

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 350438

(P2002 - 350438A)

(43)公開日 平成14年12月4日 (2002.12.4)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 17/02		A 6 1 P 17/02	4 C 0 8 4
25/00		25/00	
25/28		25/28	

審査請求 有 請求項の数 23 O L (全 38数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 134538(P2001 - 134538)

(22)出願日 平成13年5月1日 (2001.5.1)

(31)優先権主張番号 60/205932

(32)優先日 平成12年4月28日 (2000.4.28)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 397067152

ファイザー・プロダクツ・インク

アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市

イースタン・ポイント・ロード

(72)発明者 バーバラ アン フォスター

アメリカ合衆国,コネチカット 06340,グロ

トン,イースタン ポイント ロード,ファ

イザー グローバル リサーチ アンド

デベロップメント

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 サイクリン依存性キナーゼのアッセイ方法

(57)【要約】

【課題】 C D K - リン酸化 R b タンパク質の定量に基づき、サンプル中の 1 以上のサイクリン依存性キナーゼ (C D K s) の活性を計測するための新規の方法の提供。

【解決手段】 本サイクリン依存性キナーゼ (C D K) 活性の計測方法は、以下の：

i) 上記サンプルを、C D K リン酸化 R b を特異的に認識する抗 - 網膜芽腫タンパク質 (R b) 捕獲抗体と接触させ；

ii) 上記捕獲抗体 - R b 複合体を、抗 - R b 1 次抗体と接触させ、そして上記捕獲抗体 - R b - 1 次抗体複合体を単離し；そして

iii) 上記捕獲抗体 - R b - 1 次抗体複体内に存在する 1 次抗体を定量することにより、上記サンプル中の C D K - リン酸化 R b 量を計測する、を含む。本方法は、培養された細胞又は動物から採取された細胞内の細胞内 C D K 活性を評価するために使用されうる。C D K の活性を調節する作用物質を同定する方法をも開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中のサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase (CDK)) 活性の計測方法であって：

i) 上記サンプルを、抗-網膜芽腫 (retinoblastoma) タンパク質 (Rb) 捕獲抗体と接触させ、そして上記捕獲抗体-Rb複合体を単離し；

ii) 上記捕獲抗体-Rb複合体を、抗-Rb1次抗体と接触させ、そして上記捕獲抗体-Rb-1次抗体複合体を単離し；そして

iii) 上記捕獲抗体-Rb-1次抗体複合体内に存在する上記1次抗体を定量することにより、上記サンプル中のCDK-リン酸化Rb量を計測する、を含む前記方法。

【請求項2】 前記CDKがCDK2である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記CDKがCDK4である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記方法が細胞内CDK活性を計測する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記方法が培養細胞内のCDK活性を計測する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記方法が動物から採取された細胞内のエクスピボCDK活性を計測する、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 前記CDK活性がヒトCDK活性である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記捕獲抗体がテスト・プレートに結合されている、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 細胞内のCDK活性を調節する作用物質を同定する方法であって、上記方法が；

i) 作用物質を上記細胞と接触させ；

ii) 上記細胞を溶解させ；

iii) 上記細胞溶解産物を抗-網膜芽腫タンパク質 (Rb) 捕獲抗体と接触させ、そして上記捕獲抗体-Rb複合体を単離し；

iv) 上記捕獲抗体-Rb複合体を抗-Rb1次抗体と接触させ、そして上記捕獲抗体-Rb-1次抗体複合体を単離し；そして

v) 上記捕獲抗体-Rb-1次抗体複合体内に存在する1次抗体量を定量することによりCDK-リン酸化Rb量を計測することを含み；ここで、上記CDK-リン酸化Rbの量が、上記作用物質に晒されなかった対照細胞と異なる場合、上記作用物質がCDK活性を調節する、前記方法。

【請求項10】 前記方法が、CDK活性を低下させる作用物質を同定する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 前記作用物質が、細胞の増殖を阻害することにより改善される疾患又は症状の治療のために、同定される、請求項10に記載の方法。

*【請求項12】 前記疾患又は症状が、癌、自己免疫疾患、ウイルス性疾患、真菌性疾患、変性障害、心臓血管疾患、発作、炎症性障害、及び皮膚科学障害から成る群から選ばれる、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記作用物質がCDK活性を高める、請求項9に記載の方法。

【請求項14】 前記作用物質が、細胞の増殖を高めることにより改善される疾患又は症状の治療のために、同定される、請求項13に記載の方法。

10 【請求項15】 前記作用物質が、神経変性を治療し、外傷の治癒を刺激し、又は免疫系の活性を刺激するために使用される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記CDKがCDK2である、請求項9に記載の方法。

【請求項17】 前記CDKがCDK4である、請求項9に記載の方法。

【請求項18】 前記方法が細胞内CDK活性を計測する、請求項9に記載の方法。

20 【請求項19】 前記方法が培養細胞内のCDK活性を計測する、請求項9に記載の方法。

【請求項20】 前記方法が、動物から採取された細胞内のエクスピボCDK活性を計測する、請求項4に記載の方法。

【請求項21】 前記CDK活性がヒトCDK活性である、請求項9に記載の方法。

【請求項22】 前記捕獲抗体がテスト・プレートに結合されている、請求項9に記載の方法。

【請求項23】 複数の作用物質であって、各々が複数の細胞サンプルの中の少なくとも1内にあるものが、テストされる、請求項9に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明の背景

本発明は、サイクリン依存性キナーゼ (CDKs) の活性を計測するための方法に関する。上記キナーゼは、細胞の分裂サイクルを調節し、そしてそれ故、細胞の成長及び分裂において役割を演じている。本発明に係る方法は、細胞内CDK活性の計測のために特に有用である。

【0002】細胞分裂サイクルは、4つの定義された逐次期をもつ：G1は最初のギャップ期であり、ここでは、細胞はDNA複製を準備する；S期は、DNA合成の期であり、この間に、ゲノム全体の完全なコピーが作製される；G2は第2のギャップ期であり、ここでは、細胞は分裂を準備する；そして最後に、M期 (有糸分裂) は、細胞分裂の期であり、ここでは、DNAの2つのコピーが2つの娘細胞に分離する。

【0003】細胞分裂サイクルを調節するためには、CDKは、サイクリン (cyclin) として知られるタンパク質と複合体を形成することにより、触媒により活性化されなければならない。異なるサイクリンの発現プロファイルは、細胞分裂サイクルの経過の間に変化する。それ

故、異なるCDK/サイクリン複合体が、形成され、そして細胞分裂サイクルの異なるステージにおいてかなりの調節的役割を演じている(Pavletich, J. Mol. Biol. 287 : 821-828, 1999; Mogan, Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 13 : 261-291, 1997)。例えば、CDK2, CDK4、及びCDK6は、それぞれ、D型サイクリンと併合して、G1制限点後の進行を調節し、CDK2/サイクリンE複合体は、G1からS期への移行を調節し、CDK2/サイクリンA複合体は、S期からG2への移動を仲介し、そしてサイクリンB又はサイクリンAと複合体を形成した(Cdc2としても知られる)CDK1は、G2期からM期への移動を駆動し、そして有糸分裂を開始させる。

【0004】一般に、活性化されたCDKsは、通常、セリン残基又はスレオニン残基上の、細胞タンパク質をリン酸化することによりそれらの調節機能を仲介する。例えば、CDK1(cdc2), CDK2, CDK4, CDK5、及びCDK6は、核膜芽腫(Rb)タンパク質をリン酸化し、これは、細胞内での転写活性化及び最終的なS期への進行を導く(Knudsen and Wang, J. Biol. Chem. 271 : 8313-8320, 1996; Zarkowska and Mittnoch, J. Biol. Chem. 272 : 12738-46, 1997; Kitagawa et al., EMBO J. 15 : 7060-69, 1996; Connell-Crowley et al., Mol. Cell Bio. 8 : 287-301, 1997)。このCDK-仲介リン酸化の前には、Rbは、基礎的(basal)リン酸化の状態のままである。この基礎的な状態においては、Rbは、転写因子E2Fと会合し、そしてそれ故、E2F-仲介転写を抑制する。しかしながら、G1後期におけるDNA合成の開始前に、活性化されたCDKsはRbを過リン酸化(hyperphosphorylated)されれば、Rbは、E2Fを放出し、それは、E2Fが、細胞分裂サイクルにより調節される遺伝子の転写を活性化し、そして上記細胞がS期に移ることを拘束する(Zarkowska and Mittnoch、前掲; Kitagawa et al., 前掲; Connell-Crowley et al., 前掲; 及びLundberg and Weinberg, Mol. Cell. Bio. 18 : 753-61, 1998)。

【0005】CDK調節における混乱は、異常な細胞成長をもたらすことができ、細胞CDK活性のインヒビターは細胞分裂サイクルの休止を引き起こすことができる(Dynlacht, Nature 389 : 149-52, 1997; Fisher, Curr. Opin. Genet.-Dev. 7 : 32-38, 1997; Morgan, Nature 374 : 131-34, 1995; Serrano et al., Nature 366. 704-07, 1993; Kamb et al., Science 264 : 436-40, 1994; Nobon et al., Nature 368 : 753-56, 1994; Levine, Cell 88 : 323-31, 1997; Porter et al., Nature Med. 3 : 222-25, 1997; Hunter and Pines, Cell 79 : 573-82, 1994; Sherr, Science 274 : 1672-77, 1996; Wolfel et al., Science 269 : 1281-84, 1995; Zuo et al., Nature Genet. 12 : 97-99, 1996; 及びSellers et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92 : 11544-48, 1995)。

それ故、CDK活性を調節する化合物は、細胞増殖の調節において有用であり、そして治療剤としても有用であることができる。

【0006】CDK活性を計測し、そしてこのような活性を調節する作用物質を同定するために最近利用することができる方法は、典型的には、テスト化合物の存在及び不存在下、インピトロにおいて基質のCDKリン酸化を計測することを含むものであった。しかしながら、このようなテストは、上記テスト作用物質が、細胞内で生理学的に関連のあるCDK活性を阻害する能力をもつかどうかに関する情報を全く提供しない。それ故、細胞内CDK活性及びそのような活性を調節する作用物質の能力を評価する方法についての必要性がある。

【0007】本発明の要約

本発明は、CDK-リン酸化Rbタンパク質の定量に基づき、サンプル中の1以上のサイクリン依存性キナーゼ(CDKs)の活性を計測するための新規の方法を提供する。本サイクリン依存性キナーゼ(CDK)活性の計測方法は、以下の：

- i) 上記サンプルを、CDKリン酸化Rbを特異的に認識する抗-網膜芽腫タンパク質(Rb)捕獲抗体と接触させ；
- ii) 上記捕獲抗体-Rb複合体を、抗-Rb1次抗体と接触させ、そして上記捕獲抗体-Rb-1次抗体複合体を単離し；そして
- iii) 上記捕獲抗体-Rb-1次抗体複体内に存在する1次抗体を定量することにより、上記サンプル中のCDK-リン酸化Rb量を計測する、を含む。

【0008】好ましい態様においては、上記捕獲抗体は、テスト・プレート、好ましくはマルチ・ウェル・プレートに結合され、本法は、細胞内CDK活性、好ましくは培養された細胞のCDK活性、又は動物から採取された組織サンプルのエキス活性を計測する。他の好ましい態様においては、本法は、CDK2活性又はCDK4活性をアッセイし、そして計測されたCDK活性はヒトである。

【0009】本発明の第2の局面は、細胞内でCDKの活性を調節する作用物質を同定する方法を特徴とする。本法は、

- i) 作用物質を上記細胞と接触させ；ii) 上記細胞を溶解させ；iii) 上記細胞溶解産物を、CDK-リン酸化Rbを特異的に認識する抗網膜芽腫タンパク質(Rb)と接触させ、そして上記捕獲抗体-Rb複合体を単離し；iv) 上記捕獲抗体-Rb複合体を抗-Rb-1次抗体と接触させ、そして上記捕獲抗体-Rb-1次抗体複合体を単離し；そしてv) 上記捕獲抗体-Rb-1次抗体複体内の上記1次抗体量を定量することにより、同一サンプル中CDK-リン酸化Rb量を計測し；ここで、上記CDK-リン酸化Rbの量が、上記作用物質と

接触していない対照細胞溶解産物とは異なる場合、上記作用物質はCDK活性を調節する。

【0010】好ましい態様においては、本法は、細胞の増殖を阻害することにより改善される疾患又は症状、例えば、癌、自己免疫疾患、炎症性障害、変性障害、例えば黄斑変性 (macular degeneration) 及びニューロバシー、心臓血管疾患、発作、ウイルス性疾患、真菌性疾患、及び皮膚科学障害、例えば、乾癬の治療のためのCDK阻害剤を同定する。他の好ましい態様においては、

本法は、細胞増殖を高めることにより改善される疾患又は症状、例えば、神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病の治療のための、又は外傷の治癒又は免疫系の活性を刺激するためのCDKアゴニストを同定する。

