

(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2008-524133

(P2008-524133A)

(43) 公表日 平成20年7月10日(2008.7.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/00 Z N A	2 G O 4 5
<b>C12Q 1/48 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/48 Z	4 B O 6 3
<b>G01N 33/50 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/50 Z	4 H O 4 5
<b>G01N 33/15 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/15 Z	
<b>C40B 30/04 (2006.01)</b>	C 4 O B 30/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-545900 (P2007-545900)  
 (86) (22) 出願日 平成17年12月7日 (2005.12.7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年7月27日 (2007.7.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/013088  
 (87) 国際公開番号 W02006/063723  
 (87) 国際公開日 平成18年6月22日 (2006.6.22)  
 (31) 優先権主張番号 04029769.9  
 (32) 優先日 平成16年12月16日 (2004.12.16)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 397056695  
 サノフィーアベンティス・ドイツュラント  
 ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク  
 テル・ハフツング  
 ドイツ連邦共和国デー65929フラン  
 クフルト・アム・マイン, プリュニングシ  
 ユトラーセ50  
 (74) 代理人 100091731  
 弁理士 高木 千嘉  
 (74) 代理人 100127926  
 弁理士 結田 純次  
 (74) 代理人 100105290  
 弁理士 三輪 昭次  
 (74) 代理人 100140132  
 弁理士 竹林 則幸

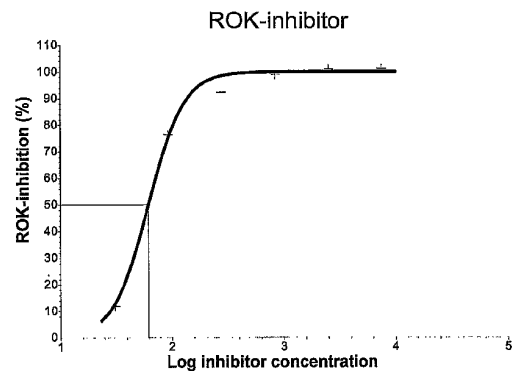
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RHOキナーゼ (ROK) 調節物質を同定するための、ハイスループット酵素免疫吸着アッセイ法 (HT-ELISA)

(57) 【要約】

本発明は、ビオチン化ペプチドを用いたROK (Rhoキナーゼ) タンパク質の活性測定のためのアッセイ方法に関する。

【選択図】 図4A



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

Rhoキナーゼ (ROK) タンパク質の活性を調節する化合物の同定のためのアッセイ方法であって、ここで、

- a) ROKタンパク質によりリン酸化を受けることができるペプチドを準備し；
  - b) ROKタンパク質を準備し；
  - c) a) からのペプチドがリン酸化されていた場合にこのペプチドを認識することができる抗体を準備し；
  - d) 化学的化合物を準備し；
  - e) a) からのペプチドを、このペプチドのリン酸化を可能にする条件下で、b) からのROKタンパク質および d) からの化学的化合物と共にインキュベーションし；
  - f) e) に従って行なったインキュベーションが終了した後、c) からの抗体をこのペプチドのリン酸化を検出するために使用し；
  - g) f) からの結果を、場合により、d) からの化学的化合物を存在させないで a) からのペプチド、b) からのROKタンパク質のインキュベーションを行なった試験からの結果と比較する、
- 上記方法。

