alternatively, a method termed the "candidate gene approach", can be utilized to identify genes that predict a drug response. According to this method, if a gene that encodes a drug target is known (e.g., a MAPKAP-2 kinase of the present invention), all common variants of that gene can be fairly easily identified in the

WO 02/090524

PCT/US02/05670

population and it can be determined if having one version of the gene versus another is associated with a particular drug response.

As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (e.g., N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation as to why some patients do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. For example, the gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers of CYP2D6 and CYP2C19 quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM show no therapeutic response, as demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed metabolite morphine. The other extreme are the so called ultra-rapid metabolizers who do not respond to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to CYP2D6 gene amplification.

On the other hand, a method termed the "gene expression profiling", can be utilized to identify genes that predict drug response. For example, the gene expression of an animal dosed with a drug (e.g., a MAPKAP-2 kinases or MAPKAP-2 kinase modulator of the present invention) can give an indication whether gene pathways related to toxicity have been turned on.

Information generated from more than one of the above pharmacogenomics approaches can be used to determine appropriate dosage and treatment regimens for prophylactic or therapeutic treatment an individual. It is believed that the knowledge gleaned from the above, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject with a MAPKAP-2 kinase or MAPKAP-2 modulator, such as a modulator identified by one of the exemplary screening assays described herein.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

The MAPKAP-2 kinase of the present invention, as well as agents, or modulators which have a stimulatory or inhibitory effect on MAPKAP-2 activity (e.g., MAPKAP-2 gene expression) as identified by a screening assay described herein above can be administered to individuals to treat (prophylactically or therapeutically) disorders (e.g., cardiovascular disorders such as congestive heart failure) associated with aberrant MAPKAP-2 activity. In conjunction with such treatment, pharmacogenomics (i.e., the study of the relationship between an individual's genotype and that individual's response to a foreign compound or drug) may be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, a physician or clinician may consider applying knowledge obtained in relevant pharmacogenomics studies in determining whether to administer a MAPKAP-2 molecule or MAPKAP-2 modulator as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with a MAPKAP-2 molecule or MAPKAP-2 modulator.

VI. Zinc Finger Containing Proteins

The paradigm that the primary mechanism for governing the expression of genes involves protein switches that bind DNA in a sequence specific manner was established in 1967 - *Ptashne, M.*, Nature (London) 214, 323-4 (1967). Diverse structural families of DNA binding proteins have been described.

The selective expression of any one gene is accomplished primarily through the interaction of protein transcription factors with characteristic nucleotide sequences located in the control regions of the gene, which are most commonly located near to, or upstream from, the actual coding region. The binding of a set of such factors, or regulatory proteins, acts as a molecular switch for the activation of the RNA polymerase and other components of the transcriptional machinery, which are common to all genes. The supply of a particular combination of such transcription factors ensures that a gene is switched on at the right place and at the right time. Thus, transcriptional regulation is primarily achieved by the sequence-specific binding of proteins to DNA and RNA.

Of the known protein motifs involved in the sequence specific recognition of DNA, the zinc finger protein is unique in its modular nature. To date,

WO 02/090524

PCT/US02/05670

more than two hundred proteins, many of them transcription factors, have been shown to possess zinc fingers domains. The Cys₂-His₂ zinc finger motif, identified first in the DNA and RNA binding transcription factor TFIIIA (*Miller, J., McLachlan, A. D. & Klug, A., Embo J 4, 1609-14 (1985)*), is perhaps the ideal structural scaffold on which a sequence specific protein might be constructed. Zinc fingers connect transcription factors to their target genes mainly by binding to specific sequences of DNA base pairs--the "rungs" in the DNA "ladder". In fact, the Cys₂-His₂ zinc finger motif constitutes the most frequently utilized nucleic acid binding motif in eukaryotes.

These motifs can be used as modular building blocks for the construction of larger protein domains that recognize and bind to specific DNA sequences. Detailed models for the interaction of zinc fingers and DNA have been proposed (*Berg, 1988; and Churchill, et al., 1990*). Zinc finger proteins have also been reported which bind to RNA - *Clemens, et al., Science, 260:530, (1993)*.

Importantly, control of gene expression using designed zinc finger peptides has been demonstrated by the specific inhibition of an oncogene mouse cell line and also by switching on genes in expression plasmids. These experiments have shown zinc finger DNA-binding domains can be engineered *de novo* to recognize given DNA sequences. It is understood that five to six individual zinc fingers linked together would recognise a DNA sequence 15-18 bp in length, sufficiently long to constitute a rare address in the human genome. By adding functional groups to the engineered DNA-binding domains, e.g. silencing domains, novel transcription factors can be generated to up- or downregulate expression of a target gene. Among potential applications are the repression of oncogene expression and the disruption of the reproductive cycle of virus infection. *Klug, A, J Mol 293(2):215-8 (1999)*.

US Patent No. 6,140,466 teaches methods for designing new zinc finger modules that bind to a cellular nucleotide sequence and modulate the function of the cellular nucleotide sequence. The proposed new variant binds to either DNA or RNA and may enhance or suppress transcription from a promoter or from within a transcribed region of a structural gene. The cellular nucleotide sequence may be a sequence which is a naturally occurring sequence in the cell, or it may be a viral-derived nucleotide sequence in the cell. See also US patent 5,789,538.

As a consequence, the herein disclosed novel nucleotide sequences can be used to design now zinc finger containing proteins that can be used to express

WO 02/090524

PCT/US02/05670

endogenous MAPKAP-2 from a cell line without the need to transform cells with heterologous DNA encoding MAPKAP-2 kinase. The proposed new zinc finger proteins will be specific for the polynucleotide sequences disclosed herein or complementary sequences thereof, which encode substantially the polypeptide of SEQ

- 5 ID NO:2. The resulting proteins can, in turn, be used to treat a MAPKAP-2 related disorder.

VII. Pharmaceutical Formulations and Modes of Administration

- 10 Pharmaceutically useful compositions comprising the novel human kinase encoding DNA, human kinase encoding RNA, antisense sequences, or the human kinase having a sequence substantially as set forth in SEQ ID NO: 2, or variants and analogs which have the human kinase activity or otherwise modulate its activity, may be formulated according to known methods such as by the admixture of
- 15 a pharmaceutically acceptable carrier. Examples of such carriers and methods of formulation may be found in Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co, Easton, Pa.). To form a pharmaceutically acceptable composition suitable for effective administration, such compositions will contain an effective amount of the protein, DNA, RNA, or modulator.

- 20 The therapeutically effective dose refers to compositions of the invention that are administered to an individual in amounts sufficient to treat or diagnose human signal-transduction kinase polypeptide related disorders. The effective amount may vary according to a variety of factors such as the individual's condition, weight, sex and age. Other factors include the mode of administration. An
- 25 effective but non-toxic amount of the compound desired can be employed as a signal-transduction kinase modulating agent.

- Compounds identified according to the methods disclosed herein may be used alone at appropriate dosages defined by routine testing in order to obtain optimal modulation of a signal-transduction kinase, or its activity while minimizing any potential toxicity. In addition, co-administration or sequential administration of
- 30 other agents may be desirable.

Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining the LD₅₀. (the dose lethal to 50% of the

WO 02/090524

PCT/US02/05670

- population) and the ED.sub.50 (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD.sub.50 /ED.sub.50. Compounds which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from these cell
- 5 culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in human. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED.sub.50 with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized.
- 10 The exact formulation, route of administration and dosage can be chosen by the individual physician in view of the patient's condition. See e.g. *Fingl et al.*, in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, Ch. 1 p. 1. It should be noted that the attending physician would know how to and when to terminate, interrupt, or adjust administration due to toxicity, or to organ dysfunction.
- 15 Conversely, the attending physician would also know to adjust treatment to higher levels if the clinical response were not adequate (precluding toxicity). The magnitude of an administered dose in the management of the disorder of interest will vary with the severity of the condition to be treated and to the route of administration. The severity of the condition may, for example, be evaluated, in part, by standard
- 20 prognostic evaluation methods. Further, the dose and perhaps dose frequency, will also vary according to the age, body weight, and response of the individual patient. A program comparable to that discussed above may be used in veterinary medicine. The dosage should not be so large as to cause adverse side effects, such as unwanted cross-reactions, anaphylactic reactions, and the like.
- 25 Generally, the dosage will vary with the age, condition, sex and extent of disease in the patient, counter indications, if any, and other such variables, to be adjusted by the individual physician. Dosage can vary from 0.001 mg/kg to 50 mg/kg, preferably 0.1 mg/kg to 1.0 mg/kg, of the agonist or antagonist of the invention, in one or more administrations daily, for one or several days.
- 30 For oral administration, the compositions are preferably provided in the form of scored or unscored tablets containing 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, and 50.0 milligrams of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level of from about 0.0001 mg/kg to about 100

WO 02/090524

PCT/US02/05670

mg/kg of body weight per day. The range is more particularly from about 0.001 mg/kg to 10 mg/kg of body weight per day. Even more particularly, the range varies from about 0.05 to about 1 mg/kg. Of course the dosage level will vary depending upon the potency of the particular compound. Certain compounds will be more potent
5 than others. In addition, the dosage level will vary depending upon the bioavailability of the compound. The more bioavailable and potent the compound, the less compound will need to be administered through any delivery route, including but not limited to oral delivery. The dosages of the human signal-transduction kinase modulators are adjusted when combined to achieve desired effects. On the other
10 hand, dosages of these various agents may be independently optimized and combined to achieve a synergistic result wherein the pathology is reduced more than it would be if either agent were used alone. Those skilled in the art will employ different formulations for nucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells and conditions.