【0011】本発明の第2の局面の他の好ましい態様においては、上記捕獲抗体は、テスト・プレートに、好ましくは、マルチ・ウェル・テスト・プレートに結合され、そして計測されるCDK活性は、ヒトCDKである。好ましくは、本法はCDK2活性又はCDK4活性をアッセイする。他の好ましい態様においては、上記作用物質は、捕獲細胞と接触され、又は上記作用物質は動物に投与され、そしてそのエクスピボ活性が、動物から採取された組織サンプル中に計測される。本発明の第2の局面の追加の好ましい態様は、複数の細胞サンプルの各々の中の少なくとも1の作用物質を用いて、複数の作用物質をテストすることを含む。便利には、作用物質は、最初、それらの効果をテストするために単一細胞内で一緒にプールされることもできる。

【0012】“サイクリン依存性キナーゼ活性”又は“CDK活性”は、以下のセリン (Ser) 又はスレオニン (Thr) 残基: Ser 249; Thr 252; Thr 356; Ser 612; Ser 780; Ser 807; Ser 811; 及び/又は Thr 821 の中の1以上において網膜芽腫 (Rb) タンパク質のリン酸化をもたらず酵素活性を意味する。このような活性をもつCDKsの例は、CDK2であって、Ser 249, Thr 252, Thr 356, Ser 612, Ser 807, Ser 811、及び Thr 821 をリン酸化するもの、及びCDK4であって、Ser 780をリン酸化するものを含む。

【0013】“捕獲抗体”又は“抗-Rb抗体”は、Rbタンパク質を特異的に認識する抗体を意味するが、そのRbは、以下のセリン (Ser) 又はスレオニン (Thr) 残基: Ser 249; Thr 252; Thr 356; Ser 612; Ser 780; Ser 807; Ser 811; 及び/又は Thr 821 の中の1以上におけるCDK活性によりリン酸化される場合だけを指す。

【0014】“抗-Rb1次抗体”は、Rbタンパク質を特異的に認識する抗体を意味するが、リン酸化に依存しないやり方におけるものを指す。

【0015】“1次抗体量を定量する”とは、検出可能な標識、例えば、アルカリ・ホスファターゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ビオチン、ユーロピウム (Europium) 又は放射標識を用いて、抗-Rb1次抗体量を計測する方法を意味する。上記標識は、上記1次抗体を特異的に認識する2次抗体にコンジュゲートされることができる。あるいは、上記標識は、上記1次抗体にコンジュゲートされることができる。アルカリ・ホスファターゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、又は-ガラクトシダーゼの場合には、上記定量方法は、上記酵素活性に反応して、化学発光、発色性、又は蛍光シグナルを作り出す基質の使用に頼る。ビオチンの場合、上記定量は、ビオチンとストレプトアビジン又はアビジンのいずれかとの間の相互作用に頼る。そして、放射標識の場合、定量は、放射能の計数又はオートラジオグラフに頼る。

【0016】“異なる”とは、統計的に有意なやり方 ($p < 0.1$) で変化することを意味する。サンプル間のバラツキがランダムでない確率は、本分野において周知の統計計算により決定されることができる。

【0017】CDK活性を“高める”又は“低下させる”とは、それぞれ、その対照平均値の上又は下にある、平均値における、統計的に有意な変化を意味する。好ましくは、上記対照平均値からの変化は、少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、そして最も好ましくは、少なくとも75%である。

【0018】本発明は、多くの利点を提供する。例えば、本発明の方法は、細胞内CDK活性レベルに関する情報を提供するために使用されることができる。本法は、典型的にはインビトロにおいてCDK活性を分析する本分野において知られた他の方法よりも、生理学的に関連のある、CDK活性についての情報を提供する。それ故、本発明の方法は、細胞分裂サイクルの経過の間に細胞内CDK活性における変化を試験するとき又は培養細胞又は動物内でCDK活性を調節する化合物を同定するために、有用である。

【0019】新規CDKインヒビターの同定は、以下の治療における利点のために細胞増殖を調節するために使用される細胞分裂サイクル調節物質のプールを創り出す利益をも提供する: 1) 抗腫瘍剤として使用されるとき、上記CDKインヒビターは、それらが直接的DNA相互作用を欠くために2次腫瘍成長のリスクをほとんど作り出さない; 2) 上記CDKインヒビターは、CDK活性が誤って調節されていないが、その症状の維持のために不可欠であるところの症状 (例えば、ウイルス感染) を治療するための候補療法を提供する; そして3) 上記CDKインヒビターは、正常細胞内での細胞分裂サイクルの進行を防ぐことにより、S期、G2、又は有糸分裂において生じる分裂サイクル特異的な化学療法剤の毒性から、正常な細胞を保護するために使用されること

ができる (Stone et al., Cancer Research 56 : 3199-202, 1996; Kohn et al., Journal of Cellular Biochemistry 54 : 440-52, 1994)。

【0020】本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び請求の範囲から明らかであろう。本発明を、特定の態様について記載してきたが、本発明はさらに修飾されることが理解される。それ故、本発明は、一般に、本発明の原理から生じる変形、使用、又は改作の全てを包含することを意図される。これらは、本分野において知られた又は慣用の実務内にある、本発明の開示から免脱したものを含む。本明細書中に言及する全ての刊行物をここに援用する。

【0021】詳細な説明 アッセイ・プロトコール

本発明は、以下のセリン (Ser) 又はスレオニン (Thr) 残基 : Ser 249 ; Thr 252 ; Thr 356 ; Ser 612 ; Ser 780 ; Ser 807 ; Ser 811 ; 又は Thr 821 の中の1以上において CDK 活性によりリン酸化される網膜芽腫 (Rb) タンパク質を定量することにより CDK 活性を計測する方法を特徴とする。本発明によりアッセイされることができる特定の CDKs の例は、(Ser 249 , Thr 252 , Thr 356 , Ser 612 , Ser 807 , Ser 811 , 及び Thr 821 において Rb タンパク質をリン酸化する) CDK 2、及び (Ser 780 において Rb タンパク質をリン酸化する) CDK 4 を含む。特に注目すべきは、本発明に係る方法は、細胞内 CDK 活性を評価するための細胞ベースのアッセイにおいて使用されることができる。従って、本法は、例えば、不死化細胞系、1次細胞系から、又は動物、好ましくは、哺乳動物から切除された組織サンプルから得られた培養細胞内の CDK 活性を評価するために、使用されることができる。さらに、本発明の方法は、細胞又は動物を作用物質に事前に晒すことにより、培養細胞又は動物の細胞内で CDK 活性を調節する作用物質を同定するためのスクリーニング・アッセイにおいて使用されることもできる。好ましくは、上記スクリーニング・アッセイは、高処理量アッセイであり、そして上記動物は、疾患モデル、例えば、ゲッ歯類腫瘍モデルを表す。

【0022】サンプル中の CDK - リン酸化 Rb の定量における第1のステップとして、本発明の方法は、以下の残基 : Ser 249 ; Thr 252 ; Thr 356 ; Ser 612 ; Ser 780 ; Ser 807 ; Ser 811 ; 及び Thr 821 の中の1以上においてリン酸化された Rb タンパク質と特異的に反応する“捕獲 (capture)”抗体の使用を利用する。例えば、CDK 2 活性は、以下の抗体の中の1を用いてアッセイされる : Ser 807 及び / 又は Ser 811 においてリン酸化された Rb に特異的な抗体 (Cat. # 9308, New England Bio Labs, Inc., Beverly, MA) ; Ser 249 及び / 又は T

hr 252 においてリン酸化された Rb に特異的な抗体 (例えば、以下の K L H - コンジュゲート・ペプチド抗原 : アセチル - N G [p S] P R [p T] P R R G Q N C - アミド (配列番号1) を用いて作られたもの)、Thr 356 においてリン酸化された Rb に特異的な抗体 (例えば、以下の K L H - コンジュゲート・ペプチド抗原 : アセチル - F E T Q R [p T] P R K S N L D C - アミド (配列番号2) を用いて作られたもの)、Ser 612 においてリン酸化された Rb に特異的な抗体 (例えば、以下の K L H - コンジュゲート・ペプチド抗原 : Y L S P V R (p S) P K K K G S T (配列番号3) を用いて作られたもの)、又は Thr 821 においてリン酸化された Rb に特異的な抗体 (例えば、K L H - コンジュゲート・ペプチド抗原 : S E G L P (p T) P T K M T P R S (配列番号4) を用いて作られたもの)。同様に、Ser 780 においてリン酸化された Rb に特異的な抗体 (例えば、Cat. # 9307S, New England Biolabs, Beverly, MA; Code # 555, Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) を、CDK 4 活性を評価するために使用する。上記捕獲抗体はポリクローナルであることが好ましい。

【0023】テスト・サンプル中の CDK - リン酸化 Rb タンパク質が上記捕獲抗体と複合体を形成した後、上記複合体を、残ったサンプルから単離する。この複合体を単離するために、上記捕獲抗体を、本分野において知られた標準的な方法により、固相支持体、例えば、マルチ・ウェル・プレートに、まず、付着されることが好ましい (例えば、Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons, New York, NY, 1999 を参照のこと)。抗体付着のために使用されることができる固相支持体の例は、好みに従って、Nunc Maxisorb プレート、Nunc Polysorb プレート、及びプロテイン A プレート (VWR Scientific, Bridgeport, NJ) を含む。上記固相支持体に上記捕獲抗体を付着させるために、上記捕獲抗体を、バッファー、例えば、0.05 M 炭酸塩 - 炭酸水素塩 pH 9.6 (Cat. # C-3041, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 中で約 10 µg/ml まで希釈する。この抗体希釈物を、次に上記プレートに適用し、そして4 において約4時間~一度の範囲の時間にわたりインキュベートする。上記抗体が結合した支持体を、塩 (例えば、100~150 mM NaCl) 及び少量の界面活性剤 (例えば、0.02~0.1% Tween 20) を含有する 25 mM Trizma ベース (Tris) 又は 50 mM N - (2 - ヒドロキシエチル) - N - (2 - エタンサルホン酸) (Hepes) ベースのバッファー (pH 7.4~7.8) 中で洗浄する (上記洗浄バッファーの全てが Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) から入手可能である。例示的な洗浄バッファーは、イミダゾール洗浄バッファー (Cat. # 50-63-01, KPL, Inc.,

Gaithersburg, MD)である。(アルカリ・ホスファターゼ検出システムが上記アッセイの次のステップにおいて使用される場合、ホスフェート・バッファード生理食塩水が、インキュベーション又は洗浄バッファーとして推奨される。)

上記洗浄ステップの後、上記捕獲抗体結合支持体を、室温において約0.5~2時間、ブロッキング・バッファーとともにインキュベートする。例示的なブロッキング・バッファーは、好みに従い、Trisバッファード生理食塩水(TBS)(137mM NaCl, 3mM KCl, 25mM Tris Base pH7.6;全ての成分がSigma Chemical Co., St. Louis, MOから入手できる)及び0.1% Tween-20中のSuperblock # 37515 (Pierce Chemical, Rockford, IL)、Superblock # 37535 (Pierce Chemical, Rockford, IL)、0.2%カゼイン(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、並びにTBS及び0.1% Tween-20中の0.05%スキム・ミルク(インキュベーション・バッファー成分の全てがSigma Chemical Co., St. Louis, MOから入手できる。)を含む。上記捕獲抗体結合支持体からの上記ブロッキング・バッファーの吸引後に、次のステップが上記テスト・サンプルと接触される。

【0024】CDKの細胞内活性が本発明の方法により計測されるとき、上記テスト・サンプルは、所望の実験条件に供された細胞系又は動物組織から得られた細胞溶解産物を含む。正常な成長調節をもつ細胞及び細胞系はいずれも、Rbタンパク質及びCDKsを発現し、そしてそれ故、本アッセイにおいて使用されることができる。多くの腫瘍細胞系、例えば、U2OS骨肉腫細胞、Colo 205結腸直腸癌腫細胞、及びDL1結腸直腸細胞も、Rb及びCDKsを発現し、そして使用されうる。しかしながら、シンクロナイゼーションが(CDK2の場合におけるように)アッセイされるべきCDKに関係する場合、上記腫瘍細胞をシンクロナイズさせるためには注意しなければならない。血漿消耗によりシンクロナイズされることができる腫瘍細胞系の例は、T47D乳癌腫細胞及びMDA-MB-231乳癌腫細胞を含む。血漿消耗の24時間以内に細胞がシンクロナイズされることができるといことが好ましい。シンクロナイゼーションを誘導するために細胞に適用される例示的な培地は、フェノール・レッドを含まず(Cat. #21063-029, Life Technologies, Rockville, MD)、そして0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)(Cat. #A3294, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、P/S/G(2mM L-グルタミン、100ユニット/μlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン(Cat. #61146, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を含む、ダルベッコ修飾Eagles培地(DMEM)である。細胞がシンクロナイゼーションを要求しない場合、それらは、標準的な成長培地、例えば、DMEM(Cat. #150