10

## 【請求項 2】

工程 e)、f) および g) によるインキュベーションがELISAアッセイ法として行われる、請求項 1 に記載のアッセイ方法。

20

## 【請求項 3】

工程 e)、f) および g) によるインキュベーションがRIAアッセイ法として行われる、請求項 1 に記載のアッセイ方法。

## 【請求項 4】

工程 a) によるペプチドが15~25個のアミノ酸長を有する、請求項 1~3 のいずれかに記載のアッセイ方法。

## 【請求項 5】

工程 a) によるペプチドが以下のアミノ酸配列：GGGGAKRRRLSSLRASTSを有する、請求項 1~4 のいずれかに記載のアッセイ方法。

## 【請求項 6】

ペプチドがビオチニル化されている、請求項 5 に記載のアッセイ方法。

30

## 【請求項 7】

ROKタンパク質がヒト由来である、請求項 1~6 のいずれかに記載のアッセイ方法。

## 【請求項 8】

ROKタンパク質が組換え方法により製造される、請求項 1~7 のいずれかに記載のアッセイ方法。

## 【請求項 9】

ROKタンパク質活性を調節する化合物のハイスループットスクリーニングのための、請求項 1~8 のいずれかに記載のアッセイ方法の使用。

## 【請求項 10】

- a) ROKタンパク質によりリン酸化を受けることができるペプチド；
- b) ROKタンパク質；
- c) a) からのペプチドがリン酸化されていた場合にこのペプチドを認識することができる抗体；
- d) 場合により、c) からの抗体を認識することができ、および/または、標識系に結合した、第二抗体；
- e) 場合により、a) からのペプチドのリン酸化を実現するための試薬、緩衝液および/または器材、および/またはELISA装置、から成る部品のキット。

40

## 【請求項 11】

50

工程 a ) からのペプチドが15~25個のアミノ酸長を有する、請求項 10 に記載の部品のキット。

【請求項 12】

工程 a ) からのペプチドが以下のアミノ酸配列：GGGGAKRRRLSSLRASTSを有する、請求項 10 または 11 に記載の部品のキット。

【請求項 13】

ペプチドがビオチニル化されている、請求項 12 に記載の部品のキット。

【請求項 14】

ROKタンパク質がヒト由来である、請求項 10 ~ 13 のいずれかに記載の部品のキット

。

10

【請求項 15】

ROKタンパク質が組換え方法により製造される、請求項 10 ~ 14 のいずれかに記載の部品のキット。

【請求項 16】

a ) ROKタンパク質によりリン酸化を受けることができるペプチドを準備し；

b ) ROKタンパク質を準備し；

c ) a ) からのペプチドがリン酸化されていた場合にこのペプチドを認識することができる抗体を準備し；

d ) 場合により、c ) からの抗体を認識することができ、および/または、標識系に結合した、第二抗体を準備し；

20

e ) 場合により、a ) からのペプチドのリン酸化を実現するための試薬、緩衝液および/または器材、および/またはELISA装置を準備し、

f ) a ) ~ e ) からの成分を適宜包装し、そして部品のキットの成分と同時に、それにより提供されるROKタンパク質のアッセイ方法の操作手順を記述した手順書と組み合わせる、

請求項 10 ~ 15 のいずれかに記載の部品のキットの製造方法。

【請求項 17】

ROKタンパク質活性を測定するための、請求項 10 ~ 16 のいずれかに記載の部品のキットの使用。

【請求項 18】

ROKタンパク質活性を調節する化合物を同定するための、請求項 10 ~ 16 のいずれかに記載の部品のキットの使用。

30

【請求項 19】

ハイスループットスクリーニングのための、請求項 10 ~ 16 のいずれかに記載の部品のキットの使用。

【請求項 20】

以下のアミノ酸配列：GGGGAKRRRLSSLRASTSから成るペプチド。

【請求項 21】

ビオチニル化されている請求項 20 に記載のペプチド。

【請求項 22】

ROKタンパク質の活性を測定するための、請求項 20 または 21 に記載のペプチドの使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ビオチン化ペプチドを用いたROK (Rhoキナーゼ) タンパク質の活性測定のためのアッセイ方法に関する。

【発明の開示】

【0002】

本発明は、Rhoキナーゼ (ROK) 活性を調節する (促進する、減少させる、維持する) 化

50

合物の同定のためのアッセイ方法に関し、この方法は以下の：

- a) ROKタンパク質によりリン酸化を受けることができるペプチドを準備し；
  - b) ROKタンパク質を準備し；
  - c) a)からのペプチドがリン酸化されていた場合にこのペプチドを認識することができる抗体を準備し；
  - d) 化学的化合物を準備し；
  - e) a)からのペプチドを、このペプチドのリン酸化を可能にする条件下で、b)からのROKタンパク質およびd)からの化学的化合物と共にインキュベーションし；
  - f) e)に従って行ったインキュベーションが終了した後、c)からの抗体をこのペプチドのリン酸化を検出するために使用し；
  - g) f)からの結果を、場合により、d)からの化学的化合物を存在させないでa)からのペプチド、b)からのROKタンパク質のインキュベーションを行った試験からの結果と比較する、
- 各工程を含む。