15 For example, a dose can be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ as determined in cell culture (i.e., the concentration of the test compound which achieves a half-maximal disruption of the polypeptide complex, or a half-maximal inhibition of the cellular level and/or activity of a complex component). Such information can be used
20 to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by HPLC.

The pharmaceutical compositions may be provided to the individual by a variety of routes such as subcutaneous, topical, oral and intramuscular. Administration of pharmaceutical compositions is accomplished orally or
25 parenterally. Methods of parenteral delivery include topical, intra-arterial (directly to the tissue), intramuscular, subcutaneous, intramedullary, intrathecal, intraventricular, intravenous, intraperitoneal, or intranasal administration. The present invention also has the objective of providing suitable topical, oral, systemic and parenteral pharmaceutical formulations for use in the novel methods of treatment of the present
30 invention. The compositions containing compounds identified according to this invention as the active ingredient for use in the modulation of signal-transduction kinase can be administered in a wide variety of therapeutic dosage forms in conventional vehicles for administration. For example, the compounds can be administered in such oral dosage forms as tablets, capsules (each including timed

WO 02/090524

PCT/US02/05670

release and sustained release formulations), pills, powders, granules, elixirs, tinctures, solutions, suspensions, syrups and emulsions, or by injection. Likewise, they may also be administered in intravenous (both bolus and infusion), intraperitoneal, subcutaneous, topical with or without occlusion, or intramuscular form, all using

5 forms well known to those of ordinary skill in the pharmaceutical arts.

For injection, the agents of the invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks's solution, Ringer's solution, or physiological saline buffer. For such transmucosal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the

10 formulation. Such penetrants are generally known in the art.

Use of pharmaceutically acceptable carriers to formulate the compounds herein disclosed for the practice of the invention into dosages suitable for systemic administration is within the scope of the invention. With proper choice of carrier and suitable manufacturing practice, the compositions of the present invention,

15 in particular, those formulated as solutions, may be administered parenterally, such as by intravenous injection. The compounds can be formulated readily using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art into dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the compounds of the invention to be formulated as tablets, pills, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and

20 the like, for oral ingestion by a patient to be treated.

Agents intended to be administered intracellularly may be administered using techniques well known to those of ordinary skill in the art. For example, such agents may be encapsulated into liposomes, then administered as described above. Liposomes are spherical lipid bilayers with aqueous interiors. All molecules present

25 in an aqueous solution at the time of liposome formation are incorporated into the aqueous interior. The liposomal contents are both protected from the external microenvironment and, because liposomes fuse with cell membranes, are efficiently delivered into the cell cytoplasm. Additionally, due to their hydrophobicity, small organic molecules may be directly administered intracellularly.

In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. The preparations formulated for oral administration may be in the form of tablets, capsules, or solutions. The

30

WO 02/090524

PCT/US02/05670

pharmaceutical compositions of the present invention may be manufactured in a manner that is itself known, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, levitating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes.

- 5 Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of the active compounds in water-soluble form. Additionally, suspensions of the active compounds may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes.
- 10 Aqueous injection suspensions may contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.
- 15 Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained by combining the active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are, in particular, fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; cellulose preparations such
- 20 as, for example, maize starch, wheat starch, rice starch, potato starch, gelatin, gum tragacanth, methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium carboxymethylcellulose, and/or polyvinylpyrrolidone (PVP). If desired, disintegrating agents may be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, or alginic acid or a salt thereof such as sodium alginate.

25
KITS

- The present invention further provides kits for detecting MAPKAP-2 kinases and its attendant kinase activity. Such kits may be designed for detecting the
- 30 level of a MAPKAP-2 kinase or polynucleotide, or may detect phosphorylation of its native or artificial substrate, e.g., Hsp-27 in a direct kinase assay or a coupled kinase assay, in which the level of phosphorylation and/or the kinase activity of MAPKAP-2 may be determined.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

MAPKAP-2 kinase(s) and its attending kinase activity may be detected in any of a variety of samples, such as eukaryotic cells, bacteria, viruses, extracts prepared from such organisms and fluids found within living organisms. In general, the kits of the present invention comprise one or more containers enclosing elements, such as reagents or buffers, to be used in the assay.

A kit for detecting the level of MAPKAP-2 kinase or polynucleotide typically contains a reagent that binds to at least one member of the MAPK family and/or MAPKAP-2 kinase, DNA or RNA. To detect nucleic acid encoding a MAPKAP-2 kinase, the reagent may be a nucleic acid probe or a PCR primer. In a preferred embodiment, the kit further comprises other containers comprising one or more of the following: wash reagents and reagents capable of detecting the presence of bound nucleic acid probe. Examples of detection reagents include, but are not limited to radiolabeled probes, enzymatic labeled probes (horse radish peroxidase, alkaline phosphatase), and affinity labeled probes (biotin, avidin, or streptavidin).

To detect a MAPKAP-2 kinase, the reagent is typically an antibody. A kit useful for detecting the presence of MAPKAP-2 kinase in a sample comprises at least one container means having disposed therein the above-described reagent. The kit also contains a reporter group suitable for direct or indirect detection of the reagent (i.e., the reporter group may be covalently bound to the reagent or may be bound to a second molecule, such as Protein A, Protein G, immunoglobulin or lectin, which is itself capable of binding to the reagent). Suitable reporter groups include, but are not limited to, enzymes (e.g., horseradish peroxidase), substrates, cofactors, inhibitors, dyes, radionuclides, luminescent groups, fluorescent groups and biotin. Such reporter groups may be used to directly or indirectly detect binding of the reagent to a sample component using standard methods known to those of ordinary skill in the art.

In detail, a compartmentalized kit includes any kit in which reagents are contained in separate containers. Such containers include small glass containers, plastic containers or strips of plastic or paper. Such containers allow the efficient transfer of reagents from one compartment to another compartment such that the samples and reagents are not cross-contaminated and the agents or solutions of each container can be added in a quantitative fashion from one compartment to another. Such containers will include a container which will accept the test sample, a container which contains the probe or primers used in the assay, containers which contain wash reagents (such as phosphate buffered saline, Tris-buffers, and the like), and containers

WO 02/090524

PCT/US02/05670

which contain the reagents used to detect the hybridized probe, bound antibody, amplified product, or the like. Kits containing antibodies to MAPKAP-2, preferably monospecific antibodies such as monoclonal antibodies, or compositions of the NBP may also be provided, usually in lyophilized form in a container, either segregated or
 5 in conjunction with additional reagents, such as anti-antibodies, labels, etc.

A kit for detecting MAPKAP-2 kinase activity based on measuring the phosphorylation of Hsp-27 generally comprises Hsp-27 or its equivalent in combination with a suitable buffer. A kit for detecting MAPKAP-2 kinase activity based on detecting Hsp-27 activity generally comprises MAPKAP-2 in combination
 10 with a suitable MAPKAP-2 substrate, such as Hsp-27. Optionally, the kit may additionally comprise a suitable buffer and/or material for purification of MAPKAP-2 activation and before combination with substrate. Such kits may be employed in direct or coupled kinase assays, which may be performed as described above.

Thus, in another aspect, the present invention relates to a screening kit
 15 for identifying agonists, antagonists, ligands, binding partners, substrates, enzymes, etc. for the invention polypeptide; or compounds which decrease or enhance the production of such a polypeptide individually or as a complex, which comprises:

- (a) a polypeptide of the present invention;
- 20 (b) a recombinant cell expressing the invention polypeptide;
- (c) a cell membrane expressing the invention polypeptide; or
- (d) an antibody to the invention polypeptide; wherein the invention polypeptide is that of SEQ ID NO:2.

25 It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component.

One skilled in the art will readily recognize that the nucleic acid probes described in the present invention can readily be incorporated into one of the established kit formats which are well known in the art.

