

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03818591.1

[51] Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 100345593C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/497 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/336 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07D 311/30 (2006.01)

[22] 申请日 2003.8.5 [21] 申请号 03818591.1

[30] 优先权

[32] 2002. 8. 6 [33] JP [31] 229262/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/009910 2003.8.5

[87] 国际公布 WO2004/017997 日 2004.3.4

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.2

[73] 专利权人 东丽株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 山田将辉 车谷元 须藤哲央
辻本豪三

[56] 参考文献

JP2000-080035A 2000.3.21

审查员 杜文华

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

代理人 高龙鑫 王颖

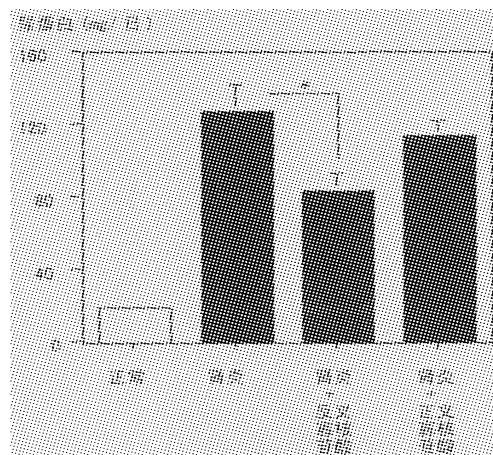
权利要求书 1 页 说明书 50 页 附图 7 页

[54] 发明名称

用于制备肾脏疾病的治疗或预防药物中的用途

[57] 摘要

本发明公开一种新型肾脏疾病的治疗或预防药物以及肾脏疾病的诊断方法(检测方法)。所述本发明肾脏疾病的治疗或预防药物含有以酪蛋白激酶 2 的抑制物质为有效成分。另外,本发明的肾脏疾病的诊断方法是测定从机体分离的样品中酪蛋白激酶 2 的活性或含量或酪蛋白激酶 2 基因的表达水平。



1.一种序列号 1-10 中任意一项所示序列的核苷酸分子在制备肾脏疾病的治疗或预防药物中的应用。

2.如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述核苷酸分子为序列号 1 所示序列的核苷酸。

3. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述肾脏疾病为肾小球肾炎、间质性肾炎、肾硬化、糖尿病性肾病、慢性或急性肾功能不全。

4. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述肾脏疾病为非糖尿病源性肾炎、或者为以酪蛋白激酶 2 的表达亢进或酶活性亢进为特征的肾脏疾病。

用于制备肾脏疾病的治疗或预防药物中的用途

技术领域

本发明涉及肾脏疾病的治疗或预防药物以及肾脏疾病的诊断方法。

背景技术

肾脏是形成于体腔背侧呈左右对称的泌尿器官,通过形成尿来维持机体的恒定性,如1)水分排泄、2)代谢产物,尤其是氮成分排泄、3)电解质排泄、4)异种物质排泄、5)调节血液渗透压·体液量以及酸碱平衡等。肾脏还担负着重要生理功能,例如通过产生和分泌肾素或前列腺素来调节血压、还通过产生促红细胞生长素来调节骨髓中的红细胞的分化与成熟,进一步活化维生素D的前体即25-羟维生素D等(Blood, 68 (Suppl), 170a, 1986, Proc Natl Acad Sci USA, 28, 1199, 1981)。肾脏是由大约100万个被称作肾单位的功能单位的集合体,肾单位由肾小球、肾小球囊、近球端小管、髓袢、远球端小管构成。肾单位在集合管处会合,集合管开口于肾盂。肾小球在球状的毛细血管块滤过血液生成原尿。原尿在肾小管进行再吸收和分泌最终形成尿。一般来说,肾小球在滤过过程中控制血液中的必要物质特别是防止血清蛋白渗出到尿中,但肾小球一旦发生障碍则引起组成细胞之一的肾小球膜细胞的增殖和周围基质的增加,增加尿中的蛋白排泄量。尿中蛋白排泄量一旦增加,该蛋白本身阻碍肾小管,进一步加大阻碍肾小球,导致陷入恶性循环之中从此以后加速肾功能的损坏。

典型的肾脏疾病有肾小球以及肾小管间质性肾炎或糖尿病性肾病。众所周知的有急性肾炎症候群、急速进行性肾炎症候群、反复性或持续性血尿症候群、慢性肾炎症候群、肾病症候群、糖尿病性肾病、狼疮肾炎、IgA肾病、慢性肾盂肾炎、肾硬化、肾性高血压、痛风肾、急性肾功能不全和慢性肾功能不全等。肾脏疾病呈现复杂多样的病态,无论哪一种一旦慢性化有时就会导致肾功能不全,处于生命危在旦夕。目前,众所周知,肾脏疾病的治疗方法,依其患病程度有保持肾脏机能的治疗方法例如,安静疗法、食物疗法或药物疗法、血液透

析疗法或肾移植。尤其是，一旦患上肾功能不全，则必须依靠血液透析或腹膜透析等的透析疗法或肾移植。血液透析疗法虽然看作是肾脏疾病的最终治疗方法，但仅仅从血中除去由肾脏功能障碍而储留在体内的代谢废物，无法恢复严重障碍的肾脏机能，患者一方面要遭受痛苦的折磨，一方面又不得不一生要依赖设备和高额费用的透析疗法。而且大多数情况，最终将导致心机能不全、感染并发症而死亡。近年来，随着新型的透析的引入而进行透析的患者年年增加，从经济上，社会上来看已经成为很大的问题。虽然肾移植是肾脏机能不全唯一能够根治的方法，但存在捐献肾脏的志愿者缺乏、机体组织适应性的难度大且具有回避排斥反应等很多问题，且实施例又少，迫切希望能够开发出根治的方法或治疗药物。大多数是由于肾脏机能不全而导致的疾病或病态，肾炎和糖尿病性肾炎作为疾病的原因占有很大比例，这些肾脏疾病的治疗和预防成为肾脏疾病治疗中的最大研究课题之一。肾炎分为由肾小球障碍引起的肾小球肾炎和由肾小管引起的肾小管肾炎，前者随着肾小球的损伤的持续引起肾小管颓废，而后者仅为肾小管颓废。临床上主要的狼疮肾炎、IgA 肾病等包含在肾小球肾炎中，但其发病机理分为免疫学机理和非免疫学机理。对于前者举例，已知有葡萄球菌、溶血性链球菌等细菌或 B 型肝炎、麻疹等源于病毒的抗原以及针对这些抗原的抗体所组成的免疫复合体附着到肾小球上。目前，考虑还有其他多种原因但很大部分都未解决。由于持续性慢性肾炎导致体液中的代谢物的排泄堵塞而增加肾脏负担，更进一步地加剧肾炎的发展不断地颓废。肾小球及肾小管完全颓废导致肾功能不全其肾脏无法再回复功能，且能够使肾脏再生的治疗方法或治疗药物迄今为止还没有完成。急性肾炎以及轻度的慢性肾炎虽然都在使用类固醇性质的抗炎症药物，但慢性肾炎恶化导致所谓的肾功能不全时没有从根本上治疗的方法，只能靠透析疗法来维持。然而，在肾脏中，激素等分泌功能也是非常重要，尤其是由于近端小管的颓废在此产生的促红细胞生长素减少导致严重贫血。为此迫切希望能够早期诊断及治疗。

就目前而言，药物治疗在肾炎方面主要使用类固醇性抗炎症药物，针对病因或病症可以使用免疫抑制剂、抗血小板制剂、降压剂、利尿剂等。另外，糖尿病性肾病一方面严格地控制血糖，一方面使用血管紧张素转换酶抑制剂或 ATII 受体阻断剂、钙阻断剂等降压剂。然而，在这些现有的肾脏疾病治疗药物上很难充分地阻断肾脏功能不全的进展，其现状是在根本性治疗方面还相差

甚远（岗博·和田攻责任编辑，<医科学大辞典>，增补 5，最新治疗信息，第 218 页，讲谈社，1988 年）。如此看来，现在还不能说用于治疗肾脏疾病的药物已经充分满足现在的需要。另外，长期使用药物的副作用也成为现实问题，现在基本上是以患者的安静疗法或食物疗法为主而进行的预防治疗。肾脏疾病治疗药物还处于一种反复试验状态，希望开发更有效的治疗药物。

发明内容

因此，本发明的目的就是提供一种有效的肾脏疾病治疗或预防药物，以及肾脏疾病的诊断方法。

本发明人为了解决上述技术问题，将抗肾小球基底膜抗体诱导的大鼠动物模型的肾炎作为研究对象反复进行科学研究。也就是说，通过比较本模型肾脏疾病状态肾脏中的基因表达和非肾脏疾病状态肾脏中的基因表达，在进行肾脏疾病状态的肾脏所表达基因的研究时，发现在肾脏疾病状态的肾脏中酪蛋白激酶 2 显著的增加。而且通过将酪蛋白激酶 2 的表达作为指标不仅可以诊断肾脏疾病，而且证实，通过投与酪蛋白激酶 2 抑制物质还可以治疗或预防肾脏疾病，从而完成本发明。

也就是说，本发明提供一种肾脏疾病的治疗或预防药物，其含有酪蛋白激酶 2 的抑制物质作为有效成分。本发明还提供一种肾脏疾病的诊断方法，该方法包含测定由机体分离的样品中酪蛋白激酶 2 的活性或含量或酪蛋白激酶 2 基因的表达水平。本发明还提供了抑制酪蛋白激酶 2 的物质在制备治疗或预防肾脏疾病的治疗或预防药物中的应用。本发明还提供一种肾脏疾病的治疗或预防方法，该方法包括将有效量的抑制酪蛋白激酶 2 的物质施用至肾脏疾病患者或希望预防肾脏疾病的人体上。

本发明所提供的肾脏疾病的治疗或预防药物是迄今为止的药物所无法期待的具有优异的充分的治疗或预防效果的药物。另外，通过本发明诊断肾脏疾病的方法（肾脏疾病的检测方法）可以准确而有效地诊断和检测肾脏疾病的病态。

附图简要说明

图 1 表示肾脏组织即组成肾脏的细胞中酪蛋白激酶 2 基因表达水平与尿蛋

白排泄量即与肾脏疾病症状之间的关系图。

图2表示施用酪蛋白激酶2 α 亚单位的反义寡核苷酸对肾炎大鼠模型的尿蛋白排泄量的效果图。*: $p<0.05$

图3表示芹菜素(アピゲニン, apigenin)对酪蛋白激酶2酶活性的抑制作用。

图4表示施用酪蛋白激酶2抑制剂--芹菜素对肾炎大鼠模型的尿蛋白排泄量的效果图。*: $p<0.05$

图5表示施用酪蛋白激酶2抑制剂对肾炎大鼠模型的尿蛋白排泄量的效果图。*: $p<0.01$

图6表示施用酪蛋白激酶2抑制剂对肾炎大鼠模型的血液中肌酐浓度的效果图。*: $p<0.01$

图7表示施用酪蛋白激酶2抑制剂对肾炎大鼠模型的内源性肌酐清除率的效果图。*: $p<0.01$

具体实施方式

作为本发明肾脏疾病的治疗或预防剂的治疗或预防对象的肾脏疾病,只要是肾脏疾病即可,没有特殊的限制,可举例为,肾小球肾炎、间质性肾炎、肾硬化、糖尿病性肾病、慢性及急性肾功能不全。特别举例为,急性肾小球肾炎症候群、急速进行性肾小球肾炎症候群、反复性或持续性血尿症候群、IgA肾病、慢性肾盂炎、肾病症候群、狼疮肾炎、肾性高血压、痛风肾、急性肾小管间质性肾炎、慢性肾小管间质性肾炎、肾梗塞、药物性肾障碍、移植肾的功能不全、肾结石以及伴随尿管闭塞的肾功能障碍等。其中,非糖尿病性的肾脏疾病是优选对象。特别是肾炎为优选对象。尤其是以酪蛋白激酶2的表达亢进或酶活性亢进为特征的上述疾患为优选对象。本发明除了适用于人的疾患外,还适用于猴、狗、猫、猪、牛、马、羊、山羊、兔子、大鼠、小鼠等哺乳动物,不仅仅可以用于人体还可以用作动物医药品。另外,本发明肾脏疾病的治疗或预防药物,适用于肾脏疾病的治疗、肾脏疾病的预防以及肾脏疾病的治疗和症状的恶化预防并行实施。

如上所述,本发明肾脏疾病的治疗或预防药物含有抑制酪蛋白激酶2的物质作为有效成分。酪蛋白激酶2属于蛋白质,为基质特异性广泛的多功能蛋白激酶的一种。广泛分布在真核细胞中,存在于细胞质、细胞核中。由分子量

41-44kDa α 亚单位和 24-28kDa β 亚单位组成,由分子量 130-140 kDa $\alpha\alpha\beta\beta$ 或 $\alpha\alpha'\beta\beta$ 四单体组成 (Boichemistry, 28, 4072-4076 (1989); Boichemistry, 29, 8436-8447 (1990); Boichemistry, 28, 9053-9058 (1989))。在 α 亚单位和 α' 亚单位上有活性中心,把作为酶的蛋白的丝氨酸、苏氨酸残基磷酸化,利用 ATP、GTP 作为磷酸供给源。迄今为止,酪蛋白激酶 2 在机体内的意义和病态时的意义还没有被充分地阐明。甚至,酪蛋白激酶 2 在肾脏疾病的肾脏中表达以及通过施用抑制酪蛋白激酶 2 的物质能够治疗或预防肾脏疾病还不为人所知,通过抑制酪蛋白激酶 2 可以治疗或预防肾脏疾病这一事实,在现有技术中是完全无法预料的,是发明人首次发现的。