1965-092, Life Technologies, Rockville, MD)、10%胎児ウシ血清(FBS)(Cat. #16140-071, Life Technologies, Rockville, MD)、中で培養されることができ、そしてP/S/G腫瘍細胞系と正常細胞系は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)及びClonetics (Walkersville, MD)の如き源から公に入手されることができる。

【0025】1次細胞調製物、例えば、ラット又はマウス胚組織由来の線維芽細胞も、本発明によりCDK活性を評価するために使用されうる。無菌条件下、胚性脾臓、肝、心臓、肺、及び(16日齢よりも長い場合)、頭が摘出される。残りの組織は、約37°Cにおいて、10~15mlの0.04%トリプシン溶液(Gibco BRL, Grand Island, NY)を入れたペトリ皿に移される。上記組織は細かくミンチにされ、上記組織/トリプシン混合物を、Erlenmeyerフラスコに移し、そして20~30mlの新鮮トリプシンを上記フラスコに添加する。約30分間水浴(37°C)内でのインキュベーション後、トリプシンを除去し、そして懸濁した細胞を上記フラスコから取り出し、そして50ml遠心分離管に添加する。10%FBSを含む等容のDMEM-高グルコース(Life Technologies, Rockville, MD)(DMEM+FBS)を上記管に添加する。上記フラスコ内の残存組織沈殿物に、20~30mlのトリプシンを添加し、そして上記トリプシン化ステップを繰り返す。次に懸濁した細胞を吸引し、遠心分離管に移し、そして等容のDMEM-H+FBSにより再懸濁させる。次に上記細胞懸濁液の全てを10~15分間300×gにおいて遠心分離する。上清を吸引し、そして上記細胞を、新鮮DMEM+FBS中に再懸濁させる。次に細胞をプレート内で培養することができる。この培地を24時間後に交換し、そして上記細胞をコンフルエントになったとき1:3で継代する。細胞を保存するため、それらを、コンフルエントに近づいたときに凍凍することができる。

【0026】作用物質が細胞内のCDKの活性に影響を及ぼすかどうかを決定するためのアッセイを行うために、上記作用物質を、まず、水、ジメチルスルホキシド(DMSO)、又はトリフルオロ酢酸(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)の如き媒質中に溶解させる。培養細胞への適用のために、媒質中の作用物質を、まず、細胞成長培地中で希釈して所望の濃度又は濃度レンジを達成する。これは典型的には0~100μMのレンジ内にある。使用する成長培地の例は、DMEM、McCoy's培地、又は最小必須培地(Life Technologies, Rockville, MD)を含む。選ばれた培地は、アッセイに使用される特定の細胞系のために最適化され、そして特別な成長因子を含むことができる。いくつかの細胞、例えば、ケラチン生成細胞のためには、細胞特異的最適化成長培地が商業的に入手可能である(Cat. #3001, 3004, 3107、及び3115, Clonetics, Walkersville, MD)。

【0027】ほとんどの細胞が16～36時間の細胞分裂サイクルをもつので、Rbタンパク質のCDKリン酸化により計測されるとき、細胞分裂サイクルの進行に対する可能性のある効果を最適化するために、16～24時間、より好ましくは、16～21時間、培養細胞を、上記作用物質とともにインキュベートすることが好ましい。次に、上記細胞を、界面活性剤含有バッファー、例えば、0.1% NP-40、250mM NaCl、5mM NaF、1mMジチオトレイトール(DTT)及びプロテアーゼ・インヒビターの組合せ物を含有する50mM

Hepe sバッファーpH7.6中で溶解させる(上記溶解バッファーの上記成分の全てはSigma Chemical Co., St. Louis, MOから入手することができる)。典型的には、上記プロテアーゼ・インヒビターの組合せ物は、バクテリア、哺乳動物、酵母、及び植物細胞抽出中の、セリン-、システイン-、及びメタロ-プロテアーゼに対して有効なインヒビターを含む。例示的な組合せ物は、ペファブロックSC(pefabloc SC)(0.1～1.0mg/ml)、ロイペプチン(leupeptin)(0.5μg/ml)、アプロチニン(aprotinin)(0.06～2.0μg/ml)、ペプスタチン(pepstatin)(0.7μg/ml)である(プロテアーゼ・インヒビターの全てが、Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, INから入手可能である)。商業的に入手できる、プロテアーゼ・インヒビター組合せ物は、所望のプロテアーゼ組合せ物を作るため、保存溶解バッファーへの便利な添加のための濃縮錠剤形態において一緒に混合される(Cat. # 1697498, (Boehringer Mannheim) Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)。他の例示的な溶解バッファーは、25mM BicineバッファーpH7.6

(Cat. # 78501T, Pierce Chemical, Rockford, IL)であり、これは、DTT(1mM)及び上記プロテアーゼ・インヒビターの組合せ物の添加後に、使用されることができる。

【0028】動物全体への投与後の作用物質の効果を評価するとき、nu/nuマウスが、使用される好ましい癌モデルである。このマウスに、約5百万の腫瘍細胞(例えば、全容量200μlホスフェート・バッファード生理食塩水(Life Technologies, Rockville, MD)中のColo 205又はHCT 116結腸直腸癌細胞)を、下腹部に皮下接種する。上記腫瘍が約100～200m³に成長したとき、上記作用物質を、所望の経路、例えば、腹腔内、皮下、静脈内、又は経口を通して投与する。上記作用物質のインビボにおける動態が知られていないとき、それらは、テスト前に定常状態を達成するために連続的に投与されることが好ましい。例えば、上記作用物質は、上記テスト作用物質を含有するオスモティック・ミニ-ポンプ(Alzet Model 2001, 7-day pump, Alza Corp, Newark, DE)により投与されることができる。上記ポンプは、麻酔されたマウス{例えば、

50mg/kgネムブタール(nembutal、腹腔内)}内に移植される。上記テスト作用物質を、まず、適当な媒質、例えば、サイクロデキストリン、プロピレン・グリコール:DMSO(1:1)、又は5%グリシン、等中に溶解させる。上記動物からの組織をその後、例えば、移植から5日後に試験する。上記腫瘍細胞及び/又は他の組織を取り出し、そして液体窒素中に保存する。血漿を、作用物質濃度の分析のために保存する。次に、CDK活性のさらなる分析を、本明細書中に記載するように、Rbタンパク質リン酸化を評価することにより決定する。細胞をまず、液体窒素冷却粉碎機内で粉碎し、そして次に先に記載した溶解バッファー中に懸濁させる。サンプルをボルテックスし、そして次に4において約10分間8,000×gにおいて遠心分離する。上記上清のタンパク質濃度をタンパク質アッセイにより測定する(Cat. # 500-0006, Biorad, Hercules, CA)。サンプルを100μg/mlに希釈し、そして100μg/ウェルを上記マルチウェル・テスト・プレートに添加する。全てのケースにおいて、リン酸化されたRbのレベルを、上記作用物質がCDKレベルに影響を及ぼすかどうかを決定するために、上記作用物質の血漿レベルと関連させる。

【0029】上記細胞溶解産物が培養された細胞由来であるか組織サンプル由来であるかに拘らず、上記細胞溶解産物を上記捕獲抗体結合プレートに添加し、そして室温で約1～3時間インキュベートする。インキュベーションの全てを、30～200回転/分において低速シェーカー上で行うことが好ましい。上記細胞溶解産物を吸引し、そして0.1% Tween-20を含むか又は含まない、TBS pH7.4～7.8中の1%カゼインの如きインキュベーション・バッファー中で、約1～5μg/mlに希釈した抗-Rb 1次抗体を、上記捕獲抗体結合プレートに添加する。

【0030】上記1次抗体は、リン酸化非依存性のやり方でRbタンパク質を認識する。例示的な抗体は、残基300～380の間のヒトRbエピトープに対して向けられたモノクローナル抗体(Cat. # 14001A, Pharmingen, San Diego, CA)及び残基612～928の間のヒトRbエピトープに対して向けられたモノクローナル抗体(Cat. # MK-15-1, Medical Biological Laboratories, Nagoya, Japan)を含む。

【0031】使用する抗体に依存して、上記抗体溶液を、低速シェーカー上で室温で約1～3時間、上記捕獲抗体結合プレートとともにインキュベートする。Pharmingen抗体(Cat. # 14001A)の場合、好ましいインキュベーション期間は2時間である。インキュベーション後、上記プレートを次に、先に記載した洗浄バッファーで複数回(例えば、3～6回)洗浄する。

【0032】上記の一連の試験インキュベーションが完了した後、上記固相支持体は、上記1次抗体と複合体を

形成した、CDKリン酸化Rbタンパク質と複合体を形成した、結合捕獲抗体を含む。上記テスト・サンプル中に元々存在したCDKリン酸化Rbタンパク質の量を定量するために、標準的な検出システムを用いて、上記プレート結合された抗体複体内に含まれる1次抗体の量を評価する。上記検出システムは、上記1次抗体に又は上記1次抗体を特異的に認識する2次抗体のいずれかにコンジュゲートされた検出可能な標識の使用を取り込む。検出可能な標識の例は、ペルオキシダーゼ、例えば、ホースラディッシュ又は大豆ペルオキシダーゼ、アルカリ・ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、キレート化ランタニド、ビオチン、ユーロピウム (Europium)、及び放射性標識を含む。

【0033】検出可能な標識にコンジュゲートされた2次抗体の商業的な利用可能性がある場合、上記抗体の中の1の使用が、上記1次抗体を検出するために好ましい方法である。本発明における使用のために利用されることができる2次抗体の例は、ロバ抗-マウス・アルカリ・ホスファターゼ標識抗体 (Cat. # 715-055-150, Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA)、又はヤギ抗-マウス・ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識抗体 (Cat. # 12-349, Upstate Biotechnologies, Lake Placid, NY、及びCat. # 10767, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、又はラビット抗-マウスEuropium-標識抗体を含む。

【0034】あるいは、上記1次抗体は、それ自体、検出可能な標識でコンジュゲートされることができるであろう。1次抗体であるか2次抗体であるかに拘らず、アルカリ・ホスファターゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、又は β -ガラクトシダーゼを抗体にコンジュゲートするための方法は、文献中によく記載されている (例えば、Porstmann et al., J. Immun. Meth. 79 : 27-37, 1985; Imagawa et al., J. Appl. Biochem. 4 : 41-57, 1982 を参照のこと)。さらに、上記抗体の選択は、放射標識されたもの (Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996, 3rd ed.)、又はビオチン化されたもの (Ignatowski et al., J. Exp. Ther. 290 : 863-70, 1999; Southwick et al., Cytometry 11 : 418, 1990)であることができるであろう。ペルオキシダーゼ又はアルカリ・ホスファターゼ標識を抗体にコンジュゲートするためのキットは、Pierce Chemical から商業的に入手可能である (例えば、Cat. #'s 31487, 31488、及び31489, Rockford, IL)。同様に、抗体をビオチン標識 (例えば、Cat. # C5585, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)又はEuropium標識 (例えば、Cat. # 1244-302, Wallac)に、コンジュゲートするためのキットが商業的に入手可能である。

【0035】このような標識された抗体の存在を検出するための例示的な方法は、文献中に記載されている (例

えば、Using Antibodies : A Lab Manual, eds. Harlow and Land, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1999、及びCurrent Protocols in Immunology, Cell Biology, and protein Science, John Wiley & Sons, New York, NY, 1999 を参照のこと)。簡単に言えば、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識の検出は、発色性基質、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩 (Cat.# 11557, Fluka (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO))を用いて達成され、これはSzutowicz et al., Anal. Biochem. 138 : 86, 1984, Envall, Methods Enzymol. 70 : 419, 1989、及びAl-kaisi and Mosstratos, J. Immunol. Methods 58 : 127, 1983中にさらに記載されている。アルカリ・ホスファターゼ標識を検出するためには、例えば、Thompson and Larson (Bio Techniques 12 : 656, 1992)中に記載されているように、発色性基質、ニトロブルー・テトラゾリウム・クロライド 5-プロモ-4-クロロ-3-インドールイル・ホスフェート・トルイジン塩 (BCIP-NBT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)が使用されることができ、又は化学発光性基質CDP-Star Sapphire II (Cat. # MS 100RX, Tropix, Bedford, MA)が使用されることができる。Europiumキレートは、強化溶液 (Cat. # 1244-114, Wallac)を要求する。以下の実施例中にさらに記載されるように、発光検出システムを用いたELISA-ベースのアッセイの感度が与えられる場合、それは、CDK活性を検出する好ましい方法である。

【0036】テスト作用物質又は化合物

テスト作用物質又は化合物を、対照サンプルと比較して統計的に有意なやり方 ($p < 0.1$)でサンプル中のCDKリン酸化Rbのレベルを変化させ、そしてその対照平均値の上又は下の統計的に有意な変化を作り出す場合のCDKモジュレーターとして同定する。