30 This invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as limiting. The contents of all references, patents and published patent applications cited throughout this application are incorporated herein by reference.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

EXAMPLE I

I. Cloning of invention cDNA polynucleotide sequences

- (i) Full length MAPKAP-2 encoding cDNA sequence (SEQ ID NO: 3):
- 5 Full length MAPKAP-2 cDNA spanning nucleotides 1-1200 was generated by ligation of three EST clones. These EST clones were: 343563 (gb:w69432); 610307 (gb:aa171519); and AI478890. A DNA piece representing the combined 342563 and 610307 pieces was sub-cloned into pThioHis vector and PCR amplified using the following oligonucleotides: 5' ATA GTT TTA GCGGCCGC TCA GTG GGC CAG
- 10 AGC CGC 3'(SEQ ID NO: 5); and 5' GCT CCA GAA GTG CTG GGT CCA GAC 3' (SEQ ID NO: 6). PCR conditions were those recommended by the Clontech Advantage®-GC 2 PCR kit utilizing 10% (0.5 M) GC Melt buffer and Platinum Hi Fi DNA polymerase(Gibco BRL). This DNA fragment contained a 3' NOT I restriction site for sub-cloning (fragment 1). The AI478890 EST DNA piece was PCR amplified
- 15 utilizing the same conditions described above utilizing the following two oligonucleotides: 5' GTG GGA TTC CC ATG TTG TCA AAC TCC CAG GGC 3'(SEQ ID NO: 7) ; and 5' TGG AGT AGA AGG GGG GAT ACC CAC 3'(SEQ ID NO: 8). This fragment contained a 5' BAM HI site for sub-cloning (fragment 2). The individual EST fragments were ligated into the TOPO TA vector using the rapid
- 20 ligation kit method (Roche). Clones were miniprep purified using a Qiaspin Miniprep protocol (Qiagen). DNA fragments were isolated from the TA vector by restriction digest with AFL III and NOT I for fragment 1, and AFL III and BAM HI for fragment 2. Restricted inserts were gel purified using a Qiaspin Miniprep protocol (Qiagen). The inserts were ligated into pGEX 5X-1 (Pharmacia) that had been restricted with
- 25 BAM HI and NOT I using the Roche rapid ligation method. Chemically competent *E. coli* 1-shot TOPO 10 cells were transformed and the resulting clones were miniprep purified as described above. Clones were checked by restriction digest to confirm release of a 1200bp MAPKAP-2 DNA fragment and further confirmed by automated DNA sequencing on the ABI 393 XL with Taq FS Big Dye terminator Kit (Applied
- 30 Biosystems). DNA sequencing of the above referenced 1200 bp MAPKAP-2 fragment is outlined in SEQ ID NO. 3 and its deduced amino acid sequence is outlined in SEQ 4. The cDNA sequence corresponding to the full length MAPKAP-2

WO 02/090524

PCT/US02/05670

encoding gene differs from the prior art MAPKAP-2 gene in at least the following respects:

DNA sequence comparison between the full length clone (SEQ ID NO: 3) and the prior art clone (clone with accession number X75346) revealed the following amino acid differences encoded by the respective DNA sequences: D117H; L247W; and V248S. Alignment of nine EST DNA fragments for MAPKAP-2 showed that these changes were conserved in all ESTs as well as other species such as mouse, hamster, rabbit, and *drosophila*.

The full length clone of the invention encoded 4 additional amino acids at the N terminus that were missing from the prior art clone.

(ii) Truncated MAPKAP-2 encoding cDNA sequence (SEQ ID NO: 1): Truncated MAPKAP2 was PCR amplified using the full length MAPKAP2 cDNA described above as template and the following two oligonucleotides: 5' CAGTCGGATCCCCTCCCAGGGCCAGAGCCCGC 3' (SEQ ID NO: 9) and 5' TAGCGCGGCCGCTCAGTGGGCCAGAGCCGCAGCCT 3' (SEQ ID NO: 10). PCR conditions were those recommended by the Clontech Advantage®-GC 2 PCR kit utilizing 10% (0.5 M) GC Melt buffer and Platinum Hi Fi DNA polymerase (Gibco BRL). The insert was ligated into pGEX 5X-1 (Pharmacia) that had been restricted with BAM HI and NOT I using the Roche rapid ligation method. Chemically competent *E. coli* 1-shot TOPO 10 cells were transformed and the resulting clones were miniprep purified as described above. Clones were checked by restriction digest to confirm release of a 1188bp truncated MAPKAP-2 DNA fragment and further confirmed by automated DNA sequencing on the ABI 393 XL with Taq FS Big Dye terminator Kit (Applied Biosystems).

DNA sequence comparison between the truncated MAPKAP_2 encoding clone (SEQ ID NO: 1) and the prior art clone (clone with accession number X75346) revealed the following amino acid differences encoded by the respective DNA sequences: D117H; L247W; and V248S. Alignment of nine EST DNA fragments for MAPKAP-2 showed that these changes were conserved in all ESTs as well as other species such as mouse, hamster, rabbit, and *drosophila*.

Expression of full length MAPKAP2 clone in *Sf-9*/baculovirus

WO 02/090524

PCT/US02/05670

MAPKAP-2 was sub-cloned in to pAcG3X (BD-Pharmingen) and expressed as a GST-fusion in *Sf-9*/baculovirus under the following conditions: 400 mL of 1.5×10^6 *Sf-9* cells/mL were infected at an moi = 1 by adding 4.4 mL of a MAPKAP2 viral stock (titer 8.5×10^7 pfu/mL). Cells were grown for 48 hours at 26°C and activated by heat shock at 42°C for 30 minutes in the presence of 2 mM Na₃VO₄, and 50 ng/mL Okadaic Acid. Cells were harvested by centrifugation at 1500 rpm for 10 minutes. Cell pellets were frozen at -20°C and lysed in 100 mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM Na₃VO₄, 50 ng/mL Okadaic Acid, and Sigma Protease cocktail. The protein was purified by binding the supernatant to Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia). The column was washed with 5 column volumes of column buffer and eluted with column buffer plus 20 mM Glutathione (Sigma). Column buffer for purification and elution 50mM Tris pH 8.0, 0.5M NaCl, 1mM DTT, 10% glycerol.

15 Expression of truncated MAPKAP2 clone in *Sf-9*/baculovirus

Truncated MAPKAP-2 was sub-cloned in to pAcG3X (BD-Pharmingen) and expressed as a GST-fusion in *Sf-9*/baculovirus under the following conditions: 400 mL of 1.5×10^6 *Sf-9* cells/mL were infected at an moi = 1 by adding 2.6 mL of a truncated MAPKAP2 viral stock (titer 1.5×10^8 pfu/mL). Cells were grown for 48 hours at 26°C and activated by heat shock at 42°C for 30 minutes in the presence of 2 mM Na₃VO₄, and 50 ng/mL Okadaic Acid. Cells were harvested by centrifugation at 1500 rpm for 10 minutes. Cell pellets were frozen at -20°C and lysed in 100 mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM Na₃VO₄, 50 ng/mL Okadaic Acid, and Sigma Protease cocktail. The protein was purified by binding the supernatant to Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia). The column was washed with 5 column volumes of column buffer and eluted with column buffer plus 20 mM Glutathione (Sigma). Column buffer for purification and elution 50mM Tris pH 8.0, 0.5M NaCl, 1mM DTT, 10% glycerol.

30

WO 02/090524

PCT/US02/05670

EXAMPLE 2

Mammalian Cell Expression

The polypeptides of the invention can also be expressed in either human embryonic kidney 293 (HEK293) cells or adherent dhfr CHO cells. To maximize protein expression, typically all 5' and 3' untranslated regions (UTRs) are removed from the protein cDNA prior to insertion into a pCDN or pCDNA3 vector. The cells can thereafter be transfected with individual receptor cDNAs by lipofectin and selected in the presence of appropriate amounts of (ca 400 mg/ml) G418.

After a suitable period of time, i.e., about 3 weeks of selection, individual clones are picked and expanded for further analysis. HEK293 or CHO cells transfected with the vector alone serve as negative controls. To isolate cell lines stably expressing the individual receptors, about 24–36 clones are typically selected and analyzed by Northern blot analysis. Receptor mRNAs are generally detectable in about 50% of the G418-resistant clones analyzed.

EXAMPLE 3

Functional Assay in Xenopus Oocytes

Capped RNA transcripts from linearized plasmid templates encoding the MAPKAP-2 cDNAs of the invention may be synthesized *in vitro* with RNA polymerases in accordance with standard procedures. *In vitro* transcripts are suspended in water at a final concentration of 0.2 mg/ml. Ovarian lobes can be removed from adult female toads, stage V defolliculated oocytes are obtained, and RNA transcripts (10 ng/oocyte) are injected in a 50 nl bolus using a microinjection apparatus.

Thereafter, two electrode voltage clamps are used to measure the currents from individual Xenopus oocytes in response to agonist exposure. Recordings are made in Ca²⁺ free Barth's medium at room temperature. The Xenopus system can be used to screen known ligands and tissue/cell extracts for activating ligands.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

EXAMPLE 4

Microphysiometric Assays

Activation of a wide variety of secondary messenger systems results in extrusion of small amounts of acid from a cell. The acid formed is largely as a result of the increased metabolic activity required to fuel the intracellular signaling process. The pH changes in the media surrounding the cell are very small but are detectable by the CYTOSENSOR microphysiometer (Molecular Devices Ltd., Menlo Park, Calif.). The CYTOSENSOR is thus capable of detecting the activation of a receptor which is coupled to an energy utilizing intracellular signaling pathway such as the G-protein coupled receptor of the present invention.

Having described preferred embodiments of the invention with reference to the accompanying drawings, it is to be understood that the invention is not limited to those precise embodiments, and that various changes and modifications may be effected therein by one skilled in the art without departing from the scope or spirit of the invention as defined in the appended claims.

Summary of Sequences

SEQ. ID. NO: 1 is the nucleotide sequence encoding the novel truncated MAPKAP-2 kinase of the invention, comprising 1191 nucleotide bases.

SEQ ID NO: 2 is the deduced amino acid sequence of the gene product of SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO: 3 is the nucleotide sequence encoding the novel full length human MAPKAP-2 kinase of the invention, comprising 1200 nucleotide bases.