正如以下实施例所详细地描述,本发明人发现:处于肾脏疾病状态中的肾脏细胞中酪蛋白激酶 2 基因表达水平明显比正常肾脏细胞中表达水平高,还发现:通过施用抑制酪蛋白激酶 2 的物质肾脏疾病状态明显地得到改善。因此,在本发明肾脏疾病的治疗或预防药物中有效成分所含有的、抑制酪蛋白激酶 2 的物质只要是可以抑制酪蛋白激酶 2 的、并且药学上允许的物质均可,且为现有的有效治疗方法中从未有过的对肾脏疾病进行治疗或预防的药物。处于肾脏疾病状态在构成肾脏的细胞中,如实施例所示,与正常肾脏细胞相比,酪蛋白激酶 2 的基因表达水平明显增大。在组成肾脏的细胞中酪蛋白激酶 2 基因的表达水平越大,肾脏疾病的状态越恶化,表达水平越接近正常值肾脏疾病的状态越接近正常。不仅仅是基因表达,在蛋白质表达上也是如此,如实施例所示,在组成肾脏疾病状态的肾脏的细胞中与正常肾脏组成细胞相比,酪蛋白激酶 2 蛋白质表达水平即含量明显地增多。肾脏细胞中的酪蛋白激酶 2 蛋白质表达水平越高即含量越多肾脏疾病的状态越恶化,表达水平即含量越接近正常值肾脏疾病的状态越接近正常。还有,酪蛋白激酶 2 蛋白质表达水平即含量与酪蛋白激酶 2 的酶活性即机能有着密切的关系。即如实施例所示,酪蛋白激酶 2 蛋白质含量越多酪蛋白激酶 2 的酶活性即机能越高。由此显示,酪蛋白激酶 2 基因的表达水平、蛋白质的表达水平即含量以及酶活性即机能越高肾脏疾病的状态越恶化,它们被适当抑制肾脏疾病的状态越接近正常。还有,使酪蛋白激酶 2 基因的表达、蛋白质的表达水平即含量以及酶活性即机能降低或抑制的手段,以及具有使它们降低或抑制的物质,无论使用任何手段和任何物质,都会使肾脏疾病的状态处于接近正常状态,具有治疗和预防肾脏疾病的作用或效果都可

以在一般性认识上进行理论说明。如实施例所示，针对处于肾脏疾病状态的肾脏通过各种手段（例如，用反义寡核苷酸抑制酪蛋白激酶 2 表达的手段，或者用化合物抑制酪蛋白激酶 2 的酶活性的手段）抑制酪蛋白激酶 2，任何一种方法都具有使肾脏疾病的状态处于接近正常状态的作用或效果，具有治疗和预防肾脏疾病的作用或效果。换言之，针对处于肾脏疾病状态的肾脏，具有抑制酪蛋白激酶 2 的机能的物质（例如，作为抑制酪蛋白激酶 2 表达物质的反义寡核苷酸，或者作为抑制酪蛋白激酶 2 酶活性物质的化合物）中的任何一种物质都具有使肾脏疾病的状态处于接近正常状态的作用或效果，具有治疗和预防肾脏疾病的作用或效果，如实施例所示。也就是说，现在已经清楚地知道，一般具有抑制酪蛋白激酶 2 作用的手段和物质，具有治疗和预防肾脏疾病的作用。因此，在本发明肾脏疾病的治疗或预防药物中作为有效成分所含有的、抑制酪蛋白激酶 2 的物质只要是可以抑制酪蛋白激酶 2 的并且药学上允许的即可，且为现有的有效治疗方法中从未有过的对肾脏疾病进行治疗或预防的药物。更进一步可以通过将酪蛋白激酶 2 基因的表达、表达水平即含量以及酶活性即机能作为指标来诊断肾脏疾病。另外，酪蛋白激酶 2 是已知物质，作为本领域普通技术人员来讲，可以想到抑制酪蛋白激酶 2 的手段及物质，关于这些问题在本发明中也有详细说明。因此，理所当然，无论如何，对于本领域普通技术人员，在通常技术范围内均能充分地实施。

在本发明中，所述适用于治疗或预防肾脏疾病的酪蛋白激酶 2 的抑制物质，其结果能使酪蛋白激酶 2 的效果降低即可，其可优选为：（1）抑制酪蛋白激酶 2 基因表达的物质（反义寡核苷酸、RNAi、或核酶等的转录、翻译、修饰抑制物质）以及（2）抑制酪蛋白激酶 2 酶活性的物质（酶活性竞争或非竞争的抑制物质、抗酪蛋白激酶 2 抗体及其抗原结合性片段等）。另外，也可以使用分解酪蛋白激酶 2 的物质或促进酪蛋白激酶 2 分解的物质。也可以是在机体内或试管内基本上能够抑制或排除与酪蛋白激酶 2 有关的信号传递系统的物质。这些抑制物通过下面实施例详细描述的对酪蛋白激酶 2 酶活性测定法测定的对酪蛋白激酶 2 功能活性至少抑制或降低约 30%，优选约 50%，更优选约 80%以上。酶活性测定法可以很容易地采用一般测定法所使用的方法进行测定。具体测定方法如下面所述。

以下，进一步详细地说明有关所述酪蛋白激酶 2 的抑制物质。

上述的(1)抑制酪蛋白激酶2基因表达的物质,可举例为,抑制酪蛋白激酶2的亚单位基因或蛋白质的表达(转录、翻译)或翻译后的修饰的核酸、化合物、肽等。优选核酸,所述优选的核酸举例为,针对酪蛋白激酶2基因的反义寡核苷酸、RNAi或核酶。更进一步含有酪蛋白激酶2反义基因的基因治疗用导入载体和通过该载体将酪蛋白激酶2反义基因导入的细胞,以及由该基因治疗用导入载体和通过该载体将酪蛋白激酶2反义基因导入的细胞作为有效成分的基因治疗药物也属于举例范畴之内。

在正常细胞内,以基因DNA-mRNA-蛋白质这样的顺序将基因信息传递下去。编码蛋白的mRNA的碱基序列称作正义序列,对于该序列互补的碱基序列称作反义序列。在原核生物(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第81卷,第1966-1970页(1984年)公开的T.Mizuno, M-Y Chou和M.Inoue的论文)和真核生物(Nucleic Acids Res.第14卷,第6771-6772页(1986年)公开的S.M.Heywood论文)中,反义序列都作为基因表达自然发生的生物学的抑制因子,认为这些序列通过与互补的mRNA序列杂交而产生抑制翻译的作用(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第74卷,第4370-4374页(1977年)公开的B. M. Paterson, B. E. Roberts和E. L. Kuff的论文)。包含反义寡核苷酸在内的寡核苷酸,如沃森-克里克碱基配对形成所定义的一样,与前体mRNA或成熟mRNA任一互补的碱基序列特异地杂交。该用语中有自然界存在的碱基、糖、以及糖间(主链)结合形成的低聚物,还有以类似方式起作用的含有非自然界存在部分的低聚物。简单地说,反义法是这样一种方法:通过化学合成具有与从某基因DNA转录的mRNA相互补的碱基序列的反义寡核苷酸,施用至细胞或个体,特异性结合与mRNA互补的单链或双链,形成双螺旋结构,从而使其表达、mRNA或基因DNA的功能、翻译成蛋白质或向细胞质内输送、或整个生物学机能所必须的活性中的任何一种都能够被碱基序列特异地抑制。由此使得mRNA或基因DNA的功能的全部或部分不能发挥作用,导致用于调节蛋白质正确表达的基因组部分缺失,由此从基因DNA向蛋白质传递的遗传信息流被阻断,调节表达向着相反方向进行而被抑制。反义法就是碱基序列特异性地抑制具有与反义寡核苷酸相同序列的基因的表达。根据最近大量的研究证实,反义寡核苷酸作为基因功能分析方法具有重大的意义(Rothenberg et al., J. Natl. Cancer Inst. 1989, 81, 1539-1544, Zon, G. Pharmaceutical Res. 1988, 5, 539-549)。

反义寡核苷酸是由 4 个碱基单位组成的长链, 因此对于任何标记基因的碱基序列都很容易地合成。根据最新寡核苷酸化学方面的进展, 以及核酸酶抗性寡核苷酸和 S-寡核苷酸等的合成的最新发展, 目前, 已经能够考虑利用反义寡核苷酸作为新的治疗方法。细胞中包含很多能够分解核酸的外切核酸酶和内切核酸酶。现在很多核苷酸和核苷的修饰已经显示出重组的寡核苷酸要比天然寡核苷酸针对核酸酶消化更具有抗性。如此修饰或置换的寡核苷酸常常要比天然形式的优越。采用下述方法对核酸酶抗性进行常规的测定: 将寡核苷酸与细胞提取物或分离的核酸酶溶液一起温育, 通常通过凝胶电泳方法, 检测随着时间的经过而残留的完整的寡核苷酸的程度。为了增强核酸酶抗性而修饰的寡核苷酸要比非修饰的寡核苷酸残留时间长并且完整。为了增强或赋予核酸酶的抗性已知有各种寡核苷酸的修饰。例如, 按照要求优选几种寡核苷酸形式, 其中包括 S-寡核苷酸等的硫代磷酸酯、磷酸三酯、磷酸甲酯、短链烷基或环烷基糖间键、或者短链杂原子或杂环糖间键。S-寡核苷酸(核苷酸硫代磷酸酯)是寡核苷酸(O-寡)磷酸基非交联氧原子被硫原子所取代的等电类似物。S-寡核苷酸可通过利用相应的 O-寡通过硫转移试剂即 3H-1、2-苯并二硫-3-酮-1, 1-二氧化物处理而获得。可以参照 J. Org. Chem.第 55 卷, 第 4693-4698 页, (1990 年) 公开的 R. P. Iyer 等论文, 以及 J. Am. Chem. Soc.第 112 卷, 第 1253-1254 页 (1990 年) 公开的 R. P. Iyer 等论文。优选形式为具有吗啡代主链构造的寡核苷酸 (Summerton, J. E.和 Weller, D. D., 美国专利第 5,034,506 号)。在其他优选形式中, 可以用聚酰胺主链取代如蛋白质-核酸 (PNA) 主链的寡核苷酸的磷酸二酯主链 (P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berf, O. Buchardt, Science 1991, 254, 1497)。此时, 碱基直接地或间接地与聚酰胺主链上的氮杂氮原子结合。寡核苷酸可以用环丁基之类的糖类似物代替呋喃戊糖基。典型的寡核苷酸还包含提供 1 个或 1 个以上有用性质 (例如, 增强核酸酶抗性、增加细胞内重组、增加对 RNA 靶结合的亲和性) 的至少一个被修饰的核苷酸区和为 RNase H 切割的基质区。在一个优选的实施方式中, 寡核苷酸包含为增加靶结合的亲和性而修饰的至少一个区和通常作为 RNase H 切割的基质的功能区。针对该靶子 (此时为编码酪蛋白激酶 2 的核酸) 的寡核苷酸的亲和性通过测定寡核苷酸和靶子的解离温度即寡核苷酸/靶子对的解链温度 (T_m), 按照常规方法进行确定。而解离还可依据分光学进行检测。解链温度 (T_m) 越

高寡核苷酸则与靶子相应的寡核苷酸的亲和性越大。在优选实施方式中，为增加酪蛋白激酶 2 mRNA 结合亲和性而进行修饰的寡核苷酸区域含糖 2'位被修饰的至少一个核苷酸（最优选的是 2'-O-烷基或 2'-氟修饰的核苷酸）。把这种修饰常规地向寡核苷酸内重组，该重组的寡核苷酸针对靶子显示出具有高于 2'-脱氧寡核苷酸解链温度（ T_m ）（即，更强的靶子结合亲和性）。如此增强的亲和性效果已经显示出针对酪蛋白激酶 2 的反义寡核苷酸效果显著增强。RNase H 是切割 RNA: DNA 双链中的 RNA 链的细胞性内切核酸酶。因此，该酶的活化将切割 RNA 靶子并能够极大地促进反义抑制的效率。RNA 靶子的切割可以常规地根据凝胶电泳表示。

寡核苷酸或类似物包含约 12 个至约 50 个碱基，优选 12-25 个碱基，更优选 16-22 个碱基。所述寡核苷酸或类似物在生理学条件下（就解链温度（ T_m ）而言，基本上高于 37°C，优选至少 50°C，一般为 60-80°C 或以上），进一步与靶 mRNA 碱基序列特异性结合杂交。所述杂交优选严谨杂交条件，该条件的选择使得在离子强度和 pH 值下比靶 mRNA 碱基序列的解链温度（ T_m ）约低 10°C，且优选约低 5°C。而且互补性（一种多肽与相应的其他多肽互补的程度）根据一般人们接受的碱基配对原则，通过相互形成氢键来预测对应链的碱基比例进而定量化。所说能特异性杂交和互补通常是由于 DNA 或 RNA 靶子和寡核苷酸之间产生稳定的且特异的键从而具有很高互补性时所使用的技术用语。能特异地杂交可以理解为寡核苷酸无需与它的靶核酸序列 100%互补。当然 100%互补是表示最优选的特异性和有效抑制翻译。即使不是 100%互补的时候，优选互补性为 90%以上（即，与 mRNA 杂交的反义寡核苷酸中的碱基中，配对的 mRNA 碱基和错配碱基的数目占寡核苷酸总量的 10%以下）。与靶结合的寡核苷酸当妨碍靶分子正常功能而引起有用性消失时，和特异性结合所需要的条件下例如治疗处置时是在生理条件下，为了避免与非靶序列的寡核苷酸的非特异性结合存在充分的互补性时，寡核苷酸就可能特异地杂交。所述寡核苷酸或类似物可以根据众所周知的固相合成技术方便地按照常规方法获得。关于寡核苷酸的化学合成的研究请参照生物共轭化学（Bioconjugate Chemistry）第 1 卷，第 165-167 页（1990 年）公开的 Goodchild 论文。例如，寡核苷酸用标准磷酰胺酯（ホスホロアミダイト, phosphoroamidate）化学进行碘氧化自动 DNA 合成仪（アプライドバイオシステムズモデル 380B）合成，这样的合成装置由包

含アプライドバイオシステムズの多家销售商进行销售。所述寡核苷酸或类似物的合成在日常技术人员的技术范围内可以完全地进行。或者反义寡核苷酸可以从很多专门从事寡核苷酸合成的企业中获得。硫代磷酸酯以及烷基化衍生物之类的其他寡核苷酸的制备已知有相同的使用技术。另外，为了合成荧光标记、生物素化或胆固醇修饰寡核苷酸之类的其他的修饰寡核苷酸，已知有相同的技术以及从可以商购得到的生物素、荧光素、吖啶、补骨脂素修饰のアミダイト（amidite）和/或控制细孔玻璃（CPG）（Glen Research, Sterling VA）入手可得到修饰のアミダイト（amidite）和 CPG 产物。