【0003】

そうしたアッセイ方法は、ELISAまたはRIA（ラジオイムノアッセイ法）形式で容易に行うことができる。

【0004】

前記のアッセイ方法に関して、工程a)のペプチドは、15から25個のアミノ酸のサイズから成ることができる。このペプチドは、以下のアミノ酸配列：GGGAKRRRLSSLRASTSを含むかまたはそれから成ることができる。本アッセイ方法の工程a)は、例えば、ピオチニル化またはDNAもしくは抗体に連結しているような、化学的に修飾した形態で用いることができる。

【0005】

前記のアッセイ方法に関して、工程b)のROKタンパク質は、ヒトタンパク質によるアミノ酸配列を含むことができ、またはヒト生物的材料から誘導化もしくは採集できる。そうしたROKタンパク質は異なった技術、例えば、生物材料または組換的特性を含む処理工程を有する方法により製造することができる。前に開示した本発明のアッセイ方法は、例えば、ROKタンパク質の活性を調節する化合物のハイ・スループット・スクリーニング方法のために使用することができる。

【0006】

本発明はまた、以下の：

- a) ROKタンパク質によりリン酸化を受けることができるペプチド；
  - b) ROKタンパク質；
  - c) a)からのペプチドがリン酸化されていた場合にこのペプチドを認識することができる抗体；
  - d) 場合により、c)からの抗体を認識でき、および/または、標識系（例えば、アルカリ・ホスファターゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼ、ペルオキシダーゼ、他の酵素）に結合している二次抗体；
  - e) 場合により、a)からのペプチドのリン酸化を実現するための試薬、緩衝液および/または器具、および/またはELISA装置、
- からなる部品のキットにも関する。

【0007】

前記の部品のキットに関してa)のペプチドは、15から25個のアミノ酸のサイズから成ることができる。このペプチドは、以下のアミノ酸配列：GGGAKRRRLSSLRASTSを含むかまたはそれから成ることができる。本アッセイ方法の工程a)は、例えば、ピオチニル化またはDNAもしくは抗体に連結しているような、化学的に修飾した形態で用いることができる。前記のアッセイ方法に関して、工程b)のROKタンパク質は、ヒトタンパク質によるアミノ酸配列を含むことができ、またはヒト生物的材料から誘導化もしくは採集できる。そうしたROKタンパク質は異なった技術、例えば、生物材料または組換的特性を含む処

10

20

30

40

50

理工程を有する方法により製造することができる。

【0008】

本発明はさらに、前記の部品のキットの製造に関してあり、この製造方法において：

a) ROKタンパク質によりリン酸化を受けることができるペプチドを準備し；

b) ROKタンパク質を準備し；

c) a)からのペプチドがリン酸化されていた場合にこのペプチドを認識することができる抗体を準備し；

d) 場合により、c)からの抗体を認識することができ、および/または、標識系(例えば、アルカリ・ホスファターゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼ、ペルオキシダーゼ、他の酵素)に結合した、第二抗体を準備し；

e) 場合により、a)からのペプチドのリン酸化を実現するための試薬、緩衝液および/または器材、および/またはELISA装置を準備し、

f) a)~e)からの成分を適宜包装し、そして部品のキットの成分と同時に、それにより提供されるROKタンパク質のアッセイ方法の操作手順を記述した手順書と組み合わせる。

【0009】

前記の部品のキットは、例えば、ROKタンパク質の活性を測定するために、またはROKタンパク質の活性を調節する化合物の同定のために、またはハイ・スループット・スクリーニング方法のために使用することができる。

【0010】

本発明はさらに、以下のアミノ酸配列：GGGGAKRRRLSSLRASTSを含むかまたはそれから成るペプチドに関する。そうしたペプチドは化学的に修飾でき、例えばビオチン化できる。本発明はまた、そうしたペプチドのROKタンパク質の活性測定のための使用にも関する。