SEQ ID NO: 4 is the amino acid sequence of the gene product of SEQ ID NO: 3.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

WHAT IS CLAIMED:

1. An isolated nucleic acid molecule, comprising a sequence of nucleotides that encodes a human mitogen-activated protein kinase activating protein kinase-2 (MAPKAP-2 kinase), wherein the sequence of nucleotides is selected from the group consisting of:
 - a) a sequence of nucleotides that encodes a human MAPKAP-2 kinase and comprises the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO:1;
 - b) a sequence of nucleotides that encodes a human MAPKAP-2 kinase and that hybridizes under conditions of high stringency to the complement of the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO:1; and, if it is DNA, is fully complementary or, if it is RNA, is identical to mRNA native to a human cell;
 - c) a sequence of nucleotides degenerate with the human MAPKAP-2 polypeptide encoding sequence of (a) or (b); and
 - d) a sequence of nucleotides that encode an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2 or the corresponding fragment thereof.
2. An isolated nucleic acid molecule, comprising a coding region that encodes a splice variant of a MAPKAP-2 kinase, wherein the MAPKAP-2 kinase is encoded by a sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 1.
3. The isolated nucleic acid molecule according to claim 1, wherein the isolated nucleic acid molecule is cDNA.
4. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, wherein said nucleic acid molecule comprises the sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 1.
5. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, wherein said nucleic acid molecule comprises a sequence of nucleotides that hybridizes under

WO 02/090524

PCT/US02/05670

stringent wash conditions to the complement of the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO:1.

6. An isolated nucleic acid molecule that encodes a MAPKAP-2 kinase having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2.
7. A substantially pure human MAPKAP-2 kinase encoded by the nucleic acid molecule of claim 1.
8. A substantially pure human MAPKAP-2 kinase encoded by a nucleotide sequence that is a splice variant of a isolated nucleic acid molecule that encodes a MAPKAP-2 kinase comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2.
9. A substantially pure human MAPKAP-2 kinase encoded by a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:1.
10. A substantially pure human MAPKAP-2 kinase encoded by a nucleic acid molecule comprising a sequence of nucleotides that hybridizes under stringent wash conditions to the complement of the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO:1.
11. A substantially pure human MAPKAP-2 kinase comprising a sequence of amino acids as set forth in SEQ ID NO: 2.
12. Suitable host cells transfected or transformed with the nucleic acid molecule of claim 1, wherein the cells are bacterial cells, mammalian cells or amphibian oocytes, and the nucleic acid molecule is heterologous to the cells.
13. A method for detecting MAPKAP-2 messenger RNA in a biological sample comprising the steps of:
 - a) introducing the nucleic acid molecule of claim 1 into a suitable host cell that is suspected of expressing a MAPKAP-2 kinase

WO 02/090524

PCT/US02/05670

- under conditions favoring formation of a complex therebetween; and
- b) detecting presence of said complex as indicative of presence of said MAPKAP-2 kinase in said sample.
- 5
14. A method for identifying DNA sequences encoding a MAPKAP-2 kinase, the method comprising probing a cDNA library or a genomic library with a labeled probe, and recovering from the library those sequences having a significant degree of homology relative to the probe, wherein the probe comprises the
- 10 nucleotide sequence of Claim 1.
15. A method for identifying MAPKAP2 kinase in a sample, comprising:
- 15 a) introducing the nucleic acid molecule of claim 1 into eukaryotic cells; and
- b) detecting second messenger activity in the cells of step (a), wherein the activity is mediated by a polypeptide encoded by the introduced nucleic acid molecule.
- 20 16. A bioassay for identifying a test compound, which modulates the activity of a human MAPKAP-2 kinase, the bioassay comprising:
- a) measuring the second messenger activity of eukaryotic cells transformed with DNA encoding a MAPKAP-2 kinase in the absence of the test compound, thereby obtaining a first
- 25 measurement;
- b) measuring the second messenger activity of eukaryotic cells transformed with DNA encoding the MAPKAP-2 kinase in the presence of the test compound, thereby obtaining a second measurement; and
- 30 c) comparing the first and second measurement and identifying those compounds that result in a difference between the first measurement and the second measurement as a test compound that modulates the activity of the MAPKAP-2 kinase, wherein

WO 02/090524

PCT/US02/05670

the eukaryotic cells express a functional human parathyroid hormone-2 polypeptide.

17. A method for monitoring the effectiveness of treatment with a test compound for a MAPKAP-2 mediated disease state comprising the steps of
 - (i) obtaining a pre-administration sample from a subject suspected of having a dysfunctional MAPKAP-2 mediated disease state prior to administration of the test compound;
 - (ii) detecting a level of expression or activity of a MAPKAP-2 kinase encoding mRNA or genomic DNA in the pre-administration sample to obtain a first measurement;
 - (iii) detecting a level of expression or activity of a MAPKAP-2 kinase encoding mRNA or genomic DNA in a post-administration sample to obtain a second measurement;
 - (iv) comparing the level of expression or activity of the MAPKAP-2 kinase in the first and second measurement; and
 - (v) altering the administration of the compound to the subject accordingly.
18. A method for determining regression, progression or onset of a disease state manifested by a dysfunctional signal transducing MAPKAP-2 kinase, the method comprising the steps of (i) contacting a cDNA or mRNA containing sample from a subject suspected of suffering from said disease state with a nucleic acid hybridization probe comprising a sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 1 under conditions favoring binding of the hybridization probe to the cDNA or mRNA to form a complex therebetween, and (ii) detecting said complex as an indication that said subject is at risk of developing said disease state.
19. A method for determining regression, progression or onset of a pathological disorder characterized by a dysfunctional signal transducing MAPKAP-2 kinase comprising: contacting a sample from a patient with the disorder with a detectable probe that is specific for the gene product of the isolated nucleic acid molecule having a sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 1 under conditions favoring formation of a probe/gene product complex, the presence of

WO 02/090524

PCT/US02/05670

which is indicative of the regression, progression or onset of the pathological disorder in the patient.

20. The method of claim 19, wherein the probe is an antibody.
21. The method of claim 20, wherein the antibody is labeled with a radioactive label or an enzyme.
22. A method of screening test compounds for use as inflammation inhibitors, comprising the steps of:
 - a) contacting a test compound with a MAPKAP-2 kinase encoded by a polynucleotide comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1 and a sequence of nucleotides that encodes a human MAPKAP-2 kinase that hybridizes under conditions of high stringency to the complement of the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO:1; and
 - b) testing the contacted MAPKAP-2 kinase protein for its ability to bind to or phosphorylate Hsp-27, wherein a test compound which inhibits phosphorylation of Hsp-27 by the MAPKAP-2 kinase or which inhibits the binding of the MAPKAP-2 kinase protein to the Hsp-27 is a candidate drug for treatment of inflammation.
23. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide according to claim 7 in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.
24. A method for monitoring the efficacy of an agent in correcting an abnormal level of the polypeptide of claim 7 in a subject prone thereto, comprising administering an effective amount of the agent to the subject and determining a level of the polypeptide in the subject following its administration, wherein a change in the level of the polypeptide towards a normal level is indicative of the efficacy of the agent.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

25. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide that has at least 80 % identity to the amino acid sequence set forth SEQ ID NO:2 over the entire length of SEQ ID NO:2, wherein
- 5 80% identity defines the amino acid alterations allowed for SEQ ID NO:2 which are determined by the equation and is calculated by the formula

$$N_a = X_a - (X_a Y),$$

- 10 wherein N_a is the maximum number of amino acid alterations, X_a is the total number of amino acids in SEQ ID NO:2, and Y has a value of 0.80, wherein any non-integer product of X_a and Y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting such product from X_a .

- 15 26. A method for identifying ligand(s) that activate a MAPKAP-2 kinase, the method comprising:

- (i) contacting endogenous-MAPKAP-2 kinase-deficient host cells with a candidate compound suspected of activating MAPKAP-2 kinase activity wherein the host cells contain a reporter gene functionally linked to a transcriptional control element, and an
- 20 exogenous gene encoding the MAPKAP-2 kinase, wherein the transcriptional control element, upon activation, induces expression of the reporter gene(s);
- (ii) monitoring induction of the reporter gene(s); and
- 25 (iii) identifying ligand(s) that activate the polypeptide.