【0037】一般に、CDK活性を調節する作用物質又は化合物は、天然産物、又は合成 (又は半合成) 抽出物、化学ライブラリー、又は個々の化合物から同定され、そして本分野において知られた方法に従って製造される。このような抽出物又は化合物の例は、非限定的に、天然又は合成化学の化合物、小さな有機又は無機分子、生物学的巨大分子 (例えば、ペプチド、タンパク質、及び核酸)、化学化合物、植物-、真菌-、原核-、又は動物ベースの抽出物、及び発酵プロセスの混合物を含む。

【0038】非限定的に糖-、脂質-、ペプチド-、及び核酸-ベースの化合物を含む、多数の化学化合物のランダム又は指示された合成 (半合成又は全合成) を作り出すために多くの方法を利用することができる。本明細書中に記載するアッセイは、大きな化合物ライブラリーのスクリーニングに対応する、高処理量スクリーニング・アッセイの実施において特に有用である。

【0039】合成化合物ライブラリーも、例えば、Brandon Associates (Merrimack, NH)及びAldrich Chemical (Milwaukee, WI)から商業的に入手可能である。バクテリア、真菌、植物、及び動物抽出物の形態における天然化合物のライブラリーは、Biotics (Sussex, UK), Xenova (Slough, UK), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, FL)、及びPharmaMar, U.S.A. (Cambridge, MA)を含む多くの源から商業的に入手できる。さらに、天然及び合成ライブラリーが、例えば、標準的な抽出及び分画法、有機合成、及びコンビナトリアル・ケミストリーの方法により、適宜、本分野において知られた方法に従って製造される。

【0040】粗抽出物がCDK活性を調節することが発見されるとき、さらなる分画が、その原因の化学構成成分を単離し、かつ、精製するために使用されることができる。このような異種抽出物の分画及び精製の方法は、本開示を見て、本分野において知られることになるであろう。所望により、CDKモジュレーターとして同定された化合物は、本開示を見て本分野に知られた方法に従って、それらの調節効果を高め又は毒性を低下させるために、さらに修飾されることができる。

【0041】CDK活性のモジュレーターに関する治療的適用

CDK活性のアゴニスト又はアンタゴニストとして本発明に係る方法により同定された作用物質又は化合物は、いくつかの治療的適用をもつ。例えば、CDKインヒビターとして同定された作用物質又は化合物は、癌、自己免疫疾患、ウイルス性疾患、真菌性(fungal)疾患、変性障害、心臓血管疾患、発作、炎症性障害、及び皮膚科学障害の如き疾患、並びに細胞増殖の阻害が有益であるような他の疾患及び症状の治療において有用である。

【0042】上記CDKインヒビターは、以下のものを含むさまざまな癌の治療において有用である：膀胱、乳、脳、結腸、腎臓、肝臓、肺(小細胞肺癌を含む)、食道、胆嚢、卵巣、膵臓、胃、子宮頸部、甲状腺、前立腺、及び皮膚(扁平上皮細胞癌腫を含む)の癌腫を含む癌腫、リンパ系の造血性腫瘍(白血病、急性リンパ球性白血病、急性リンパ母細胞性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、ホジキン(hodgkins)リンパ腫、非ホジキン・リンパ腫、毛状細胞リンパ腫、及びパーケット(Burkett's)リンパ腫を含むもの)、骨髄系の造血性腫瘍(急性及び慢性骨髄性白血病、骨髄形成異常症候群及び前骨髄球性白血病を含むもの)、間葉起源の腫瘍(線維肉腫及び横紋筋肉腫を含むもの)、中枢及び末梢神経系の腫瘍(星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、及び、ミュワン細胞腫を含むもの)、並びに他の腫瘍(黒色腫、精上皮腫、奇形癌腫、骨肉腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、及び甲状腺小胞癌を含むもの)。

【0043】癌細胞の増殖を阻害することに加えて、CDKインヒビターは、異常又は有害な細胞増殖に関連す

る疾患又は症状、例えば、カボジ肉腫、良性前立腺過形成、家族性腺腫様ポリープ、神経線維腫症、アテローム性動脈硬化症、血栓性微小血管症候群、肺線維症、関節炎、乾癬症、血管形成術又は血管手術後の再狭窄、肥大癬痕形成、炎症性腸疾患、移植拒絶、内毒素ショック、メサングウム細胞増殖性障害(糸球体腎炎を含む)、糖尿病性ニューロパシー、糸球体症、悪性腎硬化症、臓器移植拒絶、黄斑変性症、真菌感染、及びウイルス感染の治療において有用であることができる不可逆細胞分裂停止剤として作用することができるであろう。

【0044】もちろん、CDKアゴニストとして同定された化合物は、細胞増殖の刺激が望まれるような疾患又は症状のための治療剤として、例えば、神経変性障害、例えば、アルツハイマー病を治療するために、そしてまた外傷治療を刺激し、そして免疫系の活性を刺激するために、使用されることもできるであろう。

【0045】CDK活性を調節する作用物質は、いずれかの適当な経路により投与されることができる。例えば、投与は、非経口、静脈内、動脈内、皮下、筋中、頭蓋内、眼窩内、眼内、脳室内、嚢内、脊髄内、腹腔内、鼻内、エアロゾル、座剤、又は経口投与による。

【0046】CDKモジュレーターを含む治療製剤を投与するとき、その製剤は、液体溶液又は懸濁液の形態にあることができ；経口投与のためには、製剤は、錠剤又はカプセルの形態にあることができ；そして鼻内製剤のためには、粉末、鼻用滴剤、又はエアロゾルの形態にあることができる。

【0047】製剤化のための本分野において周知の方法は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (ed. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th ed., 1990)中に見られる。

【0048】実施例：CDK2又はCDK4活性のためのELISA-ベースのアッセイ

0.05M炭酸塩-炭酸水素塩バッファーpH9.6中10µl/mlに希釈された捕獲抗体を含む溶液(Cat.#C3041, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を、96ウェル・プレート(100µl/ウェル, Nunc F96 Maxi Sorp, VWR Scientific, Bridgeport, NJ)のウェルをコートするために適用し、そして4度一夜インキュベートした。CDK2アッセイのためには、Ser807とSer811においてリン酸化されたRbを特異的に認識する抗-ホスホRb抗体を使用し(Cat.#9308L, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)；CDK4アッセイのためには、Ser780においてリン酸化されたRbを特異的に認識する抗-ホスホRb抗体を使用した(Cat.#9307S, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA、又はCode#555, Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan)。

【0049】乳癌細胞、T47D(HTB-133, ATCC, Manassas, VA, Depositor: I. Keydar)を、100mmプレ

ート内で培養し、コンフルエンス前にトリプシン処理し、そしてD MEM (Cat. # 11965-092, Life Technologies, Rockville, MD)、10%胎児ウシ血清(FBS)(Cat. # 16140-071, Life Technologies, Rockville, MD)、P/S/G(2mM L-グルタミン、100ユニット/mlペニシリン、100µg/mlストレプトマイシン)(Cat. # 91146, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)中9,000細胞/200µl/ウェルにおいて96ウェル・プレート内に接種した。

【0050】CDK2アッセイのために、細胞を1日間培養し、そして次に以下のように血清飢餓によりシンクロナイズさせた。細胞培地を吸引し、細胞を、5回、Hanks Buffered Saline Solution (Cat. # 14025-092, Life Technologies, Rockville, MD)中で洗浄した。次に細胞を、24時間、フェノール・レッドを含まないD MEM (Cat. # 21063-029, Life Technologies, Rockville, MD)、0.1%B SA (Cat. # A3294, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、及びP/S/G中でインキュベートした。対照細胞を、0.1%B SA/D MEM中で維持して、ベースライン(血清消耗)を確立しながら、テスト細胞に、D MEM、1%FBS、P/S/Gを再供給し、そして0、25µM、50µM、又は100µMオロモウシン(olomoucine)(Promega, Madison, WI)、知られたCDKインヒビターとともに20~24時間インキュベートした。

【0051】CDK4アッセイのためには、細胞のシンクロナイゼーションは要求されなかった。細胞を2日間、D MEM (Cat. # 11965-092, Life Technologies, Rockville, MD)、10%FBS、P/S/G中で培養した。次に、この細胞培地を吸引し、そして0、25µM、50µM、又は100µMオロモウシンを含む200µl新鮮培地を、20~24時間のインキュベーションの間に添加した。

【0052】両CDK2アッセイ及びCDK4アッセイのために、上記溶媒中、0、25mM、50mM、及び100mMの濃度レンジにおけるDMSO媒質(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)中に、オロモウシンをまず溶解させた。次に、上記溶液を、上記オロモウシン又は対照溶液を上記細胞に添加する前に、D MEM、10%FBS、P/S/G中1:1000に希釈した。

【0053】96ウェル・プレート内にプレートした細胞を、(先に記載したような)冷TBS中で3回洗浄し、そして50mM HEPESバッファーpH7.6、0.1%NP-40、250mM NaCl、5mM NaF、1mM DTT、及びプロテアーゼ阻剤中に提供されたプロテアーゼ・インヒビター(Cat. # 1697498, Boehringer Mannheim) Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)から成る120µl/ウェル冷溶解バッファーにより溶解させた。この細胞溶解産物を、上記捕獲抗体結合プレート上で行われる以下のブロッッキング

・ステップの間、4に維持した。上記プレートを、250µl/ウェルのイミダゾール洗浄バッファー(Cat. # 50-63-01, KPL, Inc, Gaithersburg, MD)で2回洗浄し、そして室温で1時間、ブロッキング・バッファー(Cat. # 37515, Pierce Chemical, Rockford, IL)とともにインキュベートした。

【0054】上記ブロッキング・ステップの終了時、上記ブロッキング・バッファーを吸引し、そして100µlの細胞溶解産物を、上記捕獲抗体被覆プレートの各ウェルに移した。上記プレートを、室温における2時間のインキュベーションの間、低速設定(約100回転/分)においてシェーカー上に置いた。上記プレートを次に上記イミダゾール洗浄バッファー中で6回洗浄した。

【0055】結合した捕獲抗体-Rb複合体をもつ上記プレートを、アミノ酸300~380の間のRbエピトープを認識する抗-Rbモノクローナル抗体(リン酸化非依存性)(Cat. # 14001A, PharMingen, San Diego, CA)とともにインキュベートした。上記1次抗体を、1%カゼイン、TBS pH7.6、0.1% Tween-20中で2µg/mlに希釈した(インキュベーション・バッファー成分の全てがSigma Chemical Co., St. Louis, MOから入手できる)。上記溶液100µlを、各ウェルに添加し、そして次に上記プレートを、室温で2時間低速設定において上記シェーカー上でインキュベートした。次に上記プレートを、上記イミダゾール洗浄バッファーで6回洗浄して、上記プレートに結合した捕獲抗体-Rb-1次抗体複合体を単離した。

【0056】上記プレート上でインキュベートされた最後の抗体は、ロバ抗-マウス・アルカリ・ホスファターゼ標識された2次抗体であった(Cat. # 715-055-150, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA)。上記2次抗体を、TBS pH7.6、0.1% Tween-20中、1%カゼインから成るインキュベーション・バッファー中で1:2000希釈し、そして100µlの上記溶液を各ウェルに添加した。室温で1時間低速設定において上記シェーカー上で上記プレートをインキュベートした後、上記プレートを再び、上記イミダゾール洗浄バッファーで6回洗浄して、上記捕獲抗体-Rb-1次抗体-2次抗体複合体を単離した。

【0057】上記アッセイの最後のステップにおいて、元の細胞溶解産物サンプル中に存在するCDKリン酸化Rbタンパク質の量を、上記プレート中に存在する標識された2次抗体の量を定量することにより計測する。各ウェルに、100µlのアルカリ・ホスファターゼ基質CDP-Star Sapphire II (Cat. # MS 100RX, Tropic, Bedford, MA)を添加し、上記プレートを室温で20分間シェーカー上でインキュベートし、そして次にその発光シグナルを、発光計(Dynex Technologies, Old Dominion Laboratories, Chantilly, VA)上で計測した。

【0058】図1中に示すように、細胞内CDK2とCDK4活性は、血清飢餓細胞内への栄養素の投与後に上昇し、そしてまた、CDK活性の知られたインヒビター、オロモウシンとの接触後投与量に依存して低下した。これらの結果は、細胞分裂サイクル調節に関連したCDK活性における生理学的に関連する変化の計測における本アッセイ法の有用性を証明する。オロモウシンとの細胞接触後のCDK活性における低下は、上記アッセ

*イが、細胞レベルにおいてCDK活性における作用物質により誘導される変化を首尾よく検出することができるということを証明する。本発明のアッセイ法は、CDK活性のモジュレーター、特に細胞内レベルにおいてCDK活性を調節することができるものを同定するためのスクリーニング・アッセイにおいて有用である。