【0011】

本発明に関して化学的化合物とは、化学的合成または天然材料からの単離のいずれかにより製造された、あらゆる有機および/または炭水化物化合物を意味する。そうした化合物は50から5000ダルトンの間の分子量を有するだろう。

【0012】

タンパク質は、生物学的状況下、特に生細胞の一部として、活性を発揮するための条件下にある場合、本発明との関連において機能的であるとみなされるべきである。そうした活性は、例えばアッセイ方法により、検出可能である。例えば、トランスポーターは、このトランスポーターが化合物、特にこのトランスポーターの生物学的基質を、細胞外部からこの細胞の内部のコンパートメントへと移動させる場合、またはその逆の場合、機能的である。イオントランスポータータンパク質の生物学的基質は、例えば、1価および/または2価のイオンまたは他のイオンから成っている。グルコーストランスポータータンパク質の基質は、例えば、グルコースである。多剤耐性タンパク質の基質は、例えば、単独の薬物またはグルタチオンもしくはグルコネートに結合した薬物である。

【0013】

本発明との関連で、タンパク質の取り扱いは、John Wiley & Sonsにより発行された「タンパク質科学の最新実験手順書」(John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L., Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield編；0-471-11184-8-ルーズリーフ；0-471-14098-8-CDROM)からの準拠する実験手順書を用いて、当業者が実施することができる。

【0014】

例えば、クローニング、細胞の形質転換、配列決定、プロモーターの修飾、発現タンパク質等、のような分子生物学に関する技術操作は、John Wiley & Sonsにより発行された「分子生物学の最新実験手順書」(Fred M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl編；0-471-50338-X-ルーズリーフ；0-471-306614CDROM)からの準拠する実験手順書を用いて、当業者が実施することができる。

【0015】

10

20

30

40

50

生物学的材料は、遺伝情報を含み、そしてそれ自身で複製できるかまたは生物学的組織中で複製される、あらゆる材料を意味する。組換えの生物学的材料とは、組換え技術により、生産され、変換されまたは修飾された、あらゆる生物学的材料である。組換え技術は、例えば、John Wiley & Sonsにより発行された「分子生物学の最新実験手順書」(ISBN : 0-471-50338-X-ルーズリーフまたは0-471-30661-4-CD-ROM)のような教科書で定義されている。

## 【0016】

生物細胞の操作は、John Wiley & Sonsにより発行された「細胞生物学の最新実験手順書」(Juan S. Bonifacino, Mary Dasso, Jennifer Lippincott-Schwartz, Joe B. Harford, Kenneth M. Yamada編 ; 0-471-24108-3-ルーズリーフ ; 0-471-24105-9-CDROM)からの準拠する実験手順書を用いて、当業者が実施することができる。

## 【0017】

〔実施例〕

Rho - キナーゼ (ROK) は、心血管系疾患のための非常に良く確認された標的を意味する。それゆえに、特異的なROK阻害剤の検索は、心血管領域で仕事をしている多くのグループの中心課題である。今回、我々は、ROK活性に特異的な、ELISAの開発をここに記載する。このROK - ELISAはROKリン酸化ペプチドの量を検出する。ROK阻害剤は、ROK活性を阻害し、そしてそれによりROKが介在するペプチドのリン酸化の量を減少させる。ROK - ELISAは、中規模スループットの96穴フォーマットで、ならびに、ハイスループットの384穴フォーマットで開発された。

## 【0018】

実験手順：

保存溶液：

ビオチニル化S6ペプチド：トリス緩衝液25mM pH8.0中に1ml (5mg/ml)のアリコットで、-20 で保存。

組換え活性型ROK：10µl (1mg/ml)のアリコットで、-20 で保存。

## 【0019】

【表1】

ATP	100mM	シグマ、カタログ番号A-6419、ロット番号29H7051	-20°C
停止溶液	3N HCL	塩酸標準溶液 (シグマ)	室温
MgCl <sub>2</sub>	1 M	MgCl <sub>2</sub> (シグマ)	室温
BSA	10%	シグマ	-20°C
DTT	1 M	シグマ	-20°C
ODP-ペルオキシダーゼ基質		シグマ	2-8°C
スーパーブロック緩衝液	+0.2% ツイーン20	スーパーブロック (TBS中のブロック用緩衝液 ; ピアス、カタログ番号37535)、ツイーン20	2-8°C
洗浄用緩衝液 (PBS)	PBS 1× + 0.2% ツイーン20	CaCl <sub>2</sub> を含まないPBSおよびMgCl <sub>2</sub> 、ギブコ番号2006-01、ツイーン20	2-8°C
反応用緩衝液	25mM トリス pH 7.4 ; 0.02% BSA ; 2mM DTT		用時調製のみ