反义法是把疾患原因基因或疾患相关基因本身作为靶子，所以是一种接近病因治疗的方法，将反义寡核苷酸用作治疗很多疾患的治疗药物存在着极大的可能性。例如，美国专利第 5135917 号提供一种抑制人白介素 1-受体表达的反义寡核苷酸。美国专利第 5098890 号涉及与 c-myc 癌基因相互补的反义寡核苷酸以及某种癌状态的反义寡核苷酸治疗。美国专利第 5087617 号提供一种通过反义寡核苷酸对癌患者的处置方法。美国专利第 5166195 号提供一种 HIV 的寡核苷酸抑制剂。美国专利第 5004810 号提供一种与单纯疱疹病毒 Vmw65mRNA 杂交并能抑制复制的低聚物。美国专利第 5194428 号提供一种针对流感病毒具有抗病毒活性的反义寡核苷酸。美国专利第 4806463 号提供一种在反义寡核苷酸和 HTLV-III 复制抑制过程中采用这些物质的方法。美国专利第 5286717 号涉及与癌基因互补的混合结合寡核苷酸硫代磷酸酯。美国专利第 5276019 号和第 5264423 号涉及用于抑制细胞中外源性核酸复制的硫代磷酸酯寡核苷酸类似物。硫代磷酸酯·寡核苷酸显示对 AIDS 患者巨细胞病毒网膜炎是有效的（BioWorld Today, 1994 年）。因此，我们确立了寡核苷酸是有用的治疗手段，在细胞及动物（特别是人类）的处置养生法中是有意义的。酪蛋白激酶 2 表达抑制也对肾脏疾病的治疗极为有用。

酪蛋白激酶 2 的 cDNA 序列是公知的（例如人的酪蛋白激酶 2 α 亚单位的 cDNA 序列已经公开在 GenBank Accession No.J02853、人的酪蛋白激酶 2 α' 亚单位的 cDNA 序列已经公开在 GenBank Accession No.M55268、人的酪蛋白激酶 2 β 亚单位的 cDNA 序列已经公开在 GenBank Accession No.AY113186、大鼠的酪蛋白激酶 2 β 亚单位的 cDNA 序列已经公开在 GenBank Accession No.NM_031021、大鼠的酪蛋白激酶 2 α 亚单位的 cDNA 序列已经公开在

GenBank Accession No.L15618、小鼠的酪蛋白激酶 2 α 亚单位的 cDNA 序列已经公开在 GenBank Accession No.AJ001420、小鼠的酪蛋白激酶 2 β 亚单位的 cDNA 序列已经公开在 GenBank Accession No.NM_009975。其中,人酪蛋白激酶 2 α 亚单位、人酪蛋白激酶 2 α' 亚单位、人酪蛋白激酶 2 β 亚单位、大鼠酪蛋白激酶 2 α 亚单位和 2 β 亚单位的 cDNA 分别表示在序列编号 15 至 19。),所以,从酪蛋白激酶 2 基因转录形成的 mRNA 所对应的反义寡核苷酸可以很容易地合成得到。

也就是说,具有与所述这些 mRNA 碱基序列互补的碱基序列的寡核苷酸基本上可以用作反义寡核苷酸。优选通过 BLAST 检索等确认选择的碱基序列对靶基因具有特异性(即,该靶基因以外的基因中,该碱基序列或与其同源性高的碱基序列不存在)。具体举例为,大鼠酪蛋白激酶 2 α 亚单位(包括 α' 亚单位)的反义寡核苷酸可以使用 5'-gtaatcatcttgattacccca-3'(序列编号 1)、大鼠酪蛋白激酶 2 β 亚单位的反义寡核苷酸可以使用 5'-ggttggccggccgcttgggcc-3'(序列编号 2)。其他示例如具有序列编号 3-10 所记载的碱基序列的寡核苷酸。还有与酪蛋白激酶 2 的 mRNA 杂交的寡核苷酸已知有很多种(例如,WO020/62951 号和 WO020/62954 号),可以使用这些公知的寡核苷酸。与动物种相应的碱基序列、或者由该碱基序列的一部分组成的寡核苷酸或其类似物在本发明也是适用的。不仅是 mRNA 编码区域,5'-非翻译区域、3'-非翻译区域、5'帽和内含子/外显子结合部位区域也作为反义寡核苷酸的靶区域。即,与编码区域相同,可以将由本发明制得的寡核苷酸和类似物的区域的全部或部分作为靶子。根据优选实施方式,寡核苷酸或类似物可以与转录起始部位、翻译起始部位、3'-非翻译区域中的内含子/外显子结合部位或与碱基序列特异性杂交。在妨碍 mRNA 的功能中包括向蛋白质翻译部位转运(トランスロケーション)mRNA、由 mRNA 翻译实际的蛋白质、mRNA 的剪接或成熟以及可能由 mRNA 进行的为了保持独立酶活性的所有功能。妨碍 mRNA 功能的整体效果就是妨碍酪蛋白激酶 2 的蛋白质表达。所述的反义寡核苷酸或类似物为至少可以与编码酪蛋白激酶 2 蛋白质的 mRNA 进行特异性碱基序列杂交、并选择性改变酪蛋白激酶 2 表达所得到的寡核苷酸或类似物。另外,如果将酪蛋白激酶 2 的反义寡核苷酸或类似物施用至细胞或个体,可以选择性的抑制仅仅进行特异性碱基序列的酪蛋白激酶 2 的表达,进而可以治疗肾脏疾病。本发明所使用的酪蛋白激酶 2

的反义寡核苷酸是一种既与编码酪蛋白激酶 2 的 mRNA 编码区域、3'非翻译区域、5'非翻译区域、5'帽以及/或内含子/外显子结合部位具有互补性又能与其杂交的寡核苷酸。若使用与该区域具有互补性的寡核苷酸，则选择地酪蛋白激酶 2 杂交。优选 S-寡核苷酸，S-寡核苷酸在核苷酸中至少有一个结合基包含含硫基团或硫代磷酸酯部分。本发明还进一步包含由至少一种有效量的本发明酪蛋白激酶 2 的反义寡核苷酸与药学上允许的载体组合而成的药物组合物。通过施用酪蛋白激酶 2 的反义寡核苷酸可以抑制酪蛋白激酶 2 的表达，因此，就可以治疗肾脏疾病。特别适用于以酪蛋白激酶 2 的表达亢进为特征的肾脏疾病，例如肾炎。以下与实施例一并详细进行说明。

所说 RNAi (RNA 干涉) 法就是通过施用至细胞或个体的双链 RNA 来抑制具有与该双链 RNA 相同序列的基因表达 (蛋白质合成) 的方法。RNAi 法由于通过破坏靶基因或 mRNA 来选择性地抑制靶基因的表达，所以现在正在关注其作为一种有效的分析该基因功能的方法，还把患病原因基因或与患病有关的基因本身作为靶子而作为近似于病因疗法。在 RNAi 中使用的 21-23 核苷酸单位的双链 RNA 又被叫做 siRNA。siRNA 可简单设计。例如，为了避开转录因子的结合部位，在翻译区自起始密码子 50 个碱基以上选出下游最初的 AA、CA、GA、TA，接着选择包含 19-21 个碱基的 21-23 个碱基。另外，筛选得到的碱基序列 GC 含量为 30-70%，优选 50%，不希望含有 GGG 或 CCC 类型。然后，将筛选的碱基序列通过 BLAST 检索确认对目的基因的特异性。siRNA 还是一个由 4 个碱基单位组成的长链，所以日常中就可以很方便地合成任何靶基因的碱基序列。根据最新研究的进展，目前，可以考虑利用 siRNA 作为新的治疗方法。具体地说，可以使用例如，5'-cuaccgacaagcucuagactt-3'和 5'-gucuagagcuugucgguagtt-3'作为人酪蛋白激酶 2 β 亚单位的 siRNA。或者可以使用例如 5'-cuaccgacaagcucuagacat-3'和 5'-gucuagagcuugucgguagtg-3'。大鼠可以使用例如 5'-aucuuacuggacucaaugatt-3'和 5'-gauggcuguucgagaucugtt-3'。或者优选使用本领域技术人员为了抑制酪蛋白激酶 2 的表达而优选的从 siRNA 知识中能够制备得到的任意相同的寡核苷酸或类似物。当把这类 siRNA 施用至细胞或个体时，可以选择地仅仅抑制特异碱基序列酪蛋白激酶 2 的表达，进而，可以治疗肾脏疾病。特别适合于以酪蛋白激酶 2 表达亢进为特点的肾脏疾病，例如肾炎。

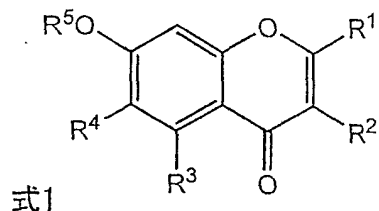
所述的抑制酪蛋白激酶 2 的核酸，可以调剂成为药剂学的组合物，该组合物除了所述核酸外，可以包含载体、增稠剂、赋形剂、缓冲液、保存剂、表面活性剂、脂质体、或脂质制剂等，还可包含抗生素以及麻醉剂等之类的一个或多个活性成分。除了所述医药载体外，处方上也可以包含能够使寡核苷酸容易摄取的阳离子性液体或形成脂质体形式的亲脂性阳离子性化合物。易摄取的组合物之一的就是脂质体（リポフェクチン(Lipofectin), BRL, Bethesda MD）。使用脂质体把寡核苷酸导入细胞内，例如在美国专利第 4,897,355 号和第 4,394,448 号上公开。还进一步地涉及制造由生物学物质形成的脂质体的一般方法，请参照美国专利第 4,235,871 号、第 4,231,877 号、第 4,224,179 号、第 4,753,788 号、第 4,673,567 号、第 4,247,411 号和第 4,814,270 号。或者，寡核苷酸可以与胆固醇、胆酸以及以脱氧胆酸为主的很多固醇中的任何一个亲脂性载体组合。优选的固醇是胆固醇。寡核苷酸还可以与细胞摄取的肽相结合。例如，有效肽，例如，可为肽激素、抗原或抗体以及肽毒素。通过选择由肾脏细胞选择性摄入的肽可以有效地把特定的寡核苷酸进行输送。寡核苷酸可以通过形成活化的氨基烷基衍生物而形成由 5'OH 基介导的共价键。然后所选择的肽可以与氨基和巯基反应性杂二价官能团试剂活化的寡核苷酸形成共价键。后者与肽的半胱氨酸残基结合。如果将细胞暴露于与肽结合的寡核苷酸中，则肽基反义试剂被内吞入细胞，通过寡核苷酸与靶 mRNA 的结合而抑制翻译。请参照 PCT/US89/02363 号 PCT 申请公报。投药量依赖于所处置的状态轻重程度以及反应程度，处置过程中在治疗目的完成之前或者疾病状态减轻之前需要持续数日至数月不等。适当投药计划可以根据体内药剂积累的测定进行计算。本领域普通技术人员能够确定出适当的投药量、投药方法和反复频率。适当投药量虽然依每次寡核苷酸相对有效性而变化，但一般来说，可以基于动物实验的 EC₅₀ 进行计算。例如，如果给出化合物的分子量（从寡核苷酸的序列以及化学构造导出）和 IC₅₀ 的有效量（从实验中求出），则可以按照通常的方法得出以 mg/kg 表示的投药量。很多出版物都涉及了关于哺乳动物基因给药问题。通过脂质体注入基因以及直接向组织注入基因的例子有，ブリガムラ等人（1989）Am. J. Med. Sci., 298: 278-281, ナーベル等人（1990）Science, 249: 1285-1288, ハジンスキ等人（1991）Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4: 206-209; ワン和ホァン（1987），Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 84: 7815-7855。人基因治疗方法概

说记事之例有, アンダーソン, Science (1992) 256: 808-813。

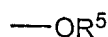
寡核苷酸的给药量如上所述进行适当设定, 但一般来说, 以寡核苷酸的重量换算每天大多为 0.005mg/kg-5mg/kg 是适宜的。另外, 给药途径优选不经口服给药, 例如可以静脉内给药、肌肉内给药、皮下给药等。

在酪蛋白激酶 2 的抑制物质中, 所述抑制酶活性的物质还可以使用至少部分中和酪蛋白激酶 2 活性的抗酪蛋白激酶 2 抗体或其抗原结合性片段。所述抗酪蛋白激酶 2 抗体是将酪蛋白激酶 2 各亚单位的蛋白质或酪蛋白激酶 2 蛋白质的部分肽作为抗原的单克隆抗体及/或多克隆抗体或者是抗体的抗原结合性片段, 只要至少能够部分中和酪蛋白激酶 2 的活性即可, 没有特殊的限制, 可以按照常规方法把酪蛋白激酶 2 或其亚单位作为抗原进行制备。具有中和活性的多克隆抗体可将酪蛋白激酶 2 作为免疫抗原从抗血清中通过常规方法获得。另外, 具有中和活性的单克隆抗体也可以利用酪蛋白激酶 2 或其亚单位作为抗原根据常规方法来制备单克隆抗体, 通过筛选具有酪蛋白激酶 2 中和活性的抗体而获得。抗酪蛋白激酶 2 抗体可以结合被细胞摄取的肽。如上所述, 有效肽例如可包括肽激素、抗原或抗体以及肽毒素。通过选择由肾脏细胞选择性摄取的肽可以达到有效地输送特定的抗酪蛋白激酶 2 抗体的效果。如果将所述抗酪蛋白激酶 2 抗体再施用至细胞或个体, 则可以抗体、抗原特异性地仅对酪蛋白激酶 2 的活性加以选择性地抑制, 进而可以治疗肾脏疾病。尤其适用于以酪蛋白激酶 2 的活性亢进为特征的肾脏疾病, 例如肾炎。

在抑制酪蛋白激酶 2 的物质中, 作为优选抑制该酶活性的物质, 可以进一步用下式 1 表示的化合物举例说明。



(式 1 中, R^1 、 R^2 各自独立地表示氢原子、羟基、或可以具有 1 种或 2 种以上选自式 2 所示取代基的苯基, 并且 R^1 、 R^2 至少一个是具有该取代基的苯基, R^3 、 R^4 各自独立地表示氢原子或由式 2 所示的取代基, R^5 表示氢原子、糖残基、 C_{1-4} 烷基或酰基。)

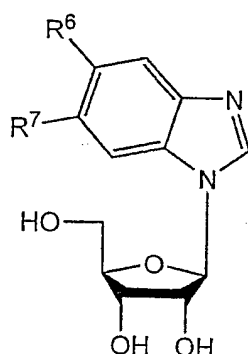


式2

(式中 R^5 表示的意义与式 2 的 R^5 相同。)

式 1 优选糖残基举例为, 葡萄糖、半乳糖、核糖, 作为 C_{1-4} 烷基优选的有甲基、乙基, 作为酰基优选的有乙酰基之类的 C_{1-4} 酰基以及苯甲酰基。