【0059】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

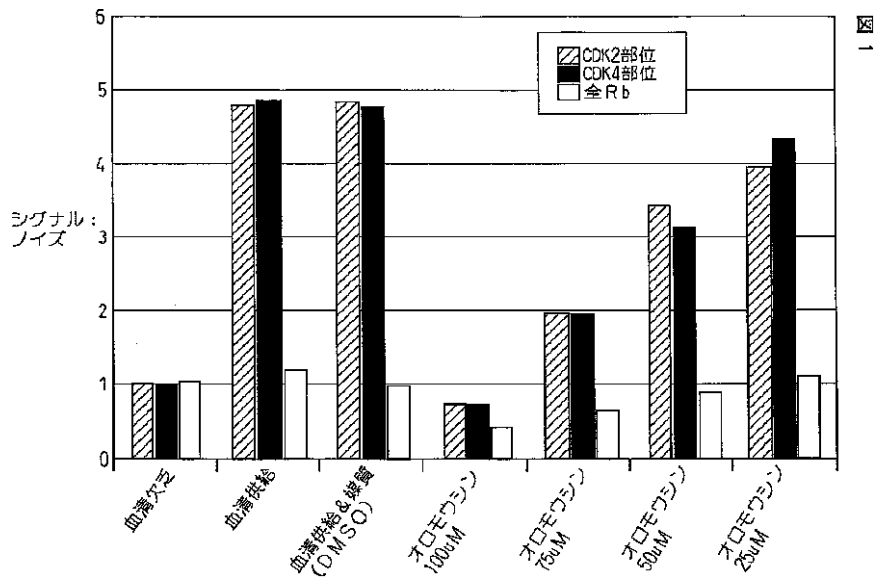
<110> Foster, Barbara
        Rastinejad, Farzan
<120> Assay Methods for Cyclin D
dependent Kinases
<130> PC10583
<140> B015844
<141> 2000-04-28
<160> 4
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> synthetic construct
<400> 1
Asn Gly Ser Pro Arg Thr Pro Arg Arg Gly
Gln Asn Cys
    1          5          10
<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> synthetic construct
<400> 2
Phe Glu Thr Gln Arg Thr Pro Arg Lys Ser
Asn Leu Asp Cys
    1          5          10
<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> synthetic construct
<400> 3
Tyr Leu Ser Pro Val Arg Ser Pro Lys Lys
Lys Gly Ser Thr
    1          5          10
<210> 4
<211> 14
<212> PRT

```

【図面の簡単な説明】
 【図1】図1は、T4400細胞におけるELISA-ベースのCDK活性アッセイの結果を示す棒グラフである。上記アッセイは、血清欠乏のままである細胞と比較した、血清欠乏細胞における血清再投与(血清供給)後

の細胞のCDK2とCDK4活性における有意な上昇を現す。しかしながら、上記アッセイは、ジメチルスルホキシド(DMSO)媒質中に溶解された25~100μMオロモウシンで処理された細胞内での上記血清誘導効果の投与量依存性阻害をも現す。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード [*] (参考)
A 6 1 P 37/04		A 6 1 P 37/04	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/48		C 1 2 Q 1/48	Z
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
33/50		33/50	Z

(72)発明者 パーバラ アン フォスター
 アメリカ合衆国, コネチカット 06340,
 グロトン, イースタン ポイント ロー
 ド, ファイザー グローバル リサーチ
 アンド デベロップメント

(72)発明者 ファーザン ラスティンジャッド
 アメリカ合衆国, コネチカット 06340,
 グロトン, イースタン ポイント ロー
 ド, ファイザー グローバル リサーチ
 アンド デベロップメント

F タ-ム(参考) 2G045 AA40 BB01 BB20 CB01 DA20
 DA36 DA78 FB03 FB07 HA16
 4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ27 QQ41
 QQ61 QQ89 QQ95 QR48 QR55
 QR56 QR77 QR84 QS33 QX02
 4C084 AA17 NA14 ZA012 ZA152
 ZA892 ZB092 ZC022 ZC202

【外国語明細書】

1. Title of Invention

Assay Methods For Cyclin Dependent Kinases

2. Claims

1. A method for measuring cyclin-dependent kinase (CDK) activity in a sample, said method comprising:
 - i) contacting said sample with an anti-retinoblastoma protein (Rb) capture antibody and isolating the capture antibody-Rb complex;
 - ii) contacting said capture antibody-Rb complex with an anti-Rb primary antibody and isolating the capture antibody-Rb-primary antibody complex; and
 - iii) measuring the amount of CDK-phosphorylated Rb in said sample by quantitating the primary antibody present in said capture antibody-Rb-primary antibody complex.
2. The method of claim 1, wherein said CDK is CDK2.
3. The method of claim 1, wherein said CDK is CDK4.
4. The method of claim 1, wherein said method measures intracellular CDK activity.
5. The method of claim 4, wherein said method measures CDK activity in a cultured cell.
6. The method of claim 4, wherein said method measures *ex vivo* CDK activity in a cell taken from an animal.
7. The method of claim 1, wherein said CDK activity is human CDK activity.
8. The method of claim 1, wherein said capture antibody is bound to a test plate.

9. A method of identifying an agent that modulates CDK activity in a cell, said method comprising:
- i) contacting an agent with said cell;
 - ii) lysing said cell;
 - iii) contacting said cell lysate with an anti-retinoblastoma protein (Rb) capture antibody and isolating the capture antibody-Rb complex;
 - iv) contacting said capture antibody-Rb complex with an anti-Rb primary antibody and isolating the capture antibody-Rb-primary antibody complex; and
 - v) measuring the amount of CDK-phosphorylated Rb by quantitating the amount of primary antibody present in said capture antibody-Rb-primary antibody complex;
- wherein said agent modulates CDK activity if the amount of said CDK-phosphorylated Rb differs from a control cell not exposed to said agent.
10. The method of claim 9, wherein said method identifies an agent that decreases CDK activity.
11. The method of claim 10, wherein said agent is identified for the treatment of a disease or condition that is improved by inhibiting cellular proliferation.
12. The method of claim 11, wherein said disease or condition is selected from the group consisting of cancers, autoimmune diseases, viral diseases, fungal diseases, degenerative disorders, cardiovascular diseases, stroke, inflammatory disorders, and dermatological disorders.
13. The method of claim 9, wherein said agent increases CDK activity.
14. The method of claim 13, wherein said agent is identified for the treatment of a disease or condition that is improved by increasing cellular proliferation.

15. The method of claim 14, wherein said agent is used to treat neurodegeneration, to stimulate wound healing, or to stimulate immune system activity
16. The method of claim 9, wherein said CDK is CDK2.
17. The method of claim 9, wherein said CDK is CDK4.
18. The method of claim 9, wherein said method measures intracellular CDK activity.
19. The method of claim 9, wherein said method measures CDK activity in a cultured cell.
20. The method of claim 4, wherein said method measures *ex vivo* CDK activity in a cell taken from an animal.
21. The method of claim 9, wherein said CDK activity is human CDK activity.
22. The method of claim 9, wherein said capture antibody is bound to a test plate.
23. The method of claim 9, wherein a plurality of agents are tested, each agent in at least one of a plurality of cell samples.

3. Detailed Description of Invention

Background of the Invention

This invention relates to methods for measuring the activities of cyclin dependent kinases (CDKs). These kinases regulate the cell cycle and, therefore, play a role in cell growth and division. The methods of the present invention are particularly useful for measuring intracellular CDK activities.

The cell cycle has four defined sequential phases: G1 is the first gap phase in which the cell prepares for DNA replication; S phase is the phase of DNA synthesis during which a complete copy of the entire genome is generated; G2 is the second gap phase in which the cell prepares for division; and lastly, M phase (mitosis) is the period of cell division in which the two copies of DNA segregate to two daughter cells.

In order to regulate cell cycle progression, a CDK must be catalytically activated by forming a complex with a protein known as a cyclin. The expression profiles of different cyclins vary during the course of the cell cycle. Therefore, different CDK/cyclin complexes form and play significant regulatory roles at different stages of the cell cycle (Pavletich, *J. Mol. Biol.* 287: 821-828, 1999; Morgan, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261-291, 1997). For example, CDK2, CDK4, and CDK6 each combine with D type cyclins to regulate progression past the G1 restriction point, CDK2/cyclin E complexes regulate transition from G1 into S phase, CDK2/cyclin A complexes mediate the transition from S phase to G2, and CDK1 (also known as Cdc2) complexed with cyclin B or cyclin A drives the transition from G2 phase to M phase, and initiates mitosis.

In general, activated CDKs mediate their regulatory functions by phosphorylating cellular proteins, usually on serine or threonine residues. For example, CDK1 (cdc2), CDK2, CDK4, CDK5, and CDK6 phosphorylate the nuclear retinoblastoma (Rb) protein, which leads to transcriptional activation in the cell and the eventual progression into S phase (Knudsen and Wang, *J. Biol. Chem.* 271: 8313-8320, 1996; Zarkowska and Mitnacht, *J. Biol. Chem.* 272: 12738-46, 1997; Kitagawa et al., *EMBO J.* 15: 7060-69, 1996; Connel-Crowley et al., *Mol. Cell Bio.* 8: 287-301,

1997). Prior to this CDK-mediated phosphorylation, Rb remains in a state of basal phosphorylation. In this basal state, Rb associates with the transcription factor E2F and thereby represses E2F-mediated transcription. However, prior to the onset of DNA synthesis in late G1, activated CDKs hyperphosphorylate Rb. Once hyperphosphorylated, Rb releases E2F, which allows E2F to activate the transcription of cell cycle-regulated genes and commit the cell to enter S phase (Zarkowska and Mittnacht, *supra*; Kitagawa et al., *supra*; Connell-Crowley et al., *supra*; and Lundberg and Weinberg, *Mol. Cell Bio.* 18: 753-61, 1998).

Perturbations in CDK regulation can result in abnormal cell growth; inhibitors of cellular CDK activity can cause the arrest of the cell cycle (Dyrlacht, *Nature* 389: 149-52, 1997; Fisher, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 32-38, 1997; Morgan, *Nature* 374: 131-34, 1995; Serrano et al., *Nature* 366: 704-07, 1993; Kamb et al., *Science* 264: 436-40, 1994; Nobori et al., *Nature* 368: 753-56, 1994; Levine, *Cell* 88: 323-31, 1997; Porter et al., *Nature Med.* 3: 222-25, 1997; Hunter and Pines, *Cell* 79: 573-82, 1994; Sherr, *Science* 274: 1672-77, 1996; Wolffe et al., *Science* 269: 1281-84, 1995; Zuo et al., *Nature Genet.* 12: 97-99, 1996; and Sellers et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 11544-48, 1995). Therefore, compounds that modulate CDK activity are useful in regulating cellular proliferation and may also be useful as therapeutic agents.

The methods currently available for measuring CDK activities and identifying agents that modulate such activities have typically involved measuring CDK phosphorylation of a substrate *in vitro* in the presence and absence of test compounds. However, such tests provide no information regarding whether the test agent has the ability to inhibit any physiologically relevant CDK activity within a cell. Therefore, there is a need for methods to assess the intracellular CDK activities and the ability of agents to modulate such activities.

Summary of the Invention

The present invention provides novel methods for measuring the activity of one or more cyclin dependent kinases (CDKs) in a sample, based upon the quantitation of CDK-phosphorylated Rb protein. The method for measuring cyclin-dependent kinase (CDK) activity includes the following: i) contacting the sample with an anti-

retinoblastoma protein (Rb) capture antibody that specifically recognizes a CDK-phosphorylated Rb and isolating the capture antibody-Rb complex; ii) contacting the capture antibody-Rb complex with an anti-Rb primary antibody and isolating the capture antibody-Rb-primary antibody complex; and iii) measuring the amount of CDK-phosphorylated Rb in the sample by quantitating the primary antibody present in the capture antibody-Rb-primary antibody complex.

In preferred embodiments, the capture antibody is bound to a test plate, preferably a multi-well test plate, the method measures intracellular CDK activity, preferably, the CDK activity of cultured cells or the *ex vivo* activity of a tissue sample taken from an animal. In other preferred embodiments, the method assays CDK2 activity or CDK4 activity, and the CDK activity measured is human.

A second aspect of the present invention features methods of identifying agents that modulate the activity of a CDK in a cell. The method includes i) contacting an agent with the cell; ii) lysing the cell; iii) contacting the cell lysate with an anti-retinoblastoma protein (Rb) capture antibody that specifically recognizes CDK-phosphorylated Rb and isolating the capture antibody-Rb complex; iv) contacting the capture antibody-Rb complex with an anti-Rb primary antibody and isolating the capture antibody-Rb-primary antibody complex; and v) measuring the amount of CDK-phosphorylated Rb in the sample by quantitating the amount of said primary antibody in the capture antibody-Rb-primary antibody complex; wherein the agent modulates CDK activity if the amount of the CDK-phosphorylated Rb differs from a control cell lysate not contacted with the agent.

In a preferred embodiment, the method identifies a CDK inhibitor for the treatment of a disease or condition that is improved by inhibiting cellular proliferation, for example, cancers, autoimmune diseases, inflammatory disorders, degenerative disorders, such as macular degeneration and nephropathy, cardiovascular diseases, stroke, viral diseases, fungal diseases, and dermatological disorders, such as psoriasis. In an alternative preferred embodiment, the method identifies a CDK agonist for the treatment of a disease or condition that is improved by increasing cellular proliferation, for example, neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, or to stimulate wound healing or immune system activity.

In other preferred embodiments of the second aspect of the invention, the capture antibody is bound to a test plate, preferably a multi-well test plate, and the CDK activity measured is human CDK. Preferably, the method assays CDK2 activity or CDK4 activity. In other preferred embodiments, the agent is contacted with cultured cells or the agent is administered to an animal and the *ex vivo* activity is measured in a tissue sample taken from the animal. An additional preferred embodiment of the second aspect of the invention is its incorporation into a high throughput screen. This screen involves testing a plurality of agents, with at least one agent in each of a plurality of cell samples. For convenience, agents may also be initially pooled together in a single cell sample to test their effects.