## 【 0 0 2 0 】

- 1) ストレプトアビジン被覆ウエルにビオチン化S6ペプチドを0.5ng / ウエル用いて、2時間または終夜室温でコーティングする。
- 2) PBSを100  $\mu$ l / ウエル用いて、過剰のS6ペプチドを三回洗い流す。
- 3)  $MgCl_2$ を含む反応用緩衝液中で所望の濃度で10  $\times$  ATP溶液を、氷上で調製する。
- 4) ROKを反応用緩衝液中に氷上で希釈し、最終濃度を10ng / ウエルとする。
- 5) 所望の濃度で10  $\times$  基質溶液を調製する。

## 【 0 0 2 1 】

ROK - ELISA 96 - 穴フォーマット

総体積 = 100  $\mu$ l

- 1) 所望の最終濃度の阻害剤 (10  $\times$  濃縮溶液の10  $\mu$ l) をROKの80  $\mu$ lと共に10分間、プレートインキュベートする。
- 2) 所望の最終濃度で10  $\times$  濃縮ATP溶液の10  $\mu$ l ATPを加える。
- 3) プレートを30 で1時間インキュベートする。
- 4) 500mM EDTA溶液の100  $\mu$ lを用いてキナーゼ反応を停止する。
- 5) 全てのウエルの上清を取り除く。
- 6) 一次モノクローナルホスホ特異抗体 (phosphospecific antibody) (1 : 1000) を100  $\mu$ l / ウエル加え、そして室温で15分間インキュベートする。
- 7) 二次抗体 (1 : 2000) を100  $\mu$ l / ウエル加え、そして室温で1時間インキュベートする。
- 8) 上清を取り除き、そしてPBSを200  $\mu$ l / ウエル用いて5回洗浄する。
- 9) 基質溶液を100  $\mu$ l全てのウエルに加え、そして室温で10分間インキュベートする。
- 10) 停止溶液を100  $\mu$ l全てのウエルに加える。
- 11) 492nmで光学的濃度 (OD) を測定する。

10

20

## 【 0 0 2 2 】

ROK - ELISA 384 - 穴フォーマット

総体積 = 10  $\mu$ l

- 1) 所望の最終濃度の阻害剤 (10  $\times$  濃縮溶液の1  $\mu$ l) をROKの8  $\mu$ lと共に10分間、プレートインキュベートする。
- 2) 所望の最終濃度で10  $\times$  濃縮ATP溶液の1  $\mu$ l ATPを加える。
- 3) プレートを30 で1時間インキュベートする。
- 4) 500mM EDTA溶液の10  $\mu$ lを用いてキナーゼ反応を停止する。
- 5) 全てのウエルの上清を取り除く。
- 6) 一次モノクローナルホスホ特異抗体 (1 : 1000) を10  $\mu$ l / ウエル加え、そして室温で15分間インキュベートする。
- 7) 二次抗体 (1 : 2000) を100  $\mu$ l / ウエル加え、そして室温で1時間インキュベートする。
- 8) 上清を取り除き、そしてPBSを30  $\mu$ l / ウエル用いて5回洗浄する。
- 9) 基質溶液を10  $\mu$ l全てのウエルに加え、そして室温で10分間インキュベートする。
- 10) 停止溶液を10  $\mu$ l全てのウエルに加える。
- 11) 492nmで光学的濃度 (OD) を測定する。