27. An antibody that is specific for the gene product of the nucleic acid molecule of claim 1.

- 30 28. A recombinant non-human cell line which has been engineered to express a heterologous protein, the cell line comprising a host cell transformed or transfected with a heterologous nucleic acid molecule of claim 1 that inducibly expresses a MAPKAP-2 kinase of SEQ ID NO: 2.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

29. An expression vector comprising the nucleic acid molecule of claim 1, operably linked to a regulatory nucleotide sequence that controls expression of the nucleic acid molecule in a host cell.
- 5 30. A method for detecting a binding partner for a MAPKAP-2 kinase in a sample suspected of containing the binding partner, comprising:
- (i) contacting the sample with the MAPKAP-2 of SEQ ID NO:2 under conditions favoring binding of the MAPKAP-2 kinase to the binding partner;
- 10 (ii) determining presence of the binding partner in the sample by detecting binding of the MAPKAP-2 kinase to the binding partner.
31. A method for identifying a compound which modulates the binding or kinase activity of a kinase polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2; the method comprising:
- 15 a) contacting a cell expressing the polypeptide with a test compound under conditions suitable for modulation of the binding or kinase activity of the polypeptide; and
- 20 b) detecting modulation of the activity of the binding or kinase polypeptide by the test compound.
32. The method according to claim 31, wherein said agent inhibits MAPKAP-2 activity.
- 25 33. The method according to claim 31, wherein said agent stimulates MAPKAP-2 activity.
34. The method according to claim 31, wherein the agent is an antibody that specifically binds to the MAPKAP-2 kinase.
- 30 35. The method according to claim 31, wherein the agent modulates expression of MAPKAP-2 by modulating transcription of a MAPKAP-2 gene or translation of a MAPKAP-2 mRNA.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

36. The method according to claim 31, wherein the agent is a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence that is antisense to the coding strand of a MAPKAP-2 mRNA or a MAPKAP-2 gene.
- 5
37. A method for modulating endogenous signal transducing activity of a MAPKAP-2 kinase in a mammal comprising contacting a cell capable of expressing MAPKAP-2 with the compound of Claim 31.
- 10
38. The method of claim 37, wherein said modulation of the activity of the polypeptide is detected by direct binding of the test compound to the polypeptide.
- 15
39. The method of claim 38, wherein said direct binding is determined by lysing the cell and performing an immunoprecipitation.
40. The method of claim 39, wherein said direct binding is determined by a yeast two-hybrid assay.
- 20
41. The method of claim 40, wherein said modulation of the activity of the polypeptide is detected by use of an assay for MAPKAP-2 kinase activity.
- 25
42. The method of claim 41, wherein said assay for MAPKAP-2 kinase activity is based on the phosphorylation of a MAPKAP-2 substrate.
- 30
43. A method for identifying a compound which modulates the binding or kinase activity of a naturally occurring allelic variant of a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the allelic variant is encoded by a nucleic acid molecule which hybridizes to the complement of a nucleic acid molecule consisting of SEQ ID NO:1 in 6 x SSC at 45°C., followed by one or more washes in 0.2.times.SSC, 0.1% SDS at 50-65°C., the method comprising:

WO 02/090524

PCT/US02/05670

- a) contacting a cell expressing the allelic variant with a test compound under conditions suitable for modulation of the binding or kinase activity of the allelic variant; and
- b) detecting modulation of the binding or kinase activity of the allelic variant by the test compound.
- 5
44. Isolated polypeptide comprising an amino acid sequence provided in SEQ ID NO:2, or a variant thereof that is at least 80% identical to SEQ ID NO:2 and that differs from SEQ ID NO:2 only in one or more amino acid
- 10 substitutions, additions of terminal amino acid residues and/or deletions of terminal amino acid residues, wherein the ability of the variant to phosphorylate Hsp-27 is not substantially diminished.
45. A method of treating a subject having a disorder characterized
- 15 by aberrant MAPKAP-2 kinase or nucleic acid expression or activity comprising administering an agent which is a MAPKAP-2 modulator to the subject.
46. The method according to claim 45 wherein the MAPKAP-2 modulator is a MAPKAP-2 kinase.
- 20
47. The method according to claim 45, wherein the MAPKAP-2 modulator is a MAPKAP-2 nucleic acid molecule.
48. The method according to claim 45, wherein the MAPKAP-2
- 25 modulator is a peptide, peptidomimetic, or other small molecule.
49. The method according to claim 45, wherein the disorder characterized by aberrant MAPKAP-2 protein or nucleic acid expression is an immune related disorder.
- 30
50. A method of phosphorylating a serine-containing substrate which comprises:

WO 02/090524

PCT/US02/05670

- a) incubating the substrate with an effective concentration of ATP and an enzyme having at least 84% homology to SEQ ID NO:1, wherein said enzyme phosphorylates Hsp-27; and
- b) measuring the amount of phosphorylation of the substrate.

5

51. The method of claim 50, which further comprises the steps of forming a mixture of the enzyme and a candidate antagonist or a candidate agonist of the enzyme and measuring the effect of said candidate antagonist or candidate agonist on the amount of phosphorylation on the substrate.

10

52. A method for identifying a reagent that modulates mitogen-activating protein kinase (MAPKAP-2) activity, the method comprising:

- a) obtaining a test sample containing an MAPKAP-2 kinase characterized as having serine, threonine, and tyrosine kinase activity, and a reagent;
- b) incubating the test sample with an MAPKAP-2 substrate and with labeled phosphate under conditions sufficient to allow phosphorylation of the substrate;
- c) determining the rate of incorporation of labeled phosphate into the substrate, wherein the rate of incorporation is a measure of MAPKAP-2 activity; and
- d) comparing the effect of the reagent on MAPKAP-2 activity relative to a control, wherein a change in MAPKAP-2 activity indicates the presence of a reagent able to modulate MAPKAP-2 activity.

15

20

25

53. The method of claim 51, wherein said MAPKAP-2 substrate is one or more of Hsp-25, Hsp-27 and ALT2.

30

54. The method of claim 51, wherein said modulation is inhibition of MAPKAP-2 activity.

55. The method of claim 51, wherein the reagent is selected from the group consisting of an antisense oligonucleotide and a ribozyme.

WO 02/090524

PCT/US02/05670

56. The method of claim 51, wherein the reagent is selected from the group consisting of a tumor necrosis factor and an interleukin-1.

5 57. A method for identifying a reagent that modulates MAPKAP-2 synthesis, the method comprising:

- a) providing a test sample containing an MAPKAP-2 kinase having serine, threonine, and tyrosine kinase activity;
- b) incubating the test sample in the presence of a reagent;
- 10 c) fractionating proteins present in the sample by gel electrophoresis;
- d) transferring the proteins onto a membrane;
- e) probing the proteins with a labeled antibody specific to an MAPKAP-2 kinase, wherein the level of MAPKAP-2 synthesis is determined by the amount of antibody detected; and
- 15 f) comparing the effect of the reagent on MAPKAP-2 synthesis relative to a control, wherein a change in MAPKAP-2 synthesis indicates the presence of a reagent able to modulate MAPKAP-2 synthesis.

20 58. A method for identifying a reagent that modulates MAPKAP-2 expression, the method comprising:

- a) providing a test sample in which an MAPKAP-2 polynucleotide is expressed;
- 25 b) incubating the test sample in the presence of a reagent;
- c) isolating polyadenylated RNA from the test sample;
- d) incubating the polyadenylated RNA with a polynucleotide probe specific for a MAPKAP-2 kinase;
- e) determining the amount of the probe hybridized to the polyadenylated RNA, wherein the level of expression of MAPKAP-2 is directly related to the amount of MAPKAP-2 probe hybridized to the RNA; and
- 30 f) comparing the effect of the reagent on MAPKAP-2 expression relative to a control, wherein a change in MAPKAP-2

WO 02/090524

PCT/US02/05670

expression indicates the presence of a reagent able to modulate MAPKAP-2 expression.

59. The method of claim 58, wherein the reagent is selected from the group consisting of a polynucleotide, a polypeptide, and an antibody.

60. The method of claim 58, wherein the reagent is selected from the group consisting of an antisense oligonucleotide and a ribozyme.

61. A kit useful for the detection of mitogen-activating protein kinase activating protein kinase 2 (MAPKAP-2), said kit comprising a buffer and a labeled antibody which specifically binds to a MAPKAP-2 kinase having serine, threonine, and tyrosine kinase activity, wherein the sample to be tested is mixed with the buffer and the antibody.

62. A kit useful for the detection of mitogen-activating protein kinase activating protein kinase 2 (MAPKAP-2) encoding nucleic acid, said kit comprising a buffer and nucleic acid molecule comprising at least about 20 nucleotides capable of hybridizing to a nucleic acid sequence encoding MAPKAP-2 or a complement thereof under stringent hybridization conditions, and instructions for use thereof.

63. An isolated nucleic acid molecule, comprising a sequence of nucleotides that encodes a human mitogen-activated protein kinase activating protein kinase-2 (MAPKAP-2 kinase), wherein the sequence of nucleotides is selected from the group consisting of:

- (a) a sequence of nucleotides that encodes a human MAPKAP-2 kinase and comprises the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO:3;
- (b) a sequence of nucleotides that encodes a human MAPKAP-2 kinase and that hybridizes under conditions of high stringency to the complement of the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO:3; and, if it is DNA, is fully complementary or, if it is RNA, is identical to mRNA native to a human cell;

WO 02/090524

PCT/US02/05670

- (c) a sequence of nucleotides degenerate with the human
MAPKAP-2 polypeptide encoding sequence of (a) or (b);
(d) a sequence of nucleotides that encode an amino acid sequence
as set forth in SEQ ID NO: 4 or the corresponding fragment
thereof.

5

64. An isolated nucleic acid molecule, comprising a coding region
that encodes a splice variant of a MAPKAP-2 kinase, wherein the MAPKAP-2 kinase
is encoded by a sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 3.

10

65. An isolated nucleic acid molecule that encodes a MAPKAP-2
kinase having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:4.