在抑制酪蛋白激酶 2 的物质中, 作为优选抑制该酶活性的物质可以进一步用以下表示的化合物举例说明。

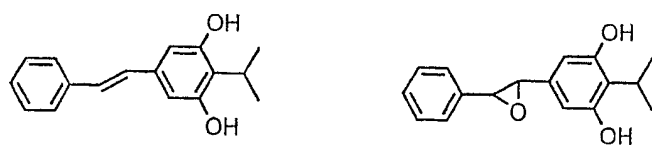


式3

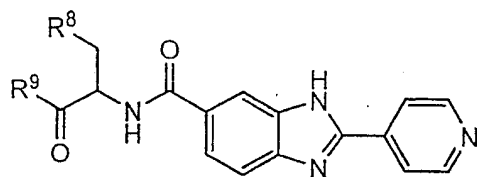
(式 3 中, R^6 、 R^7 各自独立地表示氢原子、卤原子或 C_{1-4} 烷基。),

4,5,6,7-四溴苯并咪唑 TBB (Sarno S, FEBS Letters 2001 469: 44-48)、
5,6 二溴-1-(β -D-呋喃核糖基)苯并咪唑 DRB (Meggio F, Eur. J. Biochem 1990 187: 89-94),

具有以



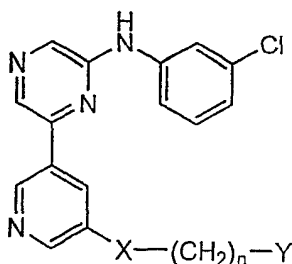
所示结构的化合物,



式4

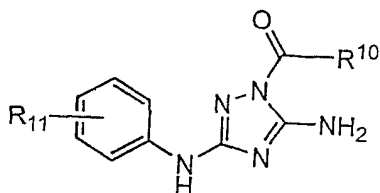
(式 4 中, R^8 表示可以被 1-3 个卤素、甲基、三氟甲基或羟基所取代的苯

基、或喹啉基、乙基甲基スルヒド基、叔丁基苯硫基、N-乙基苯基氨基， R^9 表示羟基或氨基），



式 5

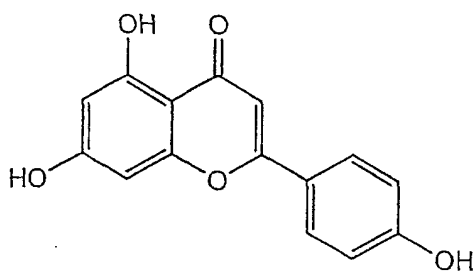
(式 5 中， n 表示 1-3， X 表示-NH-或 CONH-、 Y 表示羟基、哌啶、吡咯烷、哌嗪、吡唑、或三唑。)，



式 6

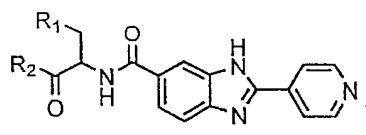
(式 6 中， R^{10} 表示可以被卤素原子、甲基、乙基、或叔丁基取代的 2-噻吩基或苯基， R^{11} 表示-SO₂-NH₂、-SO₂-NHMe 或-SO₂NH[(CH₂)₂N(CH₃)₂]。)，

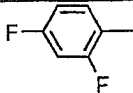
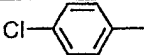
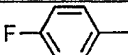
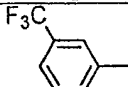
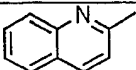
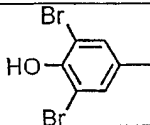
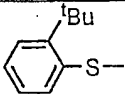
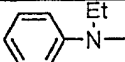
上述通式所含化合物的优选例包括可以下式 7 表示的芹菜素。芹菜素在 10 μ M 浓度下约抑制 25% 由上述酶活性测定法所测定的酪蛋白激酶 2 的功能活性，在 100 μ M 浓度下约抑制 75%，优选降低活性的化合物。

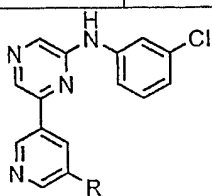


式 7

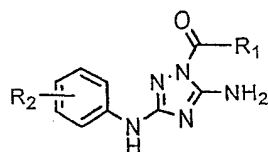
另外，在上述通式所包含的化合物中，特别优选的化合物可具体举例如下。



R1	R2
	-OH
	-OH
	-OH
	-OH
	-NH ₂
	-NH ₂
-CH ₂ CH ₂ SMe	-NH ₂
	-OH
	-OH



R
-CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
-NH CH ₂ CH ₂ CH ₂ - (1-哌啶)
-NH CH ₂ CH ₂ CH ₂ - (1-吡唑)
-NH CH ₂ CH ₂ CH ₂ - (1,2,4-三唑)



R1	R2
2-噻吩基	4-SO ₂ -NH ₂
(3-Cl)-2-噻吩基	4-SO ₂ -NH ₂
3-噻吩基	4-SO ₂ -NH ₂
(5-Et)-2-噻吩基	4-SO ₂ -NH ₂
5-[C(CH ₃) ₃]-2-噻吩基	4-SO ₂ -NH ₂
(5-Et)-2-噻吩基	4-SO ₂ -NHMe
(5-Et)-2-噻吩基	4-SO ₂ -NH[CH ₂] ₂ N(CH ₃) ₂]

这些化合物本身、其制造方法、以及它们都具有对酪蛋白激酶 2 酶活性的抑制效果是公知的，例如，已经披露在美国专利第 6,358,978 号、PCT 公开号 WO01/42231，PCT 公开号 WO02/24681，PCT 公开号 WO02/057240 等。因此，这些化合物很容易按照公知方法制造。

另外，抑制酪蛋白激酶 2 酶活性的物质并不限定为上述的化合物，已知抑制酪蛋白激酶 2 酶活性的其它化合物也可以使用。

上述各种抑制酪蛋白激酶 2 的物质可以是药剂学上允许的盐的形态。它们可为众所周知的任何碱性盐或酸加成盐。碱性盐的例子有：氢氧化铵、碱及碱土类金属氢氧化物、由碳酸盐和碳酸氢盐衍生的物质、以及由脂肪和芳香胺、脂肪二胺和羟基烷基胺衍生的盐。特别用于这些盐的制备碱基包括，氢氧化铵、碳酸钾、碳酸氢钠、氢氧化锂、氢氧化钙、甲基胺、二乙基胺、乙二胺、环己胺和乙醇胺。特别优选钾、钠和锂的盐形式。酸加成盐包括与适宜酸的药剂学上可允许的非毒性加成盐，例如优选与无机酸包括盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸或磷酸，或者与有机酸包括有机羧酸，如乙醇酸、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、水杨酸或 o-乙酰基苯甲酸，或有机磺酸如甲基磺酸、2-羟基乙磺酸、p-甲苯磺酸或萘-2-磺酸形成的盐。

所述抑制酪蛋白激酶 2 酶活性的化合物除了可以各自单独使用外,还可以 2 种以上化合物混合使用。

在本发明中,当将以酪蛋白激酶 2 酶活性的抑制化合物作为有效成分的肾脏疾病的治疗或预防药物施用至动物或人时,可以应用口服、静脉内、肌肉内、皮下、肾脏组织内等任何给药形式。给药时,根据各自的给药方法制备适当的剂型。作为本发明治疗或预防肾脏疾病药物的剂型有,注射剂、舌下剂、经皮膏剂、片剂、胶囊、粉末、颗粒、散剂、丸剂、锭剂、糖浆、乳剂、悬浮剂、栓剂、软膏剂、点眼剂等。根据剂型可以配入制剂上允许的赋形剂,例如乳糖、马铃薯淀粉、碳酸钙、或藻酸钠等。还可以进一步配合一般制剂使用的其他材料,例如血清白蛋白等蛋白质、用于缓冲作用及调整渗透压的盐、载体、赋形剂、基质剂、助溶剂、分散剂、稳定剂、抗氧化剂、保存剂、崩解剂、结合剂、调味剂、润滑剂、涂层剂、着色剂等成分。

给药量可以大范围地变动,以给药方法以及作为给药对象的人等的温血动物的种类、个体年龄、体重、症状轻重、医师的诊断等为依据,但一般来说,体重 1kg 设定每天在 0.001-100mg/kg 体重范围。但是根据患者的症状轻重程度和医师的诊断可以修改给药范围。给药量每天 1 次或分数次给药。当为所述基因治疗时,考虑到安全性可以参考 NIH 的指南进行实施(Recombinant DNA Advisory Committee, Human Gene Therapy, 4, 365-389 (1993))。不言而喻,本发明肾脏疾病的治疗或预防药物可以根据文字说明而使用以达到肾脏疾病的治疗或预防的目的,也可以以肾脏疾病的维持(防止恶化)、减轻(改善症状)等为目的给药。本发明还包括使用酪蛋白激酶 2 的抑制物质而治疗肾脏疾病的方法。

本发明治疗或预防肾脏疾病的药物,可以与现有技术中用于治疗肾脏疾病的类固醇、免疫抑制剂、降压剂(例如,钙阻断剂、血管紧张素转换酶抑制剂、ATII 受体阻断剂、 α 受体阻断药)、抗血小板药物(例如双嘧啶胺醇、地拉卓)、抗凝固药等药剂联合使用。可以通过导入 HGF 等与基因治疗组合起来使用。当使用组合的药物时,各药物分别或同时与药理学上允许的载体、赋形剂、结合剂、稀释剂等混合制成制剂,作为医药组合物可以经口或非经口给药。当把药物分别制成制剂时,各种制剂可以在使用时与稀释剂等混合进行给药,分别制成的每种制剂可以同时或错开时间分别对同一对象给药。

如上所述, 本发明人发现, 处于肾脏疾病状态的肾细胞中酪蛋白激酶 2 的基因表达水平要比正常肾细胞中的表达水平明显升高。因此, 本发明还提供了一种肾脏疾病诊断的方法, 该方法包括测定从机体分离的样品中酪蛋白激酶 2 的活性或含量或酪蛋白激酶 2 基因表达水平的步骤。其中所述“从机体分离的样品”优选肾脏细胞。

以酪蛋白激酶 2 表达作为指标的肾脏疾病诊断方法, 可以把酪蛋白激酶 2 的 α 亚单位、 α' 亚单位和 β 亚单位的表达、特别是基因表达、蛋白质表达以及酶活性表达作为对象进行实施。例如, 当以基因或蛋白质表达为实施对象时, 首先从作为诊断对象的肾脏及作为对照的非肾脏疾病状态的肾脏中分别提取 RNA 或蛋白质。提取的 RNA 或蛋白质的一定量作为检测物分别检测酪蛋白激酶 2 的表达。通过比较作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2 表达和作为对照(正常人)的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2 表达, 可以诊断出诊断对象肾脏中的肾脏疾病状态。当诊断对象肾脏中酪蛋白激酶 2 表达高于作为对照的非肾脏疾病状态的肾脏中酪蛋白激酶 2 表达时, 则诊断对象的肾脏就处于肾脏疾病状态, 尤其被诊断为与酪蛋白激酶 2 相关的肾脏疾病状态。利用该检测系统可以通过测定肾脏组织或细胞中的酪蛋白激酶 2 表达来准确地测定肾脏疾病的程度。

酪蛋白激酶 2 表达可以利用 RT-PCR 法(Polymerase chain reaction method)(「PCR Protocols」 Innis MA, Gelfad DH, Sninsky JJ and White TJ eds., Academic Press, Sandiego (1990))、Northern 印迹法(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989))、阵列法、DNA 芯片法、原位杂交法、原位 RT-PCR (Nucl. Acids Res., 21, 3159-3166 (1993)) 等方法来测定。这些方法本身均为公知的方法, 如上所述, 酪蛋白激酶 2 的 cDNA 序列也是公知的, 所以, 对于所属技术领域的技术人员来说, 既可以很容易地测定细胞中酪蛋白激酶 2 的基因表达, 并且在下述实施例中也作为示例进行了详细描述。优选使用 RT-PCR 法进行测定。即, 提取一定量的各种 RNA 利用逆转录反应分别合成 cDNA。以合成得到的一定量的 cDNA 为模板, 用酪蛋白激酶 2 引物通过 PCR 法各自进行扩增。扩增得到的一定量各种 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳之后, 进行溴化乙锭染色, 分别检测出酪蛋白激酶 2 基因的表达。另外, 关于酪蛋白激酶 2 基因进行 PCR 时, 把恒定表达的基因(例如 G3PDH 或 β -肌动蛋白等

的管家基因)作为内部标准同样进行 PCR 法,该一定量的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳之后,实施溴化乙锭染色,检测其基因表达,可以对酪蛋白激酶 2 基因表达检测结果进行修正。所述的方法都是常规方法。在上面所得到的各种 PCR 产物,按照常规方法例如,双脱氧测序法(Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463 (1977))或 Maxam-Gilbert DNA 测序法(Methods in Enzymology, 65, 499(1980))等,也可以利用市售的测序试剂盒等确认碱基序列信息。在酪蛋白激酶 2 基因 PCR 中所使用的引物只要是能够特异地仅仅扩增酪蛋白激酶 2 的各种亚单位基因均可,并无特别的限制,可以根据这些基因的全长 cDNA 的公知(如上所述)碱基序列信息进行适当的设计。即,作为正义引物,可以使用具有与酪蛋白激酶 2 的 cDNA 正链相同的碱基序列的寡核苷酸,而作为反义引物可以使用具有与酪蛋白激酶 2 的 cDNA 负链相同的碱基序列的寡核苷酸。在正义引物和反义引物之间的区域通过 PCR 扩增。另外,作为引物使用的寡核苷酸可以利用市售的化学合成仪按照常规方法合成。引物的大小没有特殊的限定,通常为 15-30 个碱基序列。例如大鼠的酪蛋白激酶 2 β 亚单位引物可以使用正义引物: 5'-ccgcggacataaagatgagt-3' (序列编号 11)、反义引物: 5'-aaaccagtgccgaagtatgc-3' (序列编号 12)。大鼠的酪蛋白激酶 2 α 亚单位引物可以使用正义引物: 5'-agaaagcttcggctaataga-3' (序列编号 13)、反义引物: 5'-actgaagaaatccctgacat-3' (序列编号 14)。这样一来,酪蛋白激酶 2 基因的表达可以既特异又方便地检测出来。或者也可以采用猝灭剂荧光色素和报道基因(レポーター)荧光色素利用所谓的实时检测 PCR 对 PCR 进行定量。实时检测 PCR 也是公知的,用于该检测的试剂盒可以商购,所以实施起来很容易。