30

40

## 【 0 0 2 3 】

材料

ROK (ROK / ROCK - II (活性型組換えaa 11 - 550またはそれ以上)、  
 ビオチン化S6ペプチド (ビオチン - GGGGARRRLSSLRASTS)、  
 ストレプトアビジン被覆96 - または384 - 穴プレート (例えば、ロシュのストレプトウエル、高結合 (透過性) 1989685 / 1989677、ロシュ・デアグノステクス、マンハイム)、  
 モノクローナルホスホ特異抗体、トランスダクション・ラブスより (クローン22a、BD バイオサイエンス、ハイデルベルグ)、  
 ヤギ抗マウスIgG - HRP抗体、200  $\mu$ g / 0.5ml (サンタクルツ、カタログ番号sc - 2005)

50

。【図面の簡単な説明】  
【0024】

【図1】配列番号1によるアミノ酸配列を示す。

【図2】ROK ELISAのための典型的なレイアウトを示す。列H 1-6は、キナーゼ反応のコントロールウエルとして用いられる。列H 1-3は、キナーゼを含まず、そしてATPを含み、そして最小シグナルを表す。列H 4-6は、キナーゼおよびATPを含み、そして最大シグナルを表す。列H 7-12は、参照化合物の濃度相関関係のために用いられる。他の全てのウエルは、目的の化合物の濃度相関関係を得るために用いられる。列E1-7のウエルの青白い色は、非常に強力な阻害剤が、用いた全ての濃度範囲にわたってROKの介在する基質のリン酸化を阻害したことを示している。同時に1点での測定によるIC50の推定の場合には、14個の化合物と1つの参照化合物を96穴フォーマットでは調べることができる。