66. A substantially pure MAPKAP-2 kinase encoded by a
nucleotide sequence that is a splice variant of a isolated nucleic acid molecule that
encodes a MAPKAP-2 kinase comprising the amino acid sequence set forth in SEQ
ID NO:4.

15

67. Suitable host cells transfected or transformed with the nucleic
acid molecule of claim 62, wherein the cells are bacterial cells, mammalian cells or
amphibian oocytes, and the nucleic acid molecule is heterologous to the cells.

20

68. A substantially pure MAPKAP-2 kinase encoded by the
nucleic acid molecule of claim 63.

25

69. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide
sequence having at least 80 % identity to a nucleotide sequence encoding a
polypeptide comprising the amino acid sequence set forth SEQ ID NO:2 , which may
include up to N_a nucleic acid alterations over the entire length of SEQ ID NO: 1,
wherein N_a represents the maximum number of such alterations and is calculated by
the formula

30

$$N_a = X_a - (X_a - Y).$$

WO 02/090524

PCT/US02/05670

In which X_a is the total number of nucleotides in SEQ ID NO:1, and Y has a value of 0.80, wherein any non-integer product of X_a and Y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting such product from X_a , wherein said polypeptide has MAPKAp-2 activity.

5

WO 02/090524

1/4

PCT/US02/05670

cdnaMAPKAP2
1 tcccagggcc agagcccgcc ggtgccgttc cccgccccgg ccccgccgcc gcagc
cccc
61 acccctgccc tgcgcaccc cccggcgag cgcgcgcgc gcgcccgca gcagt
tcccg
121 cagttccacg tcaagtccgg cctgcagatc aagaagaacg ccatcatcga tgact
acaag
181 gtcaccagcc aggtcctggg gctgggcac aacggcaaa ttttgagat ctta
acaag
241 aggacccagg agaaattgc ctcaaaatg cttcaggact gccccaaggc ccgca
gggag
301 gtggagctgc actggcgggc ctcacagtgc ccgcacatcg tacggatcgt ggatg
tgtac
361 gagaatctgt acgcaggagg gaagtgcctg ctgattgtca tggaatgttt ggacg
gtgga
421 gaactcttta gccgaatcca ggatcgagga gaccaggcat tcacagaaag agaag
catcc
481 gaaatcatga agagcatcgg tgaggccatc cagtatctgc attcaatcaa cattg
cccat
541 cgggatgtca agcctgagaa tctcttatac acctccaaa ggcccaacgc catcc
tgaaa
601 ctactgact ttggtttgc caaggaaacc accagccaca actctttgac caetc
cttgt
661 tataccctgt actatgtggc tccagaagtg ctgggtccag agaagtatga caagt
cctgt
721 gacatgtggt ccttgggtgt catcatgtac atcctgtgt gtgggtatcc cccct
tctac
781 tccaaccacg gccttgccat ctctcgggc atgaagactc gcacccgaat gggcc
agtat
841 gaatttccca acccagaatg gtcagaagta tcagaggaag tgaagatgct cattc
ggaa
901 ctgctgaaaa cagagccac ccagagaatg accatcacg agtttatgaa ccacc
cttgg
961 atcatgcaat caacaaagg cctcaaacc cactgcaca ccagccgggt cctga
aggag
1021 gacaaggagc ggtgggagga tgtcaaggag gagatgacca gtgccttggc caca
tgcc
1081 gttgactacg agcagatcaa gataaaaaag attgaagatg catccaccc tctgc
tgctg
1141 aagaggcgga agaaagctcg ggcctggag gctgcggctc tggccactg a

WO 02/090524

2/4

PCT/US02/05670

taaMAPKAP2
1 SQGQSPPVVF PAPAPPPQP TFALPHPPAQ PPPPPQQFP QFHVKSGLQI KKNAI
IDDYK
61 VTSQVLGLGI NGKVLQIFNK RTQKXFALKM LQDCPKARRE VELHWRASQC PHIVR
IVDVY
121 ENLYAGRKCL LIVMECLDGG ELFSRIQDRG DQAFTEREAS EIMKSIGELI QYLHS
INTAH
181 RDVKPENLLY TSKRFNAILK LTDFGFAKET TSHNSLTTPC YTPYYVAPEV LGPEK
YDKSC
241 DMWSLGVIMY ILLCGYPPFY SNHGLAISPQ MKTRIRMGQY EFPNPEWSEV SEEVK
MLIRN
301 LLKTEPTQRM TITEFMNHPW IMQSTKVPQT PLHTSRVLKE DKERWEDVKE EMTSA
LATMR
361 VDYEQIKIKK IEDASNPLLL KRRKKARALE AAALAH*

WO 02/090524

3/4

PCT/US02/05670

fldnaMAPKAP2
1 atgctgtcca actcccaggg ccagagcccg ccggtgccgt tcccccccc ggccc
cgccg 61 ccgcagcccc ccacccctgc cctgccgcac cccccggcgc agccgcggcc gccgc
ccccg 121 cagcagttcc cgcagttcca cgtcaagtcc ggcttcgaga tcaagaagaa cgcca
tcac 181 gatgactaca aggtcaccag ccaggtcccg gggctgggca tcaacggcaa agttt
tgacg 241 atcttcaaca agaggaccca ggagaaatcc gccctcaaaa tgcttcagga ctgcc
ccaag 301 gcccgagggg aggtggagct gcactggggg gctccagc gcccgcacat cgtac
ggatc 361 gtggatgtgt acgagaatct gtacgcaggg aggaagtgcc tctgattgt catgg
aatgt 421 ttggacgggtg gagaactctt tagccgaatc caggatcgag gagaccagga attca
cagaa 481 agagaagcat ccgaatcat gaagagcatc ggtgaggcca tccagtatct gcatt
caatc 541 aacattgccc atcgggatgt caagcctcgag aatctcttat acacctccaa aaggc
ccaac 601 gccatcctga aactcactga ctttggcttt gcccaaggaaa ccaccagcca caact
ctttg 661 accactcctt gtatataacc gtactatgtg gctccagaag tgcctgggtcc agaga
agtat 721 gacaagtccct gtgacatgtg gtccctgggt gtcacatgt acatcctgct gtgtg
ggtat 781 cccccctctc actccaacca cggccttgcc atctctccgg gcattgaagac tcgca
tcoga 841 atgggcagct atgaatttcc caaccagaa tggtcagaag tatcagagga agtga
agatg 901 ctcatcggga atctgctgaa aacagagccc accagagaa tgaccatcac cagat
ttatg 961 aaccacccctt ggatcatgca atcaacaaaag gtccctcaaa ccccaactgca cacca
gccgg 1021 gtctgaagg aggaacaagga gccgtgggag gatgtcaagg aggagatgac cagtg
ccttg 1081 gccacaatgc gcgttgacta cgagcagatc aagataaaaa agattgaaga tgcac
ccaac 1141 cctctgctgc tgaagaggcg gaagaaagct cgggccccgg aggctggggc tctgg
cccac 1201 tga

SEQ ID NO. 3

WO 02/090524

4/4

PCT/US02/05670

f1aaMAPKA22
1 MLSNSQGGSP PVFFPAPAPF PQPPTPALPH PPAQPPPPPP QFPQFHVKS GLQIK
KNALII 61 DDYKVTSQL GLGINGKVLQ IFNKRTQEKF ALKMLQDCPK ARREVELHWR ASQCP
HIVRI 121 VDYYENLYAG RKCLLIWEC LDGGELEPSRI QDRGDQAFTE REASEIMKSI GEAIQ
YLHSI 181 NIAHRDVKPE NLLYTSKRPN AILKLTDFGF AKETTSNLSL TTPCYTPYYV APEVL
GPEKY 241 DKSCDMWSLG VIMYILLCGY PFFYSNHGLA ISPGMKTRIR MQQYEFNPPE WSEVS
EEVKM 301 LIRNLLKTEP TQRXTITEFM NHPWIMQSTK VFQTEPLHTR VLKEDKERWE DVKEE
MTSAL 361 ATMVRDYEQI KIKKIEDASN PLLLKRRKKA RALEAALAH *

Seq ID No: 4

WO 02/090524

PCT/US02/05670

SEQUENCE LISTING

<110> MERCK & CO., INC.