另外,本发明寡核苷酸也可以用作探针,适用于酪蛋白激酶 2 基因表达的检测和诊断。例如,在上面所述的 Northern 印迹法、阵列法、DNA 芯片法、以及原位杂交等方法中都可以作为探针使用。这些方法本身是公知的,本领域普通技术人员可以很容易地实施。也可对上述寡核苷酸进行荧光标记、放射标记、生物素标记等,用作标记探针。将被检核酸或其扩增产物固相化,与标记探针杂交,洗涤后,通过测定结合到固相的标记,可以研究检测体中被检核酸是否存在。或者,将测定用核酸固相化,使被检核酸杂交,同样通过标记探针等也可以检测出结合到固相上的被检核酸。在这种情况下,也把结合到固相上的测定用核酸称之为探针。另外,利用核酸探针测定被检核酸的方法在本领

域是已知的，在缓冲液中，通过把核酸探针与被检核酸在 T_m 或其附近（优选 $\pm 4^\circ\text{C}$ 以内）相接触而进行杂交，洗涤后，通过测定与杂交的标记探针或固相探针结合的模板核酸而实施。该方法包括上述的 Northern 印迹法或原位杂交、更包括 Southern 印迹法等公知的方法。

例如，利用聚核苷酸激酶通过 5'末端的 ^{32}P 标记来制备放射性标记寡核苷酸（Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第 2 卷, p10.59）。接着，把放射性标记寡核苷酸与组织或细胞样本接触，洗涤样本，除去未结合的寡核苷酸。样本中残留的放射活性显示着被结合的寡核苷酸（其表示酪蛋白激酶 2 的表达），通过闪烁计数器或其它常规方法可以进行定量测定。利用放射性标记低聚物可以实施组织的放射自显影技术，确定酪蛋白激酶 2 基因表达的位置、分布或含量。另外，用放射性标记寡核苷酸处理组织切片，如上所述进行洗涤，然后，按照常规的放射自显影技术暴露于照片乳化剂中。利用显影乳化剂在表达酪蛋白激酶 2 基因的范围内显出银粒子图象。通过对银粒子的定量可以检测出酪蛋白激酶 2 的表达。酪蛋白激酶 2 基因表达的荧光检测的类似测定法可用于研究本发明中与荧光素或其他荧光性标记共轭的寡核苷酸以替代放射性标记。这些方式在本领域中是已知的。本领域技术人员按照发明的技术内容很容易把这些已知的方式适用于酪蛋白激酶 2 基因表达的检测之中，并提供一种检测酪蛋白激酶 2 基因表达的新颖且适用的手段。

当将酪蛋白激酶 2 蛋白质表达作为指标时，可使用例如上述的酪蛋白激酶 2 的各个亚单位蛋白质或酪蛋白激酶 2 蛋白质的部分肽作为抗原的单克隆抗体和/或多克隆抗体或其抗体的抗原结合性片段，利用酶联免疫吸附测定法（エライザ、ELISA）、放射免疫测定法（ラジオイムノアッセイ、RIA）以及酶联免疫法（エンザイムイムノアッセイ、EIA）、Western 印迹法、斑点印迹法、蛋白质芯片技术、免疫染色等方法，对酪蛋白激酶 2 的蛋白质或酪蛋白激酶 2 蛋白质的部分肽进行检测。检测酪蛋白激酶 2 的蛋白质所使用的抗体或部分抗体只要是能够特异地仅检测出酪蛋白激酶 2 的各个亚单位蛋白质或酪蛋白激酶 2 的部分蛋白质即可，并没有特别的限制。多克隆抗体是通过将酪蛋白激酶 2 蛋白质等该类抗原经静脉、皮下、肌肉等非口服途径施用至兔子、大鼠、小鼠、山羊等体内而获得。单克隆抗体通过例如下述方法获得：将酪蛋白激酶 2 蛋白质等该

类抗原经非口服途径施用至小鼠，摘除小鼠的胰腺细胞，与小鼠骨髓瘤（骨肿瘤）细胞进行细胞融合后，对所得培养上清液进行纯化。另外，酪蛋白激酶 2 本身也可以方便地根据一般方法制备。例如，可从大鼠、牛等哺乳动物的肾脏、肝脏、胰腺、肺、骨髓、脑、胎盘等脏器以及血液细胞等提取，纯化而制得。培养产生酪蛋白激酶 2 的原代培养细胞或细胞系，通过细胞分离纯化也能够得到酪蛋白激酶 2。或者可以根据公知的基因工程技术把编码酪蛋白激酶 2 的基因重组到大肠杆菌、枯草杆菌、酵母、丝状菌、植物或动物细胞等适宜的宿主细胞中，从该转化株培养物中得到目的重组酪蛋白激酶 2，该方法很容易实施。另外，上述各种免疫测定法或其他方法本身都是已知的，例如，在酶联免疫吸附测定法中，聚乙烯材料的微平板结合抗酪蛋白激酶 2 抗体，将待检测物注入到微平板上，反应一定时间后洗涤，加入以过氧化物酶等酶标记的抗酪蛋白激酶 2 抗体，然后再洗涤，加入过氧化氢等基质和 OPD（邻苯二胺）等显色剂使之显色。通过免疫染色法检测组织中的酪蛋白激酶 2 的方法可通过将取出的组织切片用 FITC（异硫氰酸荧光素）等的荧光物质标记的抗酪蛋白激酶 2 抗体或者用过氧化物酶等酶标记的抗酪蛋白激酶 2 抗体染色。本发明利用这些检测体系通过检测酪蛋白激酶 2 可以很容易地测定肾脏疾病的患病程度。

进一步地，当把酪蛋白激酶 2 酶活性的表达作为指标时，利用蛋白磷酸化分析法、细胞内局部变化分析法等，或者利用酶活性分析法，使酶基质与酪蛋白激酶 2 的蛋白质或酪蛋白激酶 2 蛋白质的部分肽接触，检测出酪蛋白激酶 2 的蛋白质或酪蛋白激酶 2 蛋白质的部分肽的酶活性。其中所述酶基质只要是能作为酪蛋白激酶 2 的蛋白质或肽等的酶基质的任何物质均可，通常使用酪蛋白的蛋白质或酪蛋白激酶 2 蛋白质的部分肽。另外，如上所述，酪蛋白激酶 2 可以根据各种方法制备得到。例如，可以从哺乳动物的脏器中提取纯化得到，或者培养细胞分离纯化得到，或者根据公知的基因工程技术把编码酪蛋白激酶 2 的基因重组到合适的宿主细胞中，从该转化株培养物中得到重组的酪蛋白激酶 2。所得到的酪蛋白激酶 2 其氨基酸序列中的一部分缺失、或取代、或被其他氨基酸序列插入一部分，只要有酶活性都可以用来确定抑制酪蛋白激酶 2 酶活性物质的抑制活性。所述酶活性分析法例如，对于检测物（10ng-0.1mg 蛋白量），把酶基质肽 Arg- Arg- Arg-Glu- Glu- Glu-Thr- Glu- Glu- Glu 或 Arg-Arg- Glu- Glu- Glu- Thr- Glu- Glu- Glu（0.2mM）在缓冲液（20mM MOPS, pH7.2,

25mM β -丙三醇磷酸酯, 5mM EGTA, 1mM 正钒酸钠, 1mM 二硫苏糖醇, 15mM MgCl_2 , 0.1mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 或 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 0.002mCi) 中于 37°C 保温 10 分钟。保温后, 加入 40% 的三氯乙酸停止反应, 然后将反应液的一部分分别吸取到磷酸纤维素纸上 (1-1.5cm 见方 Whatman P18 等)。酶基底物肽的磷酸化可用 0.75% 磷酸每 5 分钟洗涤 3 次磷酸纤维素纸, 再用乙醇洗涤 5 分钟后, 用闪烁仪测定磷酸纤维素纸上的 ^{32}P 放射活性 (Econofluor-2, NEN 等) 来进行 (Methods Enzymol. 第 99 卷, 第 3-6 页 (1983 年) 公开的 R. Roskoski 论文等)。此时, 如果 ^{32}P 放射活性高, 则显示检测物中具有很高的酪蛋白激酶 2 蛋白质或酪蛋白激酶 2 蛋白质部分肽的酶活性表达。与此类似的还有酶活性分析法可以利用商购的酶活性测定试剂盒 (酪蛋白激酶 2 激酶测定, Upstate), 很容易地实施。

上面所述的引物或抗体等的制备技术和纯化技术在本领域已众所周知, 本发明以酪蛋白激酶 2 表达为特征的肾脏疾病的诊断方法如上所述, 包括检测酪蛋白激酶 2 基因的表达、蛋白质的表达、酶活性的表达。为了检测酪蛋白激酶 2 基因的表达, 可以使用酪蛋白激酶 2 基因、其相应的引物和/或探针。为了检测出酪蛋白激酶 2, 可以使用酪蛋白激酶 2 或其部分肽所对应的抗体或抗体的一部分、或特异地识别酪蛋白激酶 2 的核酸 (适配子, aptamer)。还包括把酪蛋白激酶 2 酶底物用于诊断肾脏疾病中。这些技术都可适当地进行选择, 通过利用检测酪蛋白激酶 2 表达的试剂盒可以很方便地进行肾脏疾病的诊断。故本发明诊断肾脏疾病的方法是将上述酪蛋白激酶 2 表达作为指标, 提供诊断肾脏疾病的试剂盒、试剂。

本发明诊断肾脏疾病的方法不仅仅广泛用于上述的各种人体肾脏疾病的诊断, 而且可以用于各种肾脏疾病动物模型。尤其是在很多肾小球肾炎的病历中找到了与免疫机制有关的理论, 基于该理论开始研究并建立各种人的慢性肾炎模型的动物实验模型。例如, 优选使用根据抗肾小球基底膜抗体而诱导的肾脏疾病动物模型。即根据本发明的方法, 很容易地确认肾脏疾病动物模型是否真正患有肾脏疾病。抗肾小球基底膜抗体诱导的肾脏疾病动物模型是通过给大鼠或小鼠施用从兔子中得到的抗肾小球基底膜抗血清而建立的。抗肾小球基底膜抗血清可以按照下述方法获得: 从大鼠或小鼠的肾皮质中制备得到肾小球基底膜, 将其与弗氏完全佐剂注射到兔子中, 分离血清 (「用于新药开发的药效筛选法-最新动向和实际-Vol.1」, 小泽光监修, 清至书院, 1984, P.143)。最普

通的原发性肾小球肾炎的病态模型被广泛地应用。从形态上和临床病症上的分类来看,在原发性肾小球肾炎中,为与半月体形成性肾小球肾炎以及急性进行性肾小球肾炎最相似的病态模型。所述病态可以通过测定肾脏机能标记的尿蛋白排泄量或血液中的肌酐浓度、内源性肌酐清除率来掌握病情。肌酐不能完全被肾脏吸收,因肾脏疾病而导致肾小球滤过机能低下时,血中的肌酐浓度增加,血中的肌酐浓度增加和肌酐清除率则成为肾脏机能的标志。在肾炎诱发后的第2周,血中的肌酐浓度上升到正常值的约2倍,呈现出伴随着一般肾小球滤过能力低下的肾炎肾脏功能不全的症状。这种抗肾小球基底膜抗体诱发导致的肾脏疾病动物模型在世界上被广泛用作人的慢性肾炎模型,还可以采用铃木良雄等的方法(日本肾脏学会杂志 23 卷 323-331 页 1981 年)以及(日本药理学学会杂志 77 卷 407-417 页 1981 年)。另外,也可以确认本发明药剂的实用性。其他可用的肾脏疾病动物模型有:1)利用 Thy-1 单克隆抗体或抗胸腺抗体的方法;2)利用遗传性肾炎大鼠和小鼠的方法;3)利用小鼠、大鼠自然发病糖尿病模型的方法;4)利用给予小鼠或大鼠链脲菌素或四氧嘧啶而引发糖尿病动物模型的方法;5)利用 5/6 肾脏摘除模型的方法等。

下面,基于实施例进一步详细地说明本发明。

实施例 1

分析肾脏组织即构成肾脏的细胞中酪蛋白激酶 2 的表达和肾脏疾病状态之间的关系。即以大鼠为对象,以广泛应用的作为肾脏机能标志的尿蛋白排泄量作为指标来诊断肾脏疾病的状态,同时,在肾脏组织中利用 RT-PCR 法检测酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因的表达,并分析肾脏疾病的状态和酪蛋白激酶 2 表达的关系。

首先,将兔子的抗肾小球基底膜抗血清(0.3ml/kg)由静脉内注射给大鼠(Wistar-Kyoto 系,雄性,体重 190-210g,日本チャールスリバー株式会社),诱发肾炎。在正常组的大鼠里,将正常兔子血清(0.3ml/kg)注射到静脉内。肾炎诱发后第 7-14 天,将所有大鼠置入代谢笼内采取 24 小时的尿,测定尿量后,3000rpm 离心 15 分钟,用 TP テストワコー(和光纯药)测定上清液的尿蛋白。采尿结束后,摘除肾脏,按照常规方法提取肾脏的 RNA,利用 1 μ g 的 RNA 用商购的逆转录反应用试剂盒(Invitrogen)合成 cDNA。取 1 μ l 合成的 cDNA

为模板用酪蛋白激酶 2 α 亚单位的引物通过商购 PCR 用试剂盒 (TAKARA) 进行 PCR 反应并扩增。引物是以大鼠的酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因全长 cDNA 碱基序列为基础建立的正义引物：5'-agaaagcttcggctaata-3'、反义引物：5'-actgaagaaatccctgacat-3'。另外，PCR 温度周期是以 94℃ 30 秒，58℃ 30 秒，72℃ 40 秒为一个循环周期进行 30 个周期循环，最后在 4℃ 下结束 PCR 反应。取 10 μ l 扩增得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，然后进行溴化乙锭染色，分别测定酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因的表达。通过对检测出的酪蛋白激酶 2 进行图像摄影而将酪蛋白激酶 2 基因的表达进行图像文件化，利用 Macintosh 的软件 NIH Image 进行数字化处理。另外，在进行与酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因相关的 PCR 反应时，将恒定表达的基因（管家基因）G3PDH 作为内部标准进行检测，对酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因表达的检测效果进行修正。

如图 1 所示，从结果得知，处于肾脏疾病状态的肾脏组织即肾脏细胞与正常肾脏相比，酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因表达量明显地增多。肾脏组织即肾脏细胞中的酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因表达量越多肾脏疾病状态越恶化，表达量越接近适当数值时，肾脏疾病状态越趋于正常。