By "cyclin-dependent kinase activity" or "CDK activity" is meant the enzymatic activity that results in the phosphorylation of retinoblastoma (Rb) protein at one or more of the following serine (Ser) or threonine (Thr) residues: Ser249; Thr252; Thr356; Ser612; Ser780; Ser807; Ser811; and/or Thr 821. Examples of CDKs that have such activity include CDK2, which phosphorylates Ser249, Thr252, Thr356, Ser612, Ser807, Ser811, and Thr 821, and CDK4, which phosphorylates Ser780.

By "capture antibody" or "anti-phosphoRb antibody" is meant an antibody that specifically recognizes Rb protein, but only if the Rb is phosphorylated by CDK activity at one or more of the following serine (Ser) or threonine (Thr) residues: Ser249; Thr252; Thr356; Ser612; Ser780; Ser807; Ser811; and/or Thr 821.

By "anti-Rb primary antibody" is meant an antibody that specifically recognizes Rb protein, but in a phosphorylation-independent manner.

By "quantitating the amount of primary antibody" is meant a method of measuring the amount of anti-Rb primary antibody using a detectable label such as alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, β -galactosidase, biotin, Europium or a radiolabel. The label may be conjugated to a secondary antibody that specifically recognizes the primary antibody. Alternatively, the label may be conjugated to the primary antibody. In the case of alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, or β -galactosidase, the method of quantitation relies on the use of a substrate that produces a chemiluminescent, chromogenic, or fluorescent signal in response to the enzymatic activity. In the case of biotin, the quantitation relies on the interaction between biotin

and either streptavidin or avidin. And, in the case of radiolabel, quantitation relies on radioactive counting or autoradiography.

By "differs" is meant varying in a statistically significant manner ($p < 0.1$). The probability that the variation between samples is nonrandom can be determined by statistical calculations well known in the art.

By "increases" or "decreases" CDK activity is meant a statistically significant variation in mean value above or below, respectively, the control mean value. Preferably, the variation from the control mean value is at least 25%, more preferably, at least 50%, and most preferably, at least 75%.

The invention provides a number of advantages. For example, the present method can be used to provide information regarding the level of intracellular CDK activity. The method provides more physiologically relevant information on CDK activity than other methods known in the art, which typically analyze *in vitro* CDK activity. Therefore, the present method is useful when studying changes in intracellular CDK activity over the course of the cell cycle or to identify compounds that modulate CDK activity in cultured cells or in animals.

The identification of novel CDK inhibitors also provides the benefit of creating a pool of cell cycle regulators that can be used to modulate cellular proliferation for the following therapeutic advantages: 1) when used as antitumor agents, the CDK inhibitors generate little risk of secondary tumor development because they lack direct DNA interaction; 2) the CDK inhibitors provide candidate therapies to treat conditions (e.g., viral infections) in which CDK activity is not misregulated, but is nonetheless essential for maintenance of the condition; and 3) the CDK inhibitors may be used to protect normal cells from the toxicity of cycle-specific chemotherapeutic agents which occurs in S-phase, G2, or mitosis, by preventing cell cycle progression in the normal cells (Stone et al., *Cancer Research* 56: 3199-202, 1996; Kohn et al., *Journal of Cellular Biochemistry* 54: 440-52, 1994).

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and from the claims. While the invention is described in connection with specific embodiments, it will be understood that it is capable of further modifications. Therefore, this application is intended to cover any variations, uses, or

adaptations of the invention that follow, in general, the principles of the invention, including departures from the present disclosure that come within known or customary practice within the art. All publications mentioned in this description are herein incorporated by reference.

Description of the Figures

Figure 1 is a bar graph that demonstrates the results of an ELISA-based CDK activity assay in T47D cells. The assay reveals a significant increase in cellular CDK2 and CDK4 activity following serum readministration in serum-deprived cells (serum-fed) as compared to cells that remain serum-deprived (serum-deprived). However, the assay also reveals a dose-dependent inhibition of this serum-induced effect in cells treated with 25-100 μ M olomoucine dissolved in a dimethylsulfoxide (DMSO) vehicle.

Detailed Description

Assay Protocol

The present invention features methods for measuring CDK activity by quantifying the amount of retinoblastoma (Rb) protein that is phosphorylated by CDK activity at one or more of the following serine (Ser) or threonine (Thr) residues: Ser249; Thr252; Thr356; Ser612; Ser780; Ser807; Ser811; or Thr 821. Examples of specific CDKs that can be assayed by the present methods include CDK2 (which phosphorylates Rb protein at Ser249, Thr252, Thr356, Ser612, Ser807, Ser811, and Thr 821) and CDK4 (which phosphorylates Rb protein at Ser780). Of particular note, the methods of the present invention can be used in a cell-based assay to assess intracellular CDK activity. Thus, the present methods may be used, for example, to assess CDK activity in cultured cells derived from an immortalized cell line, a primary cell line, or from a tissue sample excised from an animal, preferably, a mammal. In addition, the methods of the present invention can also be used in screening assays to identify agents that modulate CDK activity in cultured cells or in the cells of an animal by pre-exposing the cells or animal to the agent. Preferably, the screening assays are

high-throughput assays, and the animals represent a disease model, such as a rodent tumor model.

As a first step in quantitating CDK-phosphorylated Rb in a sample, the methods of the present invention employ the use of "capture" antibodies that specifically react with Rb proteins that are phosphorylated at one or more of the following residues: Ser249; Thr252; Thr356; Ser612; Ser780; Ser 807; Ser811; and Thr821. For example, CDK2 activity is assessed using one of the following antibodies: an antibody specific for Rb phosphorylated at Ser807 and/or Ser811 (Cat. #9308, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA); one specific for Rb phosphorylated at Ser249 and/or Thr252 (e.g., made with the following KLH-conjugated peptide antigen: Acetyl-NG[pS]PR[pT]PRRGQNC-amide (SEQ ID NO:1)), one specific for Rb phosphorylated at Thr356 (e.g., made with the following KLH-conjugated peptide antigen: Acetyl-FETQR[pT]PRKSNLDC-amide (SEQ ID NO:2)), one specific for Rb phosphorylated at Ser612 (e.g., made with the following KLH-conjugated peptide antigen: YLSPVR(pS)PKKKGST (SEQ ID NO:3)), or one specific for Rb phosphorylated at Thr821 (e.g., made with the following KLH-conjugated peptide antigen: SEGLP(pT)PTKMTPRS (SEQ ID NO:4)). Similarly, an antibody specific for Rb phosphorylated at Ser780 (e.g., Cat. #9307S, New England Biolabs, Beverly, MA; Code # 555, Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) is employed to assess CDK4 activity. It is preferred that the capture antibody be polyclonal.

After the CDK-phosphorylated Rb protein in the test sample is complexed with the capture antibody, the complex is isolated from the remaining sample. To isolate this complex, it is preferred that the capture antibody is first attached to a solid phase support, for example, a multi-well plate or a bead, by standard methods known in the art (see, e.g., Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons, New York, NY, 1999). Examples of solid phase supports that can be used for antibody attachment include, in order of preference, Nunc Maxisorb plates, Nunc Polysorb plates, and protein A coated plates (VWR Scientific, Bridgeport, NJ). To attach the capture antibody to the solid phase support, the capture antibody is diluted in a buffer such as 0.05 M carbonate-bicarbonate pH 9.6 (Cat. # C-3041, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) to approximately 10 μ g/ml. This antibody dilution is then applied to the

plate and incubated for a time ranging from approximately 4 hours to overnight at 4°C. The antibody-bound support is washed in a 25 mM Trizma base (Tris) or a 50 mM N-(2-hydroxyethyl)-N'-(2-ethanesulfonic acid) (Hepes) based buffer (pH 7.4-7.8) containing salt (e.g., 100-150 mM NaCl) and a small amount of detergent (e.g., 0.02-0.1% Tween-20) (all of the wash buffer components are available from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). An exemplary wash buffer is an imidazol wash buffer (Cat. # 50-63-01, KPL, Inc., Gaithersburg, MD). (In the event that an alkaline phosphatase detection system is used in a subsequent step of this assay, phosphate buffered saline is not recommended as an incubation or wash buffer.)

Following the wash step, the capture antibody-bound support is incubated with a blocking buffer for approximately 0.5-2 hours at room temperature. Exemplary blocking buffers include, in order of preference, Superblock #37515 (Pierce Chemical, Rockford, IL), SuperBlock #37535 (Pierce Chemical, Rockford, IL), 0.2% Casein (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in Tris buffered saline (TBS) (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris Base pH7.6; all components available from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and 0.1% Tween-20, and 0.05% skim milk in TBS and 0.1% Tween-20 (all of the incubation buffer components are available from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Subsequent to the aspiration of the blocking buffer from the capture antibody-bound support, the next step is contact with the test sample.

When the intracellular activity of a CDK is measured by the methods of the present invention, the test sample comprises a cell lysate derived from a cell line or animal tissue that was subjected to the desired experimental conditions. Any cells and cell lines with normal growth regulation express Rb protein and CDKs, and can, therefore, be used in the present assay. Many tumor cell lines, such as U2OS osteosarcoma cells, Colo 205 colorectal carcinoma cells, and DLD-1 colorectal cells, also express Rb and CDKs and may be used. However, care must be taken to synchronize the tumor cells, if synchronization is relevant to the CDK to be assayed (as in the case of CDK2). Examples of tumor cell lines that can be synchronized by serum deprivation include T47D breast carcinoma cells and MDA-MB-231 breast carcinoma cells. It is preferred that cells can be synchronized within 24 hours of serum deprivation. An exemplary medium that is applied to cells to induce synchronization is

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) that is phenol red free (Cat. # 21063-029, Life Technologies, Rockville, MD), with 0.1% bovine serum albumin (BSA) (Cat. #A3294, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), P/S/G (2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) (Cat. #61146, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). If cells do not require synchronization, they may be cultured in standard growth media, such as DMEM (Cat. # 11965-092, Life Technologies, Rockville, MD), 10% fetal bovine serum (FBS)(Cat. #16140-071, Life Technologies, Rockville, MD), and P/S/G. Tumor cell lines and normal cell lines are publicly available from sources such as the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and Clonetics (Walkersville, MD).

Primary cell preparations, such as fibroblasts derived from rat or mouse embryonic tissue may also be used to assess CDK activity by the present methods. These fibroblasts may be isolated using the following exemplary procedure. Under sterile conditions the embryonic spleen, liver, heart, lungs, and (if more than 16 days old) head are removed. The remaining tissue is transferred to a Petri dish with 10-15 ml of a 0.04% trypsin solution (Gibco BRL, Grand Island, NY) at approximately 37°C. The tissue is minced finely, the tissue/trypsin mixture is transferred to a Erlenmeyer flask, and 20-30 ml of fresh trypsin is added to the flask. Following an incubation in a water bath (37°C) for approximately 30 minutes, the trypsin is removed and the suspended cells are removed from the flask and added to 50 ml centrifuge tubes. An equal volume of DMEM-high glucose (Life Technologies, Rockville, MD) with 10% FBS (DMEM-H + FBS) is added to the tubes. To the remaining tissue precipitate in the flask, 20-30 ml of trypsin is added and the trypsination step is repeated. The suspended cells are then aspirated, transferred to centrifuge tubes, and resuspended with an equal volume of DMEM-H + FBS. All of the cell suspensions are then centrifuged at 300xg for 10-15 minutes. The supernatant is aspirated off and the cells are resuspended in fresh DMEM-H + FBS. Cells may then be cultured in plates. The media is changed after 24 hours and the cells are passaged 1:3 when confluent. To store cells, they may be frozen when approaching confluence.