<120> ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING
A NOVEL HUMAN SIGNAL TRANSDUCING KINASE - MAPKAP-2; ENCODING
PROTEINS, CELLS TRANSFORMED THEREWITH AND USES THEREOF

<130> 20813-PCT

<140> To Be Assigned

<141> 2002-02-25

<150> 60/272,260

<151> 2001-02-28

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1191

<212> DNA

<213> Human

```

<400> 1
tcccagggcc agagcccgcc ggtgccgttc cccgccccgg ccccgccgcc gcagcccccc 60
accctcgccc tgcgcgaccc cccggcgag ccgcccgcgc ccccccgca gcagttcccg 120
cagttccacg tcaagtccgg cctgcagatc aagaagaacg ccatcatcga tgactacaag 180
gtcaaccgccc aggtcctggg gctggggatc aacggcaag ttttgagat cttaacaaag 240
aggaccacgg agaaattcgc ctcacaaatg cttcaggact gccccaggc ccgcagggag 300
gtggagctgc actggcgggc ctcccagtcg ccgcacatcg tacggatctt ggatgtgtac 360
ggaatctctg acccagggag gaagtgcctg ctgattgtca tggaatgttt ggacggtgga 420
gaactcttta gccgaatcca ggaatgcagg gaccaggcat tcacagaaag agaagcatcc 480
gaaatcatga agagcatcgg tgaggccatc cagtatctgc attcaatcaa cattgcccat 540
cgggatgtca agcctgagaa tctcttatac acctocaaaa ggcacacgc catcctgaaa 600
ctcaactgact ttgcttttgc caaggaaccc accagccaca actctttgac cactccttgt 660
tatacacggt actatgtggc tcagaaatg ctgggtccag agaagtatga caagtcctgt 720
gactgtgtgt cctgtgggtg ctcacatgac atcctgctgt ggggttatcc cccctctac 780
tccaaccccg gccctgccat ctctccgggc atgaagactc gcatccgaat gggccagtat 840
gaatttccca acccagaatg gtccagaagta tcagaggaaag tgaagatgct cattcggaat 900
ctgctgaaaa cagagccccc ccagagaatg accatcaccc agtttatgaa ccacccttgg 960
atcatgcaat caacaaaggt cctcannacc ccactgcaca ccagccgggt cctgaaggag 1020
gacaaggagc ggtgggagga tgtcaaggag gagatgacca gtgccttggc cacaatgcgc 1080
gttgactacg agcagatcaa gataaaaaag attgaagatg catccaacc tctgctgctg 1140
aagaggcgga agaaagctcg ggcctggag gctgcggctc tggccactg a 1191

```

<210> 2

<211> 396

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

```

Ser Gln Gly Gln Ser Pro Pro Val Pro Phe Pro Ala Pro Ala Pro Pro
1           5           10           15
Pro Gln Pro Pro Thr Pro Ala Leu Pro His Pro Pro Ala Gln Pro Pro
20          25          30
Pro Pro Pro Pro Gln Gln Phe Pro Gln Phe His Val Lys Ser Gly Leu
35          40          45

```

WO 02/090524

PCT/US02/05670

Gln Ile Lys Lys Asn Ala Ile Ile Asp Asp Tyr Lys Val Thr Ser Gln
 50 55 60
 Val Leu Gly Leu Gly Ile Asn Gly Lys Val Leu Gln Ile Phe Asn Lys
 65 70 75 80
 Arg Thr Gln Glu Lys Phe Ala Leu Lys Met Leu Gln Asp Cys Pro Lys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Glu Val Glu Leu His Trp Arg Ala Ser Gln Cys Pro His
 100 105 110
 Ile Val Arg Ile Val Asp Val Tyr Glu Asn Leu Tyr Ala Gly Arg Lys
 115 120 125
 Cys Leu Leu Ile Val Met Glu Cys Leu Asp Gly Gly Glu Leu Phe Ser
 130 135 140
 Arg Ile Gln Asp Arg Gly Asp Gln Ala Phe Thr Glu Arg Glu Ala Ser
 145 150 155 160
 Glu Ile Met Lys Ser Ile Gly Glu Ala Ile Gln Tyr Leu His Ser Ile
 165 170 175
 Asn Ile Ala His Arg Asp Val Lys Pro Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Ser
 180 185 190
 Lys Arg Pro Asn Ala Ile Leu Lys Leu Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys
 195 200 205
 Glu Thr Thr Ser His Asn Ser Leu Thr Thr Pro Cys Tyr Thr Pro Tyr
 210 215 220
 Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Gly Pro Glu Lys Tyr Asp Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Met Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Tyr
 245 250 255
 Pro Pro Phe Tyr Ser Asn His Gly Leu Ala Ile Ser Pro Gly Met Lys
 260 265 270
 Thr Arg Ile Arg Met Gly Gln Tyr Glu Phe Pro Asn Pro Glu Trp Ser
 275 280 285
 Glu Val Ser Glu Glu Val Lys Met Leu Ile Arg Asn Leu Leu Lys Thr
 290 295 300
 Glu Pro Thr Gln Arg Met Thr Ile Thr Glu Phe Met Asn His Pro Trp
 305 310 315 320
 Ile Met Gln Ser Thr Lys Val Pro Gln Thr Pro Leu His Thr Ser Arg
 325 330 335
 Val Leu Lys Glu Asp Lys Glu Arg Trp Glu Asp Val Lys Glu Glu Met
 340 345 350
 Thr Ser Ala Leu Ala Thr Met Arg Val Asp Tyr Glu Gln Ile Lys Ile
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Asp Ala Ser Asn Pro Leu Leu Lys Arg Arg Lys
 370 375 380
 Lys Ala Arg Ala Leu Glu Ala Ala Ala Leu Ala His
 385 390 395

<210> 3
 <211> 1203
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 3
 atgctgtcca actccaggcg ccagagcccg ccggtgccgt tccccgcccc ggccccgccg 60
 ccgcagcccc ccaccctgc cctgcgcgac ccccgccgc agccgcgcgc gccgccccgc 120
 cagcagttcc cgcagttcca cgtcaagtc gccctgcaga tcaagaagaa cgcctatc 180
 gatgactaca aggtcacccag ccaggtccctg ggctgggca tcaacggcaa agttttgaa 240
 atctcaaca agaggaccga ggagaattc gccctcaaaa tgcctcagga ctgccccaa 300
 gccgcaggg aggtggagct gcactggcgg gctccaccgt gccgcacat cgtacggatc 360
 gtggatgtgt acgagaatct gtacgcaggg aggaagtgc tgcgtattgt catggaatgt 420
 ttggacgggt gagaaactct tagccgaatc caggatcgag gagaccaggc attcacagaa 480
 agagaagcat ccgaaatcat gaagagcatc ggtgaggcca tccagtatct gcattcaatc 540
 aacattgcc atcgggatgt caagcctgag aatctcttat acacctccaa aaggcccaac 600
 gccatctcga aactcactga ctttggcttt gccaaaggaa ccaccagcca caactctttg 660

WO 02/090524

PCT/US02/05670

```

accacacccctt gttatacacc gtactatgtg gctccagaag tgctgggtcc agagaagtat 720
gacaagtcctct gtgacatgtg gtccctgggt gtcacatgtt acatcctgct gtgtgggtat 780
ccccctctct aetccaacca cggctctggc atctctccgg gcatgaagac tgcacccga 840
atgggccaagt atgaatttcc caaccagaa tggtcagaag tatcagaga agtgaagtg 900
ctcatcgga atctgctgaa aacagagccc acccagagaa tgaccatcac cgagtttatg 960
aaccacccctt agatcatgca atcaacaag gtccctcaaa cccactgca caccagccgg 1020
gtcctgaagg aggacaagga gcggtgggag gatgtcaagg aggagatgac cagtgccttg 1080
gccacaatgc gcgttgacta cgagcagatc aagataaaa agattgaaga tgcacccaac 1140
cctctgtctgc tgaagaggcg gaagaagctc cgggcccctg aggtctcgcc tctggcccac 1200
tga 1203

```

<210> 4
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Human

```

<400> 4
Met Leu Ser Asn Ser Gln Gly Gln Ser Pro Pro Val Pro Phe Pro Ala
1 5 10 15
Pro Ala Pro Pro Pro Gln Pro Pro Thr Pro Ala Leu Pro His Pro Pro
20 25 30
Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Phe Pro Gln Phe His Val
35 40 45
Lys Ser Gly Leu Gln Ile Lys Lys Asn Ala Ile Ile Asp Asp Tyr Lys
50 55 60
Val Thr Ser Gln Val Leu Gly Leu Gly Ile Asn Gly Lys Val Leu Gln
65 70 75
Ile Phe Asn Lys Arg Thr Gln Glu Lys Phe Ala Leu Lys Met Leu Gln
85 90 95
Asp Cys Pro Lys Ala Arg Arg Glu Val Glu Leu His Trp Arg Ala Ser
100 105 110
Gln Cys Pro His Ile Val Arg Ile Val Asp Val Tyr Glu Asn Leu Tyr
115 120 125
Ala Gly Arg Lys Cys Leu Leu Ile Val Met Glu Cys Leu Asp Gly Gly
130 135 140
Glu Leu Phe Ser Arg Ile Gln Asp Arg Gly Asp Gln Ala Phe Thr Glu
145 150 155
Arg Glu Ala Ser Glu Ile Met Lys Ser Ile Gly Glu Ala Ile Gln Tyr
160 165 170
Leu His Ser Ile Asn Ile Ala His Arg Asp Val Lys Pro Glu Asn Leu
175 180 185
Leu Tyr Thr Ser Lys Arg Pro Asn Ala Ile Leu Lys Leu Thr Asp Phe
190 195 200
Gly Phe Ala Lys Glu Thr Thr Ser His Asn Ser Leu Thr Thr Pro Cys
205 210 215
Tyr Thr Pro Tyr Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Gly Pro Glu Lys Tyr
220 225 230
Asp Lys Ser Cys Asp Met Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Ile Leu
235 240 245
Leu Cys Gly Tyr Pro Pro Phe Tyr Ser Asn His Gly Leu Ala Ile Ser
250 255 260
Pro Gly Met Lys Thr Arg Ile Arg Met Gly Gln Tyr Glu Phe Pro Asn
265 270 275
Pro Glu Trp Ser Glu Val Ser Glu Glu Val Lys Met Leu Ile Arg Asn
280 285 290
Leu Leu Lys Thr Glu Pro Thr Gln Arg Met Thr Ile Thr Glu Phe Met
295 300 305
Asn His Pro Trp Ile Met Gln Ser Thr Lys Val Pro Gln Thr Pro Leu
310 315 320
His Thr Ser Arg Val Leu Lys Glu Asp Lys Glu Arg Trp Glu Asp Val
325 330 335
Lys Glu Glu Met Thr Ser Ala Leu Ala Thr Met Arg Val Asp Tyr Glu
340 345 350