【図3】ROK ELISAからの結果(%阻害およびIC50算出)を示す。

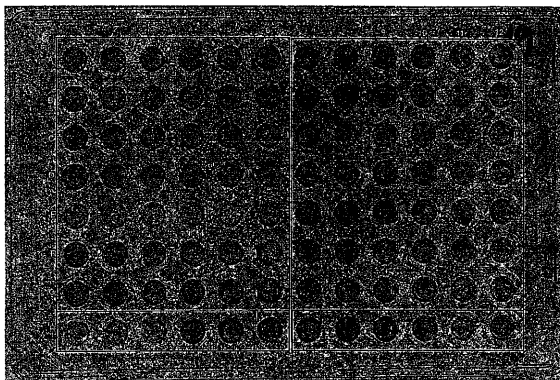
【図4A】ROK ELISAからの結果(%阻害およびIC50算出)を示す。

【図4B】ROK ELISAからの結果(%阻害およびIC50算出)を示す。

【図1】

GGG AKRRRL SSLRASTS

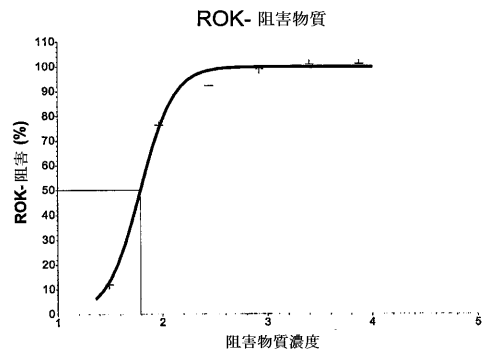
【図2】



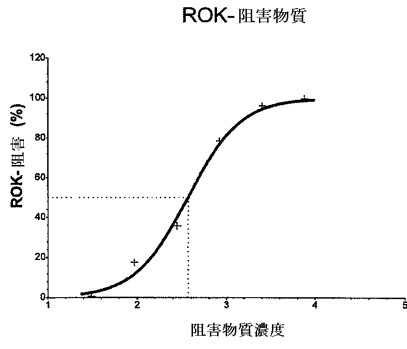
【図3】

阻害物質濃度(nM)	阻害物質濃度(nM)	阻害物質濃度(nM)	阻害物質濃度(nM)	阻害物質濃度(nM)	阻害物質濃度(nM)	平均IC50(nM)
31	93	278	833	2500	7600	
-6.28	-2.23	14.18	44.49	73.21	92.97	1072.78
-5.66	-2.08	15.49	67.03	92.34	99.36	611.09
-5.65	-0.63	12.04	47.19	82.68	97.71	915.07
-1.94	4.87	28.33	71.34	92.82	99.36	488.17
2.55	6.89	27.40	73.84	92.67	98.79	473.71
-3.35	9.74	22.10	58.30	87.63	97.91	651.39
-8.44	-1.30	-1.89	-2.09	7.05	19.00	>7500
-3.01	3.21	-3.59	9.65	42.27	80.21	3102.74
-2.67	-0.88	6.98	-0.34	14.15	49.75	>7500
2.22	-0.01	16.33	52.76	80.48	98.50	821.89
-5.40	5.52	17.06	58.63	88.46	98.81	721.48
4.73	-2.95	3.33	31.75	71.89	98.82	1416.43
-9.54	3.02	0.78	12.02	40.83	75.41	3324.44
-0.81	-1.86	9.36	35.66	73.97	95.48	1238.45
-6.64	-1.73	-3.24	5.99	33.90	67.96	4281.67
-3.53	13.96	38.53	79.58	95.74	99.84	360.12

【図4A】



【 図 4 B 】



【 配 列 表 】

2008524133000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2005/013088

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12Q1/48 C07K7/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TURNER MARY S ET AL: "Characterization and purification of truncated human Rho-kinase II expressed in Sf-21 cells" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 405, no. 1, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 13-20, XP002327338 ISSN: 0003-9861 the whole document ----- -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *G* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  1 February 2006		Date of mailing of the international search report  30/05/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Angioni, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2005/013088

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AMANO MUTSUKI ET AL: "The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates Rho-kinase activity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 45, 5 November 1999 (1999-11-05), pages 32418-32424, XP002327339 ISSN: 0021-9258 the whole document	20-22
Y	US 5 906 819 A (KAIBUCHI ET AL) 25 May 1999 (1999-05-25) the whole document	1-22
Y	WO 2004/035811 A (UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF DUNDEE; BIONDI, RICHARDO, MIGUEL) 29 April 2004 (2004-04-29) the whole document	1-22
Y	EP 1 096 014 A (AGOURON PHARMACEUTICALS, INC) 2 May 2001 (2001-05-02) the whole document	1-22
Y	US 2003/232391 A1 (PRESCOTT JOHN C ET AL) 18 December 2003 (2003-12-18) the whole document	1-22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/013088

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5906819	A	25-05-1999	NONE	
WO 2004035811	A	29-04-2004	AU 2003271951 A1	04-05-2004
EP 1096014	A	02-05-2001	AU 756175 B2	09-01-2003
			AU 6807900 A	10-05-2001
			CA 2325228 A1	11-05-2001
			JP 2001161387 A	19-06-2001
			US 6670167 B1	30-12-2003
US 2003232391	A1	18-12-2003	US 2005084905 A1	21-04-2005

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
**G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 U**

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 マティーアス・レーン  
 ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイツ  
 ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72) 発明者 ユーリ・イヴァーシュチェンコ  
 ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイツ  
 ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72) 発明者 エルケ・ケスラー  
 ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイツ  
 ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

F ターム(参考) 2G045 AA40

4B063 QA18 QQ95 QR07 QR48 QR58 QS33 QX02

4H045 AA10 AA30 BA17 BA70 EA55 FA10

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008524133A5</a>	公开(公告)日	2012-01-05
申请号	JP2007545900	申请日	2005-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	赛诺菲德国菊植物GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsongu		
申请(专利权)人(译)	赛诺菲 - 安万特德国法理社会，米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	マティーアスレーン ユーリイヴァーシュチェンコ エルケケスラー		
发明人	マティーアス・レーン ユーリ・イヴァーシュチェンコ エルケ・ケスラー		
IPC分类号	C07K7/00 C12Q1/48 G01N33/50 G01N33/15 C40B30/04 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/485		
FI分类号	C07K7/00.ZNA C12Q1/48.Z G01N33/50.Z G01N33/15.Z C40B30/04 G01N33/53.U		
F-TERM分类号	2G045/AA40 4B063/QA18 4B063/QQ95 4B063/QR07 4B063/QR48 4B063/QR58 4B063/QS33 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA70 4H045/EA55 4H045/FA10		
优先权	2004029769 2004-12-16 EP		
其他公开文献	JP2008524133A JP5001167B2		

#### 摘要(译)

本发明涉及使用生物素化肽测量ROK ( Rho激酶 ) 蛋白活性的测定方法。(图4A)。