实施例 2

将酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因表达作为指标诊断肾脏疾病。即以大鼠为对象，在肾脏组织即构成肾脏的细胞中，利用 RT-PCR 法检测酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因的表达，以此为指标来诊断肾脏疾病。

首先，将兔子的抗肾小球基底膜抗血清 (0.3ml/kg) 由静脉内注射给大鼠 (Wistar-Kyoto 系，雄性，体重 190-210g，日本チャールスリバー株式会社)，诱发肾炎。在正常组的大鼠里，把正常兔子血清 (0.3ml/kg) 注射到静脉内。肾炎诱发后，将大鼠置入代谢笼内采取 24 小时的尿，采尿结束后，摘除肾脏，按照常规方法分别从作为诊断对象的肾脏以及作为对照组的非肾脏疾病状态中肾脏中抽提 RNA，每种 RNA 取 1 μ g 用商购的逆转录反应应用试剂盒 (Invitrogen) 分别合成 cDNA。合成的各种 cDNA 分别取 1 μ l 为模板用酪蛋白激酶 2 α 亚单位的引物采用商购 PCR 用试剂盒 (TAKARA) 进行 PCR 反应并分别进行扩增。引物是以大鼠的酪蛋白激酶 2 α 亚单位基因全长 cDNA 碱基序列为基础建立的正义引物：5'-agaaagcttcggctaata-3'、反义引物：

5'-actgaagaaatccctgacat-3'。另外，PCR 温度周期是以 94℃ 30 秒，58℃ 30 秒，72℃ 40 秒为一个循环周期进行 30 个周期，最后在 4℃ 下结束 PCR 反应。取 10μl 扩增得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，然后进行溴化乙锭染色。分别测定酪蛋白激酶 2 基因的表达。通过对检测出的酪蛋白激酶 2 进行图像摄影而将酪蛋白激酶 2 基因的表达进行图像文件化，利用 Macintosh 的软件 NIH Image 进行数字化处理。另外，在进行与酪蛋白激酶 2 基因相关的 PCR 反应时，将恒定表达的基因（管家基因）G3PDH 作为内部标准进行检测，对酪蛋白激酶 2α 亚单位基因表达的检测效果进行修正。

当对作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2α 亚单位基因的表达和作为对照的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2α 亚单位基因表达进行比较时，作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2 亚单位基因表达比作为阴性对照的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2α 亚单位基因表达要高（表 1）。因此，作为诊断对象的肾脏处于肾脏疾病状态，特别被诊断为与酪蛋白激酶 2 有关的肾脏疾病状态。其中，为了证实这些诊断结果，对处于肾脏疾病状态的大鼠个体中的尿蛋白排泄量进行了测定，该指标是广泛应用的作为肾脏机能标志的指标。作为对照的非肾脏疾病状态的个体也同样进行了测定。其结果，处于肾脏疾病状态的个体的尿蛋白比非肾脏疾病状态的个体明显升高（表 2）。因此，根据本诊断方法，处于肾脏疾病状态的个体明确地被证实患有肾脏疾病，本发明的诊断方法可以准确地判断肾脏疾病的病态。

表 1 以酪蛋白激酶 2α 亚单位基因表达作为指标诊断肾脏疾病时，以数字显示酪蛋白激酶 2α 亚单位基因表达的检测结果。

肾脏	表达比（酪蛋白激酶 2/G3PDH）
诊断对象的肾脏	3.4
非肾脏疾病状态的肾脏	1.1

表 2 以酪蛋白激酶 2α 亚单位基因表达作为指标诊断肾脏疾病时，处于肾脏疾病状态的个体的尿蛋白检测结果。

个体	尿蛋白（mg/天）
处于肾脏疾病状态的个体	142.9
非肾脏疾病状态的个体	28.7

实施例 3

将酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因表达作为指标诊断肾脏疾病。即以大鼠为对象 (Wistar-Kyoto 系, 雄性, 体重 190-210g, 日本チャールス・リバー株式会社), 利用 RT-PCR 法检测肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因的表达, 以此为指标诊断肾脏疾病。

首先, 将兔子的抗肾小球基底膜抗血清 (0.3ml/kg) 由静脉内注射给大鼠, 诱发肾炎。在正常组的大鼠里, 把正常兔子血清 (0.3ml/kg) 注射到静脉内。肾炎诱发后, 将大鼠置入代谢笼内采取 24 小时的尿, 采尿结束后, 摘除肾脏, 按照常规方法分别从作为诊断对象的肾脏和作为对照组的非肾脏疾病状态的肾脏中抽提 RNA, 每种 RNA 取 1 μ g 用商购的逆转录反应应用试剂盒 (Invitrogen) 分别合成 cDNA。合成的各种 cDNA 分别取 1 μ l 为模板, 用酪蛋白激酶 2 β 亚单位的引物根据商购 PCR 用试剂盒 (TAKARA) 进行 PCR 反应并分别进行扩增。引物是以大鼠的酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因全长 cDNA 碱基序列为基础建立的正义引物: 5'-ccgcggacataaagatgagt-3'、反义引物: 5'-aaaccagtgccgaagtatgc-3'。另外, PCR 温度周期是以 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 58 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 40 秒为一个循环周期进行 30 个周期, 最后在 4 $^{\circ}$ C 下结束 PCR 反应。取 10 μ l 扩增得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 然后, 进行溴化乙锭染色。分别测定酪蛋白激酶 2 基因的表达通过对检测出的酪蛋白激酶 2 进行图像摄影而将酪蛋白激酶 2 基因的表达进行图像文件化, 利用 Macintosh 的软件 NIH Image 进行数字化处理。另外, 在进行与酪蛋白激酶 2 基因相关的 PCR 反应时, 将恒定表达的基因 (管家基因) G3PDH 作为内部标准进行检测, 对酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因表达的检测效果进行修正。

当对作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因的表达和作为对照的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因表达进行比较时, 作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因表达比作为阴性对照的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因的表达要高 (表 3)。因此, 诊断对象的肾脏处于肾脏疾病状态, 特别被诊断为与酪蛋白激酶 2 有关的肾脏疾病状态。其中, 为了证实这些诊断结果, 对处于肾脏疾病状态的大鼠个体中的尿中蛋白排泄量进行了测定, 该指标是广泛应用得作为肾机能标志的指标。作为对照的非肾脏疾病状态的个体也同样进行了测定。其结果, 处于肾脏疾病

状态的个体的尿蛋白比非肾脏疾病状态的个体明显升高（表 4）。因此，根据本诊断方法，处于肾脏疾病状态的个体明确地被证实患有肾脏疾病，本发明的诊断方法可以准确地判断肾脏疾病的病态。

表 3 以酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因表达作为指标诊断肾脏疾病时，以数字显示酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因表达的检测结果。

肾脏	表达比（酪蛋白激酶 2/G3PDH）
诊断对象的肾脏	4.5
非肾脏疾病状态的肾脏	1.4

表 4 以酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因表达作为指标诊断肾脏疾病时，处于肾脏疾病状态的个体的尿蛋白的检测结果。

个体	尿蛋白（mg/天）
处于肾脏疾病状态的个体	146.2
非肾脏疾病状态的个体	37.4

实施例 4

以酪蛋白激酶 2 表达为指标诊断肾脏疾病。即以自然发病的糖尿病性肾病的糖尿病大鼠（Zucker 系）为对象，用 RT-PCR 法检测肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因的表达，以此为指标诊断糖尿病性肾病。从糖尿病性肾病自然发病的糖尿病大鼠（Zucker fa/fa 系，6 个月龄，日本チャールスリバー株式会社）和作为对照的非糖尿病性肾病自然发病的大鼠（Zucker Lean 系，6 个月龄，日本チャールスリバー株式会社）采血，采血结束后摘除肾脏。按照常规方法分别从作为诊断对象的肾脏和作为对照组的非肾脏疾病状态的肾脏中抽提 RNA，每种 RNA 取 1 μ g 用商购的逆转录反应试剂盒（Invitrogen）分别合成 cDNA。合成的各种 cDNA 分别取 1 μ l 为模板，用酪蛋白激酶 2 α 亚单位的引物采用商购 PCR 用试剂盒（TAKARA）进行 PCR 反应并分别进行扩增。引物是以大鼠的酪蛋白激酶 2 β 亚单位基因全长 cDNA 碱基序列为基础建立的正义引物：5'-ccgcggacataaagatgagt-3'、反义引物：5'-aaaccagtgccgaagtatgc-3'。另外，PCR 温度周期是以 94 $^{\circ}$ C 30 秒，58 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 40 秒为一个循环周期再进

行 30 个周期，最后在 4℃下结束 PCR 反应。取 10μl 扩增得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，然后进行溴化乙锭染色，分别测定酪蛋白激酶 2 基因的表达。通过对检测出的酪蛋白激酶 2 进行图像摄影而将酪蛋白激酶 2 基因的表达进行图像文件化，利用 Macintosh 的软件 NIH Image 进行数字化处理。另外，在进行与酪蛋白激酶 2 基因相关的 PCR 反应时，将恒定表达的基因（管家基因）G3PDH 作为内部标准进行检测，对酪蛋白激酶 2β 亚单位基因表达的检测效果进行修正。

当对作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2β 亚单位基因的表达和作为对照的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2β 亚单位基因表达进行比较时，作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2β 亚单位基因表达比作为阴性对照的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2β 亚单位基因表达要高（表 5）。因此，诊断对象的肾脏处于肾脏疾病状态，特别被诊断为与酪蛋白激酶 2 有关的肾脏疾病状态。其中，为了证实这些诊断结果，对处于肾脏疾病状态的大鼠个体血液中的肌酐和尿素氮浓度进行了测定，这两个指标是广泛应用的座位肾机能标志的指标。作为对照的非肾脏疾病状态的个体也同样进行了测定。其结果，处于肾脏疾病状态的个体血液中肌酐浓度比非肾脏疾病状态的个体明显升高（表 6）。而且，处于肾脏疾病状态的个体血液中尿素氮素浓度亦明显地高于非肾脏疾病状态的个体（表 6）。因此，根据本诊断方法，处于肾脏疾病状态的个体明确地被证实患有肾脏疾病，本发明的诊断方法可以准确地判断肾脏疾病的病态。

表 5 以酪蛋白激酶 2 基因表达作为指标诊断肾脏疾病时，以数字显示酪蛋白激酶 2 基因表达的检测结果。

肾脏	表达比（酪蛋白激酶 2/G3PDH）
诊断对象的肾脏	3.6
非肾脏疾病状态的肾脏	1.0

表 6 以酪蛋白激酶 2 基因表达作为指标诊断肾脏疾病时，处于肾脏疾病状态的个体的血中肌酸酐浓度和血中尿素氮浓度的检测结果。

个体	血中肌酸酐浓度 (mg/100ml)	血中尿素氮浓度 (mg/100ml)
处于肾脏疾病状态的个体	0.89	69.0
非肾脏疾病状态的个体	0.38	18.3

实施例 5

以酪蛋白激酶 2 含量为指标诊断肾脏疾病。即以大鼠为对象，用 Western 印迹法检测肾脏中酪蛋白激酶 2 α 亚单位和 β 亚单位的蛋白量，以此为指标检测肾脏疾病。

首先，将兔子的抗肾小球基底膜抗血清（0.3ml/kg）由静脉内注射给大鼠（Wistar-Kyoto 系，雄性，体重 190-210g，日本チャールスリバー株式会社），诱发肾炎。在正常组的大鼠里，把正常兔子血清（0.3ml/kg）注射到静脉内。诱发肾炎后把大鼠放入代谢笼内采取 24 小时的尿，采尿结束后，摘除肾脏，按照常规方法分别从作为诊断对象的肾脏和作为对照组的非肾脏疾病状态的肾脏中提取蛋白质，各样品的蛋白质(1mg/ml, 20 μ l) 分别用 12.5%聚丙烯酰胺凝胶(PAGE, ATTO)电泳(PAGERUN, ATTO, 40mA, 84min)。把电泳得到的各种蛋白质转移到 PVDF 膜（微孔）（100V, 90min）上。封闭膜（ブロッキングエース，大日本制药，4℃，1 小时），用含有 Tween20 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次（10min）后，用一次抗体进行孵育（室温，1 小时），所述一次抗体为针对酪蛋白激酶 2 α 亚单位的抗体（来自山羊，Santa cruz 产品，用时稀释 100 倍）或者为针对酪蛋白激酶 2 β 亚单位的抗体（来自山羊，Santa cruz 产品，用时稀释 100 倍）。孵育后，用含有 Tween20 的 PBS 洗涤 3 次（10min），然后用二次抗体进行孵育（室温，1 小时），所述二次抗体为针对山羊 IgG 的 HRP 标记抗体（Santa cruz 产品，用时稀释 1000 倍）。保温后，用 ECL 试剂（Amersham）分别测定酪蛋白激酶 2 α 亚单位或酪蛋白激酶 2 β 亚单位的蛋白量。通过对检测出的酪蛋白激酶 2 进行图像摄影而将酪蛋白激酶 2 的蛋白量进行图像文件化，利用 Macintosh 的软件 NIH Image 进行数字化处理。

当对作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2 α 亚单位蛋白量和作为对照的

非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2 α 亚单位蛋白量进行比较时, 作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2 α 亚单位蛋白量比作为阴性对照的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2 α 亚单位蛋白量要高(表 7)。而且, 当对作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位蛋白量和作为对照的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位蛋白量进行比较时, 作为诊断对象的肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位蛋白量明显地高于作为阴性对照的非肾脏疾病状态的肾脏中的酪蛋白激酶 2 β 亚单位蛋白量(表 8)。因此, 诊断对象的肾脏处于肾脏疾病状态, 特别被诊断为与酪蛋白激酶 2 有关的肾脏疾病状态。其中, 为了证实这些诊断结果, 对处于肾脏疾病状态的大鼠个体中的尿蛋白排泄量进行了测定, 该指标是广泛应用的作为肾机能标志的指标。而且作为对照的非肾脏疾病状态的个体也同样进行了测定。其结果, 处于肾脏疾病状态的个体尿蛋白比非肾脏疾病状态的个体明显升高(表 9)。因此, 根据本诊断方法, 处于肾脏疾病状态的个体明确地被证实患有肾脏疾病, 本发明的诊断方法可以准确地判断肾脏疾病的病态。并且容易理解, 在构成肾脏的细胞中, 酪蛋白激酶 2 的表达水平即含量越多肾脏疾病越恶化, 表达水平即含量越接近适当, 肾脏疾病的状态也越接近正常。