To conduct assays to determine whether an agent affects the activity of a CDK in a cell, the agent is first dissolved in a vehicle such as water, dimethylsulfoxide

(DMSO), or trifluoroacetic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). For application to cultured cells, the agent in vehicle is first diluted in cell growth medium to achieve the desired concentration or range of concentrations, which typically fall within the range of 0-100 μ M. Examples of the growth medium used include DMEM, McCoy's medium, or minimal essential medium (Life Technologies, Rockville, MD). The chosen medium is optimized for the particular cell line used in the assay, and may include specific growth factors. For some cells such as keratinocytes, cell-specific optimal growth media are commercially available (Cat. # 3001, 3004, 3107, and 3115, Clonetics, Walkersville, MD).

Given that most cells have a 16-36 hour cell cycle, it is preferred that cultured cells are incubated with the agent for 16-24 hours, more preferably, 16-21 hours, in order to maximize any possible effect on cell cycle progression, as measured by CDK phosphorylation of Rb protein. The cells are then lysed in a detergent containing buffer, such as a 50 mM HEPES buffer pH 7.6, containing 0.1% NP-40, 250 mM NaCl, 5 mM NaF, 1 mM dithiothreitol (DTT) (all above components of the lysis buffer are available from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and a combination of protease inhibitors. Typically, the combination of protease inhibitors includes inhibitors that are effective against serine-, cysteine-, and metallo-proteases in bacterial, mammalian, yeast, and plant cell extracts. An exemplary combination is pefabloc SC (0.1-1.0 mg/ml), leupeptin (0.5 μ g/ml), aprotinin (0.06-2.0 μ g/ml), and pepstatin (0.7 μ g/ml) (all protease inhibitors are available from Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Commercially available combinations of protease inhibitors are mixed together in concentrated tablet form (Cat. #1697498, (Boehringer Mannheim) Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) for convenient addition to a stock lysis buffer to create the desired protease combination. Another exemplary lysis buffer is a 25 mM Bicine buffer pH 7.6 (Cat. #78501T, Pierce Chemical, Rockford, IL), which can be used following the addition of DTT (1 mM) and a combination of the above-described protease inhibitors.

When assessing the effect of an agent following administration to a whole animal, the nude mouse is the preferable cancer model to use. The mice are inoculated subcutaneously in the lower abdomen with approximately 5 million tumor

cells (e.g., Colo 205 or HCT 116 colorectal carcinoma cells in a total volume of 200 μ l phosphate buffered saline (Life Technologies, Rockville, MD). When the tumors grow to approximately 100-200 mm³, the agent is administered through the desired route, e.g., intraperitoneally, subcutaneously, intravenously, or orally. When the *in vivo* kinetics of the agents are unknown, it is preferred that they be administered continuously to achieve steady state before testing. For example, the agents may be administered by osmotic mini-pumps (Alzet Model 2001, 7-day pump, Alza Corp, Newark, DE) containing the test agent. These pumps are implanted in anesthetized mice (e.g., 50 mg/kg nembutal, intraperitoneal). The test agents are first dissolved in an appropriate vehicle such as cyclodextrin, propylene glycol:DMSO (1:1), or 5% gelucine, etc. Tissues from the animals are later studied, for example, on day 5 post-implantation. Tumor cells and/or other tissues are removed and stored in liquid nitrogen. Plasma is saved for analysis of agent concentration. Further analysis of CDK activity is then determined by assessing Rb protein phosphorylation, as described herein. Cells are first pulverized in a liquid nitrogen-cooled pulverizer and then suspended in the previously described lysis buffer. Samples are vortexed and then centrifuged at 8,000xg for approximately 10 minutes at 4°C. The protein concentration of the supernatant is determined by protein assay (Cat. #500-0006, Biorad, Hercules, CA). Samples are diluted to 100 μ g/ml and 100 μ l/well is added to the multiwell test plate. In all cases the level of phosphorylated Rb is correlated with the plasma level of the agent to determine if the agent affects CDK level.

Whether the cell lysate is derived from cultured cells or a tissue sample, the cell lysate is added to the capture antibody-bound plates and is incubated for approximately 1-3 hours at room temperature. It is preferred that all incubations are performed on a low speed shaker at 30-200 revolutions/minute. The cell lysate is aspirated and an anti-Rb primary antibody, diluted to approximately 1-5 μ g/ml in an incubation buffer such as 1% casein in TBS pH 7.4-7.8, with or without 0.1% Tween-20, is added to the capture antibody-bound plates.

The primary antibody recognizes Rb protein in a phosphorylation-independent manner. Exemplary antibodies include a monoclonal antibody directed against a human Rb epitope between residues 300-380 (Cat. #14001A, Pharmingen,

San Diego, CA) and a monoclonal antibody directed against a human Rb epitope between residues 612-928 (Cat. #MK-15-1, Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan).

Depending on the antibody used, the antibody solution is incubated with the capture antibody-bound plate for approximately 1-3 hours at room temperature on a low speed shaker. In the case of the Pharmingen antibody (Cat. #14001A), the preferred incubation period is 2 hours. Following incubation, the plates are then washed multiple times (e.g., 3-6 times) with the previously described wash buffer.

Upon completion of this series of reagent incubations, the solid phase support contains bound capture antibody, complexed with CDK phosphorylated Rb protein, complexed with the primary antibody. To quantify the amount of CDK phosphorylated Rb protein that was originally present in the test sample, the amount of primary antibody contained in the plate-bound antibody complex is assessed using a standard detection system. This system of detection incorporates the use of a detectable label that is either conjugated to the primary antibody or to a secondary antibody that specifically recognizes the primary antibody. Examples of detectable labels include peroxidases, such as horseradish or soybean peroxidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase, chelated lanthanides, biotin, Europium and radiolabels.

Given the commercial availability of secondary antibodies conjugated to detectable labels, the use of one of these antibodies is the preferred method for detecting the primary antibody. Examples of secondary antibodies that are available for use in the present invention include a donkey anti-mouse alkaline phosphatase-labelled antibody (Cat. #715-055-150, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), or a goat anti-mouse horseradish peroxidase-labelled antibody (Cat. #12-349, Upstate Biotechnologies, Lake Placid, NY, and Cat. # 10767, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)), or a rabbit anti-mouse Europium-labelled antibody.

Alternatively, the primary antibody could itself be conjugated with a detectable label. Methods for conjugating alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, or β -galactosidase to an antibody, whether a primary or secondary antibody, are well-described in the literature (see, e.g., Porstmann et al., J. Immun. Meth. 79: 27-37, 1985; Imagawa et al., J. Appl. Biochem. 4: 41-57, 1982). In addition,

the antibody of choice could be radiolabelled (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996, 3rd ed.), or biotinylated (Ignatowski et al., *J. Exp. Ther.* 290: 863-70, 1999; Southwick et al., *Cytometry* 11: 418, 1990). Kits for conjugating a peroxidase or alkaline phosphatase label to an antibody are commercially available from Pierce Chemical (e.g., Cat. #'s 31487, 31488, and 31489, Rockford, IL). Similarly, kits are commercially available to conjugate an antibody to a biotin label (e.g., Cat. #C5585, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) or to a Europium label (e.g., Cat. # 1244-302, Wallac).

Exemplary methods for detecting the presence of such labelled antibodies are described in the literature (see, e.g., *Using Antibodies: A Lab Manual*, eds. Harlow and Land, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1999, and *Current Protocols in Immunology, Cell Biology, and Protein Science*, John Wiley & Sons, New York, NY, 1999). Briefly, the detection of the horseradish peroxidase label is achieved using a chromogenic substrate, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Cat. # 11557, Fluka (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)), as further described in Szutowicz et al., *Anal. Biochem.* 138: 86, 1984, Envall, *Methods Enzymol.* 70: 419, 1980, and Al-Kaissi and Mostratos, *J. Immunol. Methods* 58: 127, 1983. To detect the alkaline phosphatase label, a chromogenic substrate, nitroblue tetrazolium chloride 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt (BCIP-NBT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) can be used, or the chemiluminescent substrate CDP-Star Sapphire II (Cat. #MS100RX, Tropix, Bedford, MA) can be used, as described, for example, in Thompson and Larson (*BioTechniques* 12: 656, 1992). Europium chelates require an enhancement solution (Cat. #1244-114, Wallac). Given the sensitivity of an ELISA-based assay using a luminescent detection system, as further described in the example below, it is the preferred method of detecting CDK activity.

Test Agents or Compounds

A test agent or compound is identified as a CDK modulator if it changes the level of CDK-phosphorylated Rb in a sample in a statistically significant manner ($p < 0.1$)

as compared to a control sample, and produces a statistically significant change above or below the control mean value.

In general, agents or compounds which modulate CDK activity are identified from libraries of natural products, or synthetic (or semi-synthetic) extracts, chemical libraries, or individual compounds, and are produced according to methods known in the art. Examples of such extracts or compounds include, but are not limited to, naturally-occurring or synthetic chemical compounds, small organic or inorganic molecules, biological macromolecules (e.g., peptides, proteins, and nucleic acids), mixtures of chemical compounds, plant-, fungal-, prokaryotic-, or animal-based extracts, and fermentation broths.

Numerous methods are available for generating random or directed synthesis (semi-synthesis or total synthesis) of any number of chemical compounds, including, but not limited to, saccharide-, lipid-, peptide-, and nucleic acid-based compounds. The assays described herein are particularly useful in performing high-throughput screening assays, which accommodate the screening of large compound libraries.

Synthetic compound libraries are also commercially available, for example, from Brandon Associates (Merrimack, NH) and Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant, and animal extracts are commercially available from a number of sources, including Biotics (Sussex, UK), Xenova (Slough, UK), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, FL), and PharmaMar, U.S.A. (Cambridge, MA). In addition, natural and synthetic libraries are produced, if desired, according to methods known in the art, for example, by standard extraction and fractionation methods, organic synthesis, and methods of combinatorial chemistry.

When a crude extract is found to modulate CDK activity, further fractionation can be used to isolate and purify the chemical constituents responsible. Methods of fractionation and purification of such heterogeneous extracts will be known in the art in light of this disclosure. If desired, compounds identified as CDK modulators can be further modified, according to methods known in the art in light of this disclosure, to enhance their modulating effect or to reduce toxicity.

Therapeutic Applications for Modulators of CDK Activity

Agents or compounds identified by the methods of the present invention as agonists or antagonists of CDK activity have several therapeutic applications. For example, agents or compounds identified as CDK inhibitors are useful in the treatment of diseases such as cancers, autoimmune diseases, viral diseases, fungal diseases, degenerative disorders, cardiovascular diseases, stroke, inflammatory disorders, and dermatological disorders, as well as other diseases and conditions in which the inhibition of cellular proliferation is beneficial.