```

WO 02/090524

PCT/US02/05670

		355				360				365				
Gln	Ile	Lys	Ile	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Ala	Ser	Asn	Pro	Leu	Leu
370						375					380			
Lys	Arg	Arg	Lys	Lys	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala
385					390				395					400

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/090524 A3

- (51) International Patent Classification: C07H 21/04, 21/02, C12N 9/12, 15/00, 5/00, 1/20, C07K 1/00, A61K 38/51, C12Q 1/68 0907 (US). HAWKINS, Julio [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US). LISNOCK, Jean Marie [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/05670
- (22) International Filing Date: 25 February 2002 (25.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/272,260 28 February 2001 (28.02.2001) US
- (74) Common Representative: MERCK & CO., INC.; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (81) Designated States (national): CA, JP, US.
- (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- Published: — with international search report
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK & CO., INC. [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (88) Date of publication of the international search report: 8 May 2003
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): LOGRASSO, Philip [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/090524 A3

(54) Title: ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A NOVEL HUMAN SIGNAL TRANSDUCING KINASE-
MAPKAP-2; ENCODED PROTEINS, CELLS TRANSFORMED THEREWITH AND USES THEREOF(57) Abstract: Disclosed herein are two newly identified enzymes - mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2, each comprising a sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NOs: 1 and 3. Each of the herein disclosed enzymes is a serine/threonine signal transduction kinase that is phosphorylated and activated by Ltrks and p38 MAPK *in vitro*. Also disclosed, *inter alia*, are cells containing the recombinant nucleic acid molecules; antisense constructs thereto; antibodies specific for each of the disclosed proteins; methods for using the novel nucleic acid molecules and their gene products including kits containing the same.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/05670																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/04, 21/02; C12N 9/12, 15/00, 5/00, 1/20; C07K 1/00; A61K 38/51; C12Q 1/68 US CL : 435/6, 194, 252.3, 325, 320.1; 536/23.2, 23.1; 424/94.5; 530/350 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) U.S. : 435/6, 194, 252.3, 325, 320.1; 536/23.2, 23.1; 424/94.5; 530/350 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 practicable, search terms used) MEDLINE EMBASE BIOSIS BIOTECHDS SCISEARCH HCAPLUS NTIS LIFESCI BRS/EAST																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>STOKOE et al. The substrate specificity and structure of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-2. Biochem. J., December 1993, Vol.296, pages 843-849, see the entire article.</td> <td>1, 5-14, 23, 25, 29, 44, 63, 66, 68-69 62, 67, 28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>ZU et al., The primary structure of a human MAP kinase activated protein kinase 2. Biochem. Biophys. Res. Commun., April 1994, Vol.200, No.2, Pages 1118-1124, see the entire article.</td> <td>1, 5-14, 23, 25, 28-29, 44, 63, 64-66, 68, 69 62, 67</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	STOKOE et al. The substrate specificity and structure of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-2. Biochem. J., December 1993, Vol.296, pages 843-849, see the entire article.	1, 5-14, 23, 25, 29, 44, 63, 66, 68-69 62, 67, 28	Y			X	ZU et al., The primary structure of a human MAP kinase activated protein kinase 2. Biochem. Biophys. Res. Commun., April 1994, Vol.200, No.2, Pages 1118-1124, see the entire article.	1, 5-14, 23, 25, 28-29, 44, 63, 64-66, 68, 69 62, 67	---			Y		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	STOKOE et al. The substrate specificity and structure of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-2. Biochem. J., December 1993, Vol.296, pages 843-849, see the entire article.	1, 5-14, 23, 25, 29, 44, 63, 66, 68-69 62, 67, 28																		
Y																				
X	ZU et al., The primary structure of a human MAP kinase activated protein kinase 2. Biochem. Biophys. Res. Commun., April 1994, Vol.200, No.2, Pages 1118-1124, see the entire article.	1, 5-14, 23, 25, 28-29, 44, 63, 64-66, 68, 69 62, 67																		

Y																				
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th>* Special categories of cited documents:</th> <th>*X</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			* Special categories of cited documents:	*X	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	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	"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	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)	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	document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed							
* Special categories of cited documents:	*X																			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	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																			
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	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)	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	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 13 January 2003 (13.01.2003)		Date of mailing of the international search report 04 FEB 2003																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Maryam Monstapour Telephone No. 703 308-0196																		

Form: PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/05670
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☐	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	☐	Claim 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: Please See Continuation 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.: 1-14, 23, 25, 28-29, 62-69
Remark on Protest	☐	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	☐	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/05670

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-14, 23, 25, 28-29, 44, 62-69, drawn to isolated DNA molecules encoding MAPKAP-2 kinase, vectors and host cells comprising said DNA molecules, methods of use of said DNA molecules, and the expression product of said DNA molecules.

Group II, claim 15, drawn to a Northern blot using said DNA molecules.

Group III, claim(s) 17-18, drawn to methods of monitoring a disease or effectiveness of treatment using mRNA.

Group IV, claim(s) 19-21, drawn to methods of determining regression of a disease using said kinase.

Group V, claims 27, 61 and 30, drawn to antibodies which bind said kinase and methods of use of said antibodies.

Group VI, claims 37-42, drawn to methods of modulating the activity of said kinase.

Group VII, claims 16, 22, 26, 31-36, 43, and 52-56, drawn to methods of screening for modulators of said kinase.

Group VIII, claims 50-51, drawn to methods of assaying said kinase.

Group IX, claims 24, and 45-49, drawn to methods of treatment using modulators of said kinases.

Group X, claims 57-60, drawn to methods of modulating synthesis levels of MAPKAP-2 using said DNA molecules. The inventions listed as Groups I-X do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of inventions I, IV-V, and VII are DNA, polypeptide, antibody, and modulators, respectively, which are each directed to products of unrelated chemical structure and function. Inventions I, II, III and X share a common technical feature but said inventions are not required to be rejoined under PCT Rule 13.1, because the invention of Group I already has a method of use of DNA. Similarly inventions IV, VII, and IX share a common technical feature but are not required to be rejoined under PCT Rule 13.1 because the invention of Group IV already has a method of use of kinases.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 16/40	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/12	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 9/12	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/48	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/573	A
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/573	A 6 1 K 37/52	

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ログラツソ, フイリツプ

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 ホーキンス, フリヨ

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 リスノツク, ジーン・マリー

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA20 DA36

FB01 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 CA04 DA02 DA05 HA14

4B050 CC03 DD11 LL01 LL03

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ27 QQ44 QR56 QR80 QS13 QS34

4B065 AA01 AA90 AB01 BA02 CA29 CA44 CA46

4C084 AA01 AA06 AA07 BA01 BA22 CA53 DC25 ZA152 ZA162 ZA452

ZA592 ZA662 ZA682 ZA962 ZB022 ZB072 ZB082 ZB112 ZB132 ZB152

ZB212 ZB352

4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA50

专利名称(译)	分离的核酸分子，其编码新的人信号激酶-MAPKAP-2，编码的蛋白，由所述核酸转化的细胞及其用途		
公开(公告)号	JP2004532035A	公开(公告)日	2004-10-21
申请号	JP2002587586	申请日	2002-02-25
申请(专利权)人(译)	默克结束Kamupani公司		
[标]发明人	ログラツソフィリツプ ホーキングズフリヨ リスノツクジーンマリー		
发明人	ログラツソ,フィリツプ ホーキングズ,フリヨ リスノツク,ジーン・マリー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/45 A61P1/04 A61P9/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/40 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/573		
CPC分类号	A61P1/04 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 C12N9/1205		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P1/04 A61P9/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/40 C12N1/21 C12N9/12 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/573.A C12N5/00.A A61K37/52		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/HA14 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ27 4B063/QQ44 4B063/QR56 4B063/QR80 4B063/QS13 4B063/QS34 4B065/AA01 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DC25 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA452 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA962 4C084/ZB022 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB352 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/272260 2001-02-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了两种新近鉴定的酶，即促分裂原激活的蛋白激酶激活的蛋白激酶-2，每种酶包含由SEQ ID NO：1和SEQ ID NO：3表示的核苷酸序列。每个公开的酶是丝氨酸/苏氨酸信号激酶，其在体外被Erk和p38 MAPK磷酸化并激活。还公开了包含重组核酸分子的细胞，其反义构建体，对每种公开的蛋白质特异的抗体，以及新型试剂盒，例如含有新型核酸分子及其基因产物的试剂盒。公开了核酸分子及其使用基因产物的方法。