表 7 以酪蛋白激酶 2 α 亚单位含量作为指标诊断肾脏疾病时, 以数字显示酪蛋白激酶 α 亚单位含量的检测结果。

肾脏	酪蛋白激酶 2 α 亚单位的蛋白含量比
诊断对象的肾脏	2.2
非肾脏疾病状态的肾脏	1.0

表 8 以酪蛋白激酶 β 亚单位含量作为指标诊断肾脏疾病时, 以数字显示酪蛋白激酶 β 亚单位蛋白含量的检测结果。

肾脏	酪蛋白激酶 2 β 亚单位的蛋白含量比
诊断对象的肾脏	2.4
非肾脏疾病状态的个体	1.0

表 9 以酪蛋白激酶 2 α 亚单位和 β 亚单位的含量作为指标诊断处于肾脏疾病的个体时，尿蛋白的检测结果。

个体	尿蛋白 (mg/天)
处于肾脏疾病状态的个体	151.7
非肾脏疾病状态的个体	38.3

实施例 6

分析酪蛋白激酶 2 的蛋白量和酶活性的关系。即把各种蛋白量 (0、10 或 20ng 蛋白量) 的酪蛋白激酶 2 (Upstate)，在含有酶基底物 Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu (10nmol, 0.2mM, Upstate) 的缓冲液 (20mM MOPS, pH7.2, 25mM β -丙三醇磷酸酯, 5mM EGTA, 1mM 正钒酸钠, 1mM 二硫苏糖醇, 15mM $MgCl_2$, 0.1mM $[\gamma^{32}P]ATP$, 0.002 mCi, Amersham) 0.05ml 中于 37℃ 保温 10 分钟。保温后，加入 40% 的三氯乙酸 0.025ml 停止反应后，把反应液的一部分 0.025ml 分别吸取到磷酸纤维素纸 (1cm 见方)。用 0.75% 磷酸 25ml 每 5 分钟洗涤 3 次磷酸纤维素纸，再用乙酮 25ml 洗涤 5 分钟后用放射性检测器测定磷酸纤维素纸上 ^{32}P 放射活性。

如图 10 所示，从结果可以得知，酪蛋白激酶 2 的蛋白量越多，酪蛋白激酶 2 的酶活性即功能越高，可以理解，酪蛋白激酶 2 的蛋白质表达水平即含量与酪蛋白激酶 2 的酶活性即功能存在着极为密切的关系。这表明，酪蛋白激酶 2 基因的表达、蛋白质的表达水平即含量以及酶活性即功能越高，则肾脏疾病状态越恶化，它们被抑制为接近适当值时则肾脏疾病状态也越趋于正常。

表 10 酪蛋白激酶 2 的蛋白含量与酶活性的关系。

蛋白量 (ng)	酶活性 (cpm)
0	4511
10	46751
20	92203

实施例 7

本实施例是为确定本发明的实用性而实施的,也就是说研究针对酪蛋白激酶 2 α 亚单位的反义寡核苷酸给药的肾炎大鼠模型效果。给大鼠 (Wistar-Kyoto 系, 雄性, 体重 190-210g) 静脉注射兔子抗肾小球基底膜抗血清 (0.3ml/kg), 诱发肾炎。使用了选择性抑制酪蛋白激酶 2 α 亚单位表达的反义寡核苷酸 5'-GTAATCATCTTGATTACCCCA-3' 以及不抑制酪蛋白激酶 2 α 亚单位表达的阴性对照的正义寡核苷酸 5'-TGGGGTATCAATCAAGATGATTAC-3', 以可适宜抑制酪蛋白激酶 2 的 12 μ g/天的给药量, 用连接有聚乙烯管 (PE-10) 的 Alzet 泵 (0.25 μ l/小时, 1002, Alzet) 从肾炎诱发前一天开始到第七天持续地在肾炎大鼠的肾脏组织内给药。另外, 寡核苷酸的核酸分子为含有硫代磷酸酯部分的 S-寡核苷酸, 为更容易摄取寡核苷酸而使用阳离子液体 (Polyplus transfection)。即动物实验组的构成是, 正常组 (未给予酪蛋白激酶 2 α 亚单位反义寡核苷酸以及反义寡核苷酸的正常大鼠, n=8)、肾炎对照组 (未给予酪蛋白激酶 2 α 亚单位反义寡核苷酸以及反义寡核苷酸的肾炎大鼠, n=8)、肾炎+酪蛋白激酶 2 α 亚单位反义寡核苷酸给药组 (本发明组, 给予酪蛋白激酶 2 α 亚单位反义寡核苷酸的肾炎大鼠, n=4)、肾炎+酪蛋白激酶 2 α 亚单位正义寡核苷酸给药组 (阴性对照组, 给予酪蛋白激酶 2 α 亚单位正义寡核苷酸的肾炎大鼠) 的 4 个实验组。诱发后第 7 天, 把所有大鼠都置入代谢笼内采取 24 小时的尿, 测定尿量后, 3000rpm 离心 15 分钟, 对上清液中的尿蛋白进行定量。采尿结束后, 摘除肾脏, 根据常规方法分别提取肾脏组织的蛋白质, 各蛋白质 (1mg/ml, 20 μ l) 分别用 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGEL ATTO) 进行电泳 (PAGERUN, ATTO, 40mA, 84min)。把电泳得到的各蛋白质转移到 PVDF 膜 (微孔) (100V, 90min) 上。封闭膜 (ブロッキングエース, 大日本制药, 4 $^{\circ}$ C, 1 小时), 用含有 Tween20 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次 (10min) 后, 用一次抗体进行孵育 (室温, 1 小时), 所述一次抗体为针对酪蛋白激酶 2 α 亚单位的抗体 (来自山羊, Santa cruz 产品, 用时稀释 100 倍)。孵育后, 用含有 Tween20 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次 (10min), 然后用二次抗体进行孵育 (室温, 1 小时), 所述二次抗体为针对山羊 IgG 的 HRP 标记抗体 (Santa cruz 产品, 用时稀释 1000 倍)。保温后, 用 ECL 试剂分别测定酪蛋白激酶 2 α 亚单位的蛋白量。通过对检测出的酪蛋白激酶 2 进行图像摄影而将酪蛋白激酶 2 的蛋白量进行图像

文件化, 利用 Macintosh 的软件 NIH Image 进行数字化处理。

如表 11 和图 2 所示, 从结果可知, 本发明的酪蛋白激酶 2 α 亚单位反义寡核苷酸明显地降低了肾脏组织即构成肾脏的细胞中的酪蛋白激酶 2 α 亚单位蛋白质的表达量即含有量 (表 11), 明显地降低了作为肾脏疾病状态的重要指标的蛋白尿 (图 2)。另一方面, 作为阴性对照的酪蛋白激酶 2 α 亚单位正义寡核苷酸并未降低肾脏组织即构成肾脏的细胞中的酪蛋白激酶 2 α 亚单位蛋白质的表达量即含有量 (表 11), 也并未明显降低肾炎大鼠的蛋白尿 (图 2)。也就是说, 其从一般认知理论上说明了降低或抑制肾脏组织即构成肾脏的细胞中的酪蛋白激酶 2 的方法和物质就具有使肾脏疾病状态接近正常状态的作用或效果, 具有治疗和预防肾脏疾病的作用或效果。在酪蛋白激酶 2 的反义寡核苷酸给药组和肾炎对照组之间, 以及在酪蛋白激酶 2 的反义寡核苷酸给药组和阴性对照组之间, 没有体重上的差异, 也没有发现脏器有什么障碍, 由此可以清楚地确定本反义寡核苷酸作为肾脏疾病的治疗药物是安全的适用的。

表 11 针对肾炎大鼠模型的肾脏组织中的酪蛋白激酶 2 α 亚单位蛋白含量, 以数值显示酪蛋白激酶 2 α 亚单位反义寡核苷酸给药和正义寡核苷酸给药的效果。

肾脏	酪蛋白激酶 2 α 亚单位的蛋白含量比
给予反义寡核苷酸的大鼠肾脏	0.45
给予正义寡核苷酸的大鼠肾脏	1.07
没有给药的肾脏	1

实施例 8

研究化合物芹菜素对酪蛋白激酶 2 的酶活性的抑制作用。即把酪蛋白激酶 2 (10 ng 蛋白量, Upstate), 在含有酶基底物 Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu (10nmol, 0.2mM, Upstate) 和 0.1-100 μ M 浓度范围的芹菜素的缓冲液(20mM MOPS, pH7.2, 25mM β -丙三醇磷酸酯, 5mM EGTA, 1mM 正钒酸钠, 1mM 二硫苏糖醇, 15mM MgCl₂, 0.1mM[γ -³²P]ATP, 0.002 mCi, Amersham) 0.05ml 中 37℃保温 10 分钟。保温后, 加入 40%的三氯乙酸 0.025ml 停止反应, 把反应液的一部分 0.025ml 分别吸取

到磷酸纤维素纸(1cm见方)。用0.75%磷酸25ml每5分钟洗涤3次磷酸纤维素纸,再用乙酮25ml洗涤5分钟后,用放射线检测器测定磷酸纤维素纸上的 ^{32}P 放射活性。将不含芹菜素缓冲液中测定的 ^{32}P 放射活性设为100%,分别用%表示含有各种浓度的抑制物质在缓冲液中测定的 ^{32}P 放射活性的比例,由此,确定芹菜素对酪蛋白激酶2的机能活性或效果的影响。

从其结果可知,芹菜素在10 μM 的浓度内抑制了25%的酪蛋白激酶2的酶活性,在100 μM 的浓度内抑制了75%的酪蛋白激酶2的酶活性(图3)。因此,优选芹菜素作为抑制酪蛋白激酶2酶活性的物质。

实施例9

本实施例是为进一步确认本发明的实用性而实施的,也就是说,本实施例使用优选的芹菜素作为抑制酪蛋白激酶2酶活性的物质,研究在肾炎大鼠模型中给予酪蛋白激酶2抑制药物的效果。

给大鼠(Wistar-Kyoto系,雄性,体重190-210g,日本チャールスリバー株式会社)静脉注射兔子抗肾小球基底膜抗血清(0.3ml/kg),诱发肾炎。在正常组的大鼠里,把正常兔子血清(0.3ml/kg)注射到静脉内。把作为优选抑制酪蛋白激酶2酶活性的抑制物质芹菜素以每1kg体重(根据对酪蛋白激酶的抑制而适当地确定)给予20mg的剂量在肾炎诱发后第1天到第14天每天1次在肾炎大鼠腹腔内连续给药。给药的芹菜素溶液为将芹菜素溶于二甲基亚砜和0.5%(w/v)羧甲基纤维素钠以1:4比例混合的混合液中。在没有给予酪蛋白激酶2抑制药物的大鼠里,在腹腔内仅注入溶剂。即,实验组的构成是:正常组(未给酪蛋白激酶2抑制药物的正常大鼠,n=5)、肾炎对照组(未给酪蛋白激酶2抑制药物的肾炎大鼠,n=5)以及肾炎+酪蛋白激酶2抑制药物给药组(本发明组,给予酪蛋白激酶2抑制药物的肾炎大鼠,n=5)的3个组。诱发后第7天,将所有大鼠都放入代谢笼内采取24小时的尿,测定尿量后,3000rpm离心15分钟,用TPテストワコー(和光纯药)对上清液中的尿蛋白进行定量。

如图4所示,本发明的酪蛋白激酶2的抑制物质使作为肾脏疾病重要指标的蛋白尿明显地降低,几乎使肾脏疾病状态达到正常化。也就是,对于处于肾脏疾病状态的肾脏来说,若使用化合物抑制酪蛋白激酶2的酶活性,就具有使肾脏疾病状态接近正常的作用或效果,并显示出具有治疗或预防肾脏疾病的作用

用或效果。换言之，对于处于肾脏疾病状态的肾脏来说，具有抑制酪蛋白激酶 2 功能的物质，显示出具有使肾脏疾病状态接近正常的作用或效果，并具有治疗或预防肾脏疾病的作用或效果。即，一般来说，具有抑制酪蛋白激酶 2 作用的方法和物质明显具有治疗或预防肾脏疾病的作用或效果。通过给予酪蛋白激酶 2 的抑制物质，能够治疗肾脏疾病。在酪蛋白激酶 2 的抑制药物给药组和肾炎对照组之间没有体重差异，也没有发现其他脏器有什么障碍，所以，很显然本发明化合物可以安全地用作肾脏疾病的治疗药物。

实施例 10

本实施例是为了更进一步地确认本发明的实用性而实施的。虽然已知各种药理作用，但作为具有抑制酪蛋白激酶 2 酶活性的作用已知还有 3-甲基-1,6,8-三羟基蒽醌(Battistutta R et al. J Biol Chem 2000, 275(38):29618-22)，通过使用该药物来研究肾炎大鼠模型的酪蛋白激酶 2 抑制药物的给药效果。

给大鼠（Wistar-Kyoto 系，雄性，体重 190-210g，日本チャールスリバー株式会社）静脉注射兔子抗肾小球基底膜抗血清（0.3ml/kg），诱发肾炎。在正常组大鼠里，把正常兔子血清（0.3ml/kg）注射到静脉内。把 3-甲基-1,6,8-三羟基蒽醌(Battistutta R et al. J Biol Chem 2000, 275(38):29618-22)以每 1kg 体重给予 20mg（根据对酪蛋白激酶 2 的抑制而适当地确定）的剂量在肾炎诱发后第 1 天到第 14 天每天 1 次在肾炎大鼠腹腔内连续给药。给药的 3-甲基-1,6,8-三羟基蒽醌溶液为将 3-甲基-1,6,8-三羟基蒽醌溶于二甲基亚砜和 0.5%（w/v）羧甲基纤维素钠以 1：4 比例混合的混合液中。在没有给予酪蛋白激酶 2 的抑制药物的大鼠里，在其腹腔内仅注射溶剂。即，实验组的构成是：正常组（未给酪蛋白激酶 2 抑制药物的正常大鼠，n=5）、肾炎对照组（未给酪蛋白激酶 2 抑制药物的肾炎大鼠，n=5）以及肾炎+酪蛋白激酶 2 抑制药物给药组（本发明组，给予酪蛋白激酶 2 抑制药物的肾炎大鼠，n=5）的 3 个组。诱发后第 7 天，将所有大鼠都放入代谢笼内采取 24 小时的尿，测定尿量后，3000rpm 离心 15 分钟，用 TP テストワコー（和光纯药）定量其上清液的尿蛋白。诱发后第 14 天，把大鼠放入代谢笼内采取 24 小时的尿，测定尿量后，3000rpm 离心 15 分钟，用肌酐テストワコー（和光纯药）对上清液中的尿肌酐浓度进行定量。结束采尿后，从尾部静脉采血，所采的血液经 3000rpm 离心 15 分钟后，用肌酐