The CDK inhibitors are useful in the treatment of a variety of cancers, including the following: carcinoma, including that of the bladder, breast, brain, colon, kidney, liver, lung (including small cell lung cancer), esophagus, gall bladder, ovary, pancreas, stomach, cervix, thyroid, prostate, and skin (including squamous cell carcinoma), hematopoietic tumors of lymphoid lineage (including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Hodgkins lymphoma, non-Hodgkins lymphoma, hairy cell lymphoma and Burkett's lymphoma), hematopoietic tumors of myeloid lineage (including acute and chronic myelogenous leukemias, myelodysplastic syndrome and promyelocytic leukemia), tumors of mesenchymal origin (including fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma), tumors of the central and peripheral nervous system (including astrocytoma, neuroblastoma, glioma and schwannomas), and other tumors (including melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentosum, keratoacanthoma, and thyroid follicular cancer).

In addition to inhibiting the proliferation of cancerous cells, CDK inhibitors could act as reversible cytostatic agents which may be useful in the treatment of any disease or condition associated with abnormal or deleterious cellular proliferation, such as Kaposi's sarcoma, benign prostate hyperplasia, familial adenomatosis polyposis, neurofibromatosis, atherosclerosis, thrombotic microangiopathy syndromes, pulmonary fibrosis, arthritis, psoriasis, restenosis following angioplasty or vascular surgery, hypertrophic scar formation, inflammatory bowel disease, transplantation rejection, endotoxic shock, mesangial cell proliferative disorders (including glomerulonephritis).

diabetic nephropathy, glomerulopathies, malignant nephrosclerosis, organ transplant rejection, macular degeneration, fungal infections, and viral infections.

Of course, compounds identified as CDK agonists could also be used as therapeutic agents for diseases or conditions in which the stimulation of cellular proliferation is desired, such as to treat neurodegenerative disorders, for example, Alzheimer's disease, and also to stimulate wound healing and to stimulate immune system activity.

Agents that modulate CDK activity may be administered by any appropriate route. For example, administration may be parenteral, intravenous, intra-arterial, subcutaneous, intramuscular, intracranial, intraorbital, ophthalmic, intraventricular, intracapsular, intraspinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, by suppositories, or oral administration.

When administering therapeutic formulations comprising CDK modulators, the formulations may be in the form of liquid solutions or suspensions; for oral administration, formulations may be in the form of tablets or capsules; and for intranasal formulations, in the form of powders, nasal drops, or aerosols.

Methods well known in the art for making formulations are found, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences (ed. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th ed., 1990)

Example: ELISA-based Assay for CDK2 or CDK4 Activity

A solution containing a capture antibody diluted to 10 µg/ml in a 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6 (Cat. #C3041, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was applied to coat the wells of 96-well plates (100 µl/well, Nunc F96 MaxiSorp, VWR Scientific, Bridgeport, NJ) and incubated overnight at 4°C. For CDK2 assays, anti-phosphoRb antibody, which specifically recognizes Rb phosphorylated at Ser807 and Ser811, was used (Cat. #9308L, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA); for CDK4 assays, anti-phosphoRb antibody, which specifically recognizes Rb phosphorylated at Ser 780, was used (Cat. #9307S, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, or Code #555, Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan).

Breast carcinoma cells, T47D (HTB-133, ATCC, Manassas, VA, Depositor: I. Keydar), were cultured in 100 mm plates, trypsinized prior to confluence, and seeded in 96-well plates at 9,000 cells/200 μ l/well in DMEM (Cat. # 11965-092, Life Technologies, Rockville, MD), 10% fetal bovine serum (FBS) (Cat. #16140-071, Life Technologies, Rockville, MD), P/S/G (2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) (Cat. # G1146, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

For CDK2 assays, cells were cultured for one day and then synchronized by serum starvation as follows. Cell medium was aspirated, the cells were washed five times in Hanks Buffered Saline Solution (Cat. # 14025-092, Life Technologies, Rockville, MD). Cells were then incubated in DMEM without phenol red (Cat. #21063-029, Life Technologies, Rockville, MD), 0.1% BSA (Cat. #A3294, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and P/S/G for 24 hours. While control cells were maintained in 0.1% BSA/DMEM to establish a baseline (serum-deprived), test cells were refed with DMEM, 1% FBS, P/S/G, and incubated for 20-24 hours with 0, 25 μ M, 50 μ M, or 100 μ M olomoucine (Promega, Madison, WI) a known CDK inhibitor.

For CDK4 assays, cell synchronization was not required. Cells were cultured for two days in DMEM (Cat. #11965-092, Life Technologies, Rockville, MD), 10% FBS, P/S/G. The cell medium was then aspirated and 200 μ l fresh medium with 0, 25 μ M, 50 μ M, or 100 μ M olomoucine was added for a 20-24 hour incubation.

For both the CDK2 and CDK4 assays, olomoucine was first dissolved in a DMSO vehicle (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at concentrations ranging of 0, 25 mM, 50 mM, and 100 mM in the solvent. These solutions were then diluted 1:1000 in DMEM, 10% FBS, P/S/G before the olomoucine or control solution was added to the cells.

The cells plated in 96-well plates were washed three times in cold TBS (as previously described) and lysed with 120 μ l/well cold lysis buffer consisting of 50 mM HEPES buffer pH 7.6, 0.1% NP-40, 250 mM NaCl, 5 mM NaF, 1 mM DTT, and the protease inhibitors provided in protease tablets (Cat. #1697498, (Boehringer Mannheim) Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) The cell lysates were maintained at 4°C for the duration of the following blocking step performed on the capture antibody-bound plates. The plates were washed two times with 250 μ l/well

imidazol wash buffer (Cat. # 50-63-01, KPL, Inc., Gaithersburg, MD), and incubated with blocking buffer (Cat. # 37515, Pierce Chemical, Rockford, IL) for one hour at room temperature.

Upon completion of the blocking step, the blocking buffer was aspirated and 100 μ l of cell lysate was transferred to each well of the capture antibody-coated plates. The plates were placed on a shaker at the low speed setting (approximately 100 revolutions/minute) for a two hour incubation at room temperature. The plates were then washed six times in the above-described imidazol wash buffer.

The plates, with bound capture antibody-Rb complexes, were incubated with an anti-Rb monoclonal antibody (phosphorylation-independent) that recognizes an Rb epitope between amino acids 300-380 (Cat. # 14001A, Pharmingen, San Diego, CA). This primary antibody was diluted to 2 μ g/ml in 1% casein, TBS pH 7.6, 0.1% Tween-20 (all incubation buffer components are available from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). One hundred microliters of the solution was added to each well, and the plates were then incubated on the shaker at the low speed setting for two hours at room temperature. The plates were then washed six times with the imidazol wash buffer to isolate the capture antibody-Rb-primary antibody complex bound to the plate.

The final antibody incubated on the plate was a donkey anti-mouse alkaline phosphatase-labelled secondary antibody (Cat. #715-055-150, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). The secondary antibody was diluted 1:2000 in the incubation buffer consisting of 1% casein, in TBS pH 7.6, 0.1% Tween-20, and 100 μ l of the solution was added to each well. Following the incubation of the plates on the shaker at the low speed setting for one hour at room temperature, the plates were again washed six times with the imidazol wash buffer to isolate the capture antibody-Rb-primary antibody-secondary antibody complex.

In the final step of the assay, the amount of CDK-phosphorylated Rb protein present in the original cell lysate sample was measured by quantifying the amount of labelled secondary antibody present on the plate. To each well, 100 μ l of the alkaline phosphatase substrate CDP-Star Sapphire II (Cat. #MS100RX, Tropix, Bedford, MA) was added, the plates were incubated on a shaker for 20 minutes at room temperature,

and the luminescent signal was then measured on a luminometer (Dynex Technologies, formerly Dynatech Laboratories, Chantilly, VA).

As shown in Fig. 1, intracellular CDK2 and CDK4 activity increased following the administration of nutrients in serum-starved cells, and also decreased in a dose-dependent manner following contact with a known inhibitor of CDK activity, olomoucine. These results demonstrate the usefulness of the present assay methods in measuring physiologically relevant changes in CDK activity associated with cell cycle regulation. The reduction in CDK activity following cell contact with olomoucine demonstrates that the assay can successfully detect agent-induced changes in CDK activity at the cellular level. The present assay methods are useful in screening assays to identify modulators of CDK activity, especially those that can modulate CDK activity at the intracellular level.

SEQUENCE LISTING

<110> Foster, Barbara
Rastinejad, Farzan

<120> Assay Methods for Cyclin Dependent Kinases

<130> PC10583

B015844

<140> ~~60000000~~

<141> ~~2000-04-28~~
2001-04-27

<160> 4

<170> Patent In Ver 2.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 1

Asn Gly Ser Pro Arg Thr Pro Arg Arg Gly Gln Asn Cys
1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 2

Phe Glu Thr Gln Arg Thr Pro Arg Lys Ser Asn Leu Asp Cys
1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> synthetic construct

<400> 3

Tyr Leu Ser Pro Val Arg Ser Pro Lys Lys Lys Gly Ser Thr
1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> synthetic construct

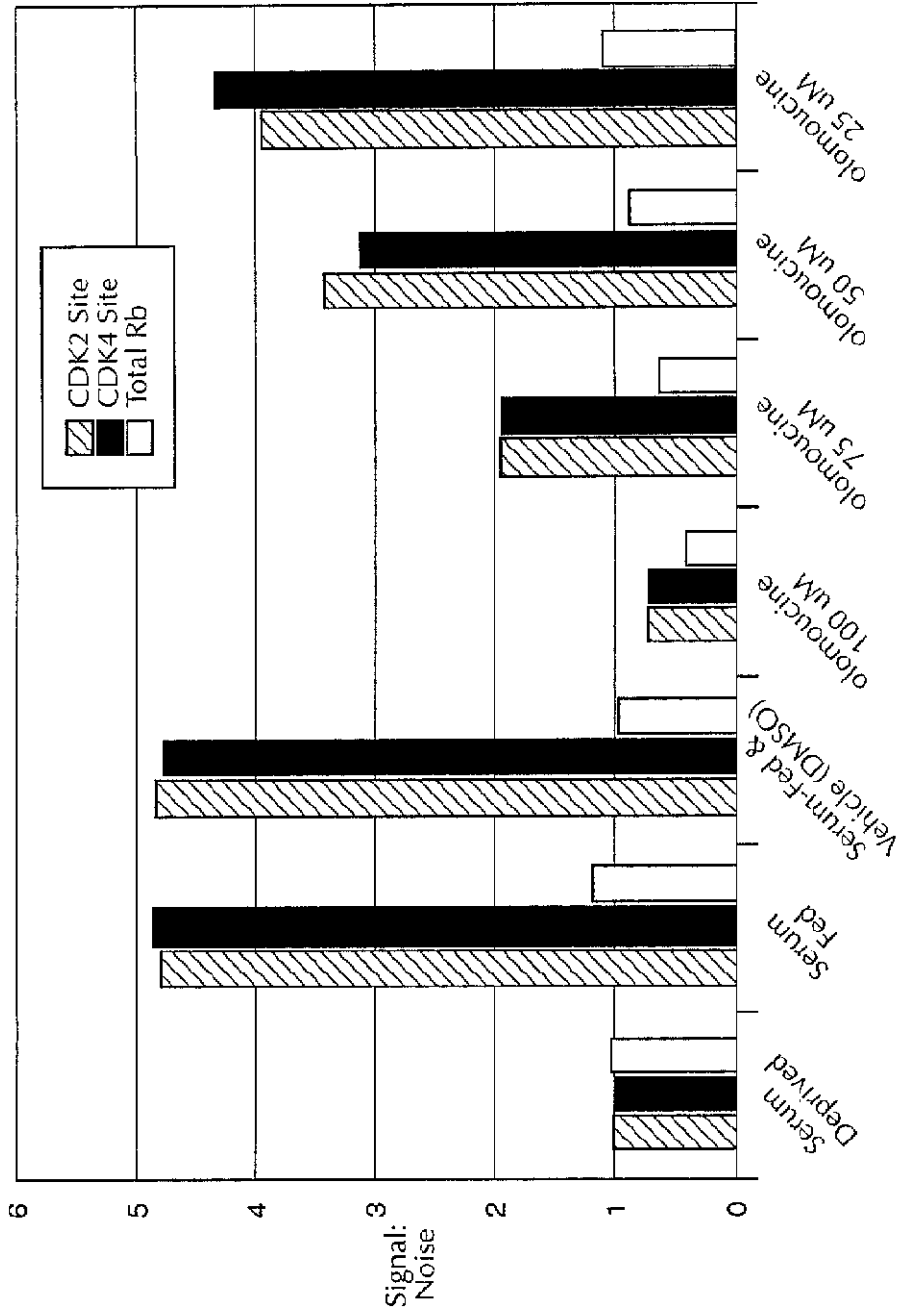
<400> 4

Ser Glu Gly Leu Pro Thr Pro Thr Lys Met Thr Pro Arg Ser
1 5 10

4. Brief Description of Drawing

Figure 1 is a bar graph that demonstrates the results of an ELISA-based CDK activity assay in T47D cells. The assay reveals a significant increase in cellular CDK2 and CDK4 activity following serum readministration in serum-deprived cells (serum-fed) as compared to cells that remain serum-deprived (serum-deprived). However, the assay also reveals a dose-dependent inhibition of this serum-induced effect in cells treated with 25-100 μ M olomoucine dissolved in a dimethylsulfoxide (DMSO) vehicle.

FIG. 1



1. Abstract

Disclosed herein are novel methods for measuring the activity of one or more cyclin dependent kinases (CDKs) in a sample, based upon the quantitation of CDK-phosphorylated Rb protein. The method for measuring cyclin-dependent kinase (CDK) activity includes the following: i) contacting the sample with an anti-retinoblastoma protein (Rb) capture antibody that specifically recognizes a CDK-phosphorylated Rb and isolating the capture antibody-Rb complex; ii) contacting the capture antibody-Rb complex with an anti-Rb primary antibody and isolating the capture antibody-Rb-primary antibody complex; and iii) measuring the amount of CDK-phosphorylated Rb in the sample by quantitating the primary antibody present in the capture antibody-Rb-primary antibody complex. These methods may be used to assess intracellular CDK activity in cultured cells or in cells taken from an animal. Also disclosed are methods of identifying an agent that modulates the CDK activity.

2. Representative Drawing

none

专利名称(译)	细胞周期蛋白依赖性激酶的测定方法		
公开(公告)号	JP2002350438A	公开(公告)日	2002-12-04
申请号	JP2001134538	申请日	2001-05-01
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	バーバラアンフォスター ファーザンラスティンジャット		
发明人	バーバラ アン フォスター ファーザン ラスティンジャット		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P17/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P37/04 A61P43/00 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/573		
CPC分类号	A61P17/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P37/04 A61P43/00 C12Q1/485 G01N33/5008 G01N33/5011 G01N33/502 G01N33/573 G01N2333/4736 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/53.D A61K45/00 A61P17/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P37/04 A61P43/00.111 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB01 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/HA16 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ27 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ95 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QR84 4B063/QS33 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA152 4C084/ZA892 4C084/ZB092 4C084/ZC022 4C084/ZC202		
优先权	60/205932 2000-04-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种基于CDK磷酸化Rb蛋白定量的样品中一种或多种细胞周期蛋白依赖性激酶（CDKs）活性的新颖方法。解决方案：本测量细胞周期蛋白依赖性激酶（CDK）活性的方法如下：i）使样品与特异性识别CDK磷酸化Rb的抗视网膜母细胞瘤蛋白（Rb）捕获抗体接触。让；ii）使捕获抗体-Rb复合物与抗Rb一抗接触并分离捕获抗体-Rb一抗复合物；iii）捕获抗体-Rb一抗复合物通过定量样品中存在的一抗来测量样品中CDK磷酸化Rb的量。该方法可用于评估培养细胞或动物细胞中的细胞内CDK活性。还公开了用于鉴定调节CDK活性的试剂的方法。

【図1】