テストワーク（和光純薬）对血清中的血肌酐浓度进行定量。根据尿中的肌酐浓度和血中的肌酐浓度求出肌酐清除率。另外，摘除肾，用 10%缓冲福尔马林固定后，用苏木精·伊红染色制作标本并镜检。

如图 5、6 所示，虽然已知各种药理作用，但作为已知具有抑制酪蛋白激酶 2 酶活性作用的 3-甲基-1,6,8-三羟基蒽醌，一方面使作为肾脏疾病重要指标的蛋白尿明显地降低，另一方面几乎使血中的肌酐浓度、肌酐清除率达到正常化。即使从肾组织病理的观察到的结果分析 3-甲基-1,6,8-三羟基蒽醌给药组与肾炎对照组的比较，也证实了肾小球和肾小管间质的改善。也就是，通过给与酪蛋白激酶 2 的抑制药物，预示能够治疗肾脏疾病。

产业上的可利用性

本发明肾脏疾病的治疗或预防药物可以用于肾脏疾病的治疗或预防。另外，根据本发明的诊断方法（检测方法）可以准确地、方便地诊断（检测）肾脏疾病。

序列表

<110>	东丽株式会社	
<120>	肾脏疾病的治疗或预防药物以及肾脏疾病的诊断方法	
<130>	03PF264-PCT	
<160>	27	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于抑制酪蛋白激酶2 α 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400>	1	
	gtaatcatct tgattacccc a	21
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于抑制酪蛋白激酶2 β 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400>	2	
	ggttggccgg ccgcttgggc c	21
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于抑制酪蛋白激酶2 α' 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400>	3	
	ttcaaatacc aaagctggtg	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于抑制酪蛋白激酶2 α' 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400>	4	
	atcaaagtct gtcaggatct	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于抑制酪蛋白激酶2 α' 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400>	5	
	tggataaagt tttcccagcg	20
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 用于抑制酪蛋白激酶2 α' 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400> 6	
accaagtttt cgaacccagt t	21
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于抑制酪蛋白激酶2 β 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400> 7	
ctgctcatct tgacgtcagc	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于抑制酪蛋白激酶2 β 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400> 8	
ctcagagcta aagcctcgtg	20
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于抑制酪蛋白激酶2 β 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400> 9	
acccgaccgc ggcaggcgaa	20
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于抑制酪蛋白激酶2 β 亚单位基因的反义寡核苷酸	
<400> 10	
gcggcgaccg ctacagcgca	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于PCR扩增大鼠酪蛋白激酶2 β 亚单位基因的寡核苷酸引物	
<400> 11	
ccgcgacat aaagatgagt	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于PCR扩增大鼠酪蛋白激酶2 β 亚单位基因的寡核苷酸引物	
<400> 12	
aaaccagtgc cgaagtatgc	20

<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于PCR扩增大鼠酪蛋白激酶2 α 亚单位基因的寡核苷酸引物	
<400>	13	
	agaaagcttc ggctaataga	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于PCR扩增大鼠酪蛋白激酶2 α 亚单位基因的寡核苷酸引物	
<400>	14	
	actgaagaaa tccctgacat	20
<210>	15	
<211>	2187	
<212>	DNA	
<213>	人类	
<400>	15	
	gagcagaggg gagacggccg ccgccctggc cgcttccacc acagtttgaa gaaaacaggt	60
	ctgaaacaag gtcttaccac cagctgcttc tgaacacagt gactgccaga tctccaaaca	120
	tcaagtcag ctttgctcgc caacctgtct gac atg tgc gga ccc gtg cca agc	174
	Met Ser Gly Pro Val Pro Ser	
	1 5	
	agg gcc aga gtt tac aca gat gtt aat aca cac aga cct cga gaa tac	222
	Arg Ala Arg Val Tyr Thr Asp Val Asn Thr His Arg Pro Arg Glu Tyr	
	10 15 20	
	tgg gat tac gag tca cat gtg gtg gaa tgg gga aat caa gat gac tac	270
	Trp Asp Tyr Glu Ser His Val Val Glu Trp Gly Asn Gln Asp Asp Tyr	
	25 30 35	
	cag ctg gtt cga aaa tta ggc cga ggt aaa tac agt gaa gta ttt gaa	318
	Gln Leu Val Arg Lys Leu Gly Arg Gly Lys Tyr Ser Glu Val Phe Glu	
	40 45 50 55	
	gcc atc aac atc aca aat aat gaa aaa gtt gtt gtt aaa att ctc aag	366
	Ala Ile Asn Ile Thr Asn Asn Glu Lys Val Val Val Lys Ile Leu Lys	
	60 65 70	
	cca gta aaa aag aag aaa att aag cgt gaa ata aag att ttg gag aat	414
	Pro Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Leu Glu Asn	
	75 80 85	
	ttg aga gga ggt ccc aac atc atc aca ctg gca gac att gta aaa gac	462
	Leu Arg Gly Gly Pro Asn Ile Ile Thr Leu Ala Asp Ile Val Lys Asp	
	90 95 100	
	cct gtg tca cga acc ccc gcc ttg gtt ttt gaa cac gta aac aac aca	510
	Pro Val Ser Arg Thr Pro Ala Leu Val Phe Glu His Val Asn Asn Thr	
	105 110 115	

gac ttc aag caa ttg tac cag acg tta aca gac tat gat att cga ttt Asp Phe Lys Gln Leu Tyr Gln Thr Leu Thr Asp Tyr Asp Ile Arg Phe 120 125 130 135	558
tac atg tat gag att ctg aag gcc ctg gat tat tgt cac agc atg gga Tyr Met Tyr Glu Ile Leu Lys Ala Leu Asp Tyr Cys His Ser Met Gly 140 145 150	606
att atg cac aga gat gtc aag ccc cat aat gtc atg att gat cat gag Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro His Asn Val Met Ile Asp His Glu 155 160 165	654
cac aga aag cta cga cta ata gac tgg ggt ttg gct gag ttt tat cat His Arg Lys Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu Phe Tyr His 170 175 180	702
cct ggc caa gaa tat aat gtc cga gtt gct tcc cga tac ttc aaa ggt Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Arg Val Ala Ser Arg Tyr Phe Lys Gly 185 190 195	750
cct gag cta ctt gta gac tat cag atg tac gat tat agt ttg gat atg Pro Glu Leu Leu Val Asp Tyr Gln Met Tyr Asp Tyr Ser Leu Asp Met 200 205 210 215	798
tgg agt ttg ggt tgt atg ctg gca agt atg atc ttt cgg aag gag cca Trp Ser Leu Gly Cys Met Leu Ala Ser Met Ile Phe Arg Lys Glu Pro 220 225 230	846
ttt ttc cat gga cat gac aat tat gat cag ttg gtg agg ata gcc aag Phe Phe His Gly His Asp Asn Tyr Asp Gln Leu Val Arg Ile Ala Lys 235 240 245	894
gtt ctg ggg aca gaa gat tta tat gac tat att gac aaa tac aac att Val Leu Gly Thr Glu Asp Leu Tyr Asp Tyr Ile Asp Lys Tyr Asn Ile 250 255 260	942
gaa tta gat cca cgt ttc aat gat atc ttg ggc aga cac tct cga aag Glu Leu Asp Pro Arg Phe Asn Asp Ile Leu Gly Arg His Ser Arg Lys 265 270 275	990
cga tgg gaa cgc ttt gtc cac agt gaa aat cag cac ctt gtc agc cct Arg Trp Glu Arg Phe Val His Ser Glu Asn Gln His Leu Val Ser Pro 280 285 290 295	1038
gag gcc ttg gat ttc ctg gac aaa ctg ctg cga tat gac cac cag tca Glu Ala Leu Asp Phe Leu Asp Lys Leu Leu Arg Tyr Asp His Gln Ser 300 305 310	1086
cgg ctt act gca aga gag gca atg gag cac ccc tat ttc tac act gtt Arg Leu Thr Ala Arg Glu Ala Met Glu His Pro Tyr Phe Tyr Thr Val 315 320 325	1134
gtg aag gac cag gct cga atg ggt tca tct agc atg cca ggg ggc agt Val Lys Asp Gln Ala Arg Met Gly Ser Ser Ser Met Pro Gly Gly Ser 330 335 340	1182
acg ccc gtc agc agc gcc aat atg atg tca ggg att tct tca gtg cca	1230

Thr	Pro	Val	Ser	Ser	Ala	Asn	Met	Met	Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Val	Pro	
345						350					355					
acc cct tca ccc ctt gga cct ctg gca ggc tca cca gtg att gct gct	1278															
Thr Pro Ser Pro Leu Gly Pro Leu Ala Gly Ser Pro Val Ile Ala Ala																
360 365 370 375																
gcc aac ccc ctt ggg atg cct gtt cca gct gcc gct ggc gct cag cag	1326															
Ala Asn Pro Leu Gly Met Pro Val Pro Ala Ala Ala Gly Ala Gln Gln																
380 385 390																
taa cgccctatc tgtctcctga tgccctgagca gaggtggggg agtccaccct	1379															
ctccttgatg cagcttgccg ctggcgggga ggggtgaaac acttcagaag caccgtgtct	1439															
gaaccgttgc ttgtggattt atagtagttc agtcataaaa aaaaaaatta taataggctg	1499															
attttctttt ttcttttttt tttaactcga acttttcata actcagggga ttccctgaaa	1559															
aattacctgc aggtggaata tttcatggac aatttttttt tctcccctcc caaathtagt	1619															
tcctcatcac aaaagaacaa agataaacca gcctcaatcc cggctgctgc atttaggtgg	1679															
agacttcttc ccattcccac cattgttcct ccaccgtccc acactttagg gggttggtat	1739															
ctcgtgctct tctccagaga ttacaaaaat gtagcttctc aggggaggca ggaagaaagg	1799															
aaggaaggaa agaaggaagg gaggacccaa tctataggag cagtggactg cttgctggtc	1859															
gcttacatca ctttactcca taagcgcttc agtgggggta tcttagtggc tcttgtggaa	1919															
gtgtgtctta gttacatcaa gatgttaaaa tctacccaaa atgcagacag atactaaaac	1979															
tctgtcagta gatcatgtct tactgatcta accctaaatc caactcattt atacttttat	2039															
ttttagttca gtttaaaatg ttgatacctt cctcccagg ctccttacct tggtcttttc	2099															
cctgttcac tcccaacatg ctgtgctcca tagctggtag gagaggggaag gcaaaatctt	2159															
tcttagtttt ctttatctt	2178															
<210> 16																
<211> 1677																
<212> DNA																
<213> 人类																
<400> 16																
tgtaaccag gctggagtgc agtggcgcaa tctcagctca ctgcaacctc cacctccctg	60															
gttcaagega ttctctgcc tctctcgccc gacgccccgc gtcccccgcc gcgcgcgcgc	120															
cgccacctc tgcgccccgc gccgcccccc ggtcccgccc gcc atg ccc ggc ccg	175															
Met Pro Gly Pro																
1																
gcc gcg ggc agc agg gcc cgg gtc tac gcc gag gtg aac agt ctg agg	223															
Ala Ala Gly Ser Arg Ala Arg Val Tyr Ala Glu Val Asn Ser Leu Arg																
5 10 15 20																

agc cgc gag tac tgg gac tac gag gct cac gtc ccg agc tgg ggt aat Ser Arg Glu Tyr Trp Asp Tyr Glu Ala His Val Pro Ser Trp Gly Asn 25 30 35	271
caa gat gat tac caa ctg gtt cga aaa ctt ggt cgg gga aaa tat agt Gln Asp Asp Tyr Gln Leu Val Arg Lys Leu Gly Arg Gly Lys Tyr Ser 40 45 50	319
gaa gta ttt gag gcc att aat atc acc aac aat gag aga gtg gtt gta Glu Val Phe Glu Ala Ile Asn Ile Thr Asn Asn Glu Arg Val Val Val 55 60 65	367
aaa atc ctg aag cca gtg aag aaa aag aag ata aaa cga gag gtt aag Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Val Lys 70 75 80	415
att ctg gag aac ctt cgt ggt gga aca aat atc att aag ctg att gac Ile Leu Glu Asn Leu Arg Gly Gly Thr Asn Ile Ile Lys Leu Ile Asp 85 90 95 100	463
act gta aag gac ccc gtg tca aag aca cca gct ttg gta ttt gaa tat Thr Val Lys Asp Pro Val Ser Lys Thr Pro Ala Leu Val Phe Glu Tyr 105 110 115	511
atc aat aat aca gat ttt aag caa ctc tac cag atc ctg aca gac ttt Ile Asn Asn Thr Asp Phe Lys Gln Leu Tyr Gln Ile Leu Thr Asp Phe 120 125 130	559
gat atc cgg ttt tat atg tat gaa cta ctt aaa gct ctg gat tac tgc Asp Ile Arg Phe Tyr Met Tyr Glu Leu Leu Lys Ala Leu Asp Tyr Cys 135 140 145	607
cac agc aag gga atc atg cac agg gat gtg aaa cct cac aat gtc atg His Ser Lys Gly Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro His Asn Val Met 150 155 160	655
ata gat cac caa cag aaa aag ctg cga ctg ata gat tgg ggt ctg gca Ile Asp His Gln Gln Lys Lys Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala 165 170 175 180	703
gaa ttc tat cat cct gct cag gag tac aat gtt cgt gta gcc tca agg Glu Phe Tyr His Pro Ala Gln Glu Tyr Asn Val Arg Val Ala Ser Arg 185 190 195	751
tac ttc aag gga cca gag ctc ctc gtg gac tat cag atg tat gat tat Tyr Phe Lys Gly Pro Glu Leu Leu Val Asp Tyr Gln Met Tyr Asp Tyr 200 205 210	799
agc ttg gac atg tgg agt ttg ggc tgt atg tta gca agc atg atc ttt Ser Leu Asp Met Trp Ser Leu Gly Cys Met Leu Ala Ser Met Ile Phe 215 220 225	847
cga agg gaa cca ttc ttc cat gga cag gac aac tat gac cag ctt gtt Arg Arg Glu Pro Phe Phe His Gly Gln Asp Asn Tyr Asp Gln Leu Val 230 235 240	895
cgc att gcc aag gtt ctg ggt aca gaa gaa ctg tat ggg tat ctg aag Arg Ile Ala Lys Val Leu Gly Thr Glu Glu Leu Tyr Gly Tyr Leu Lys	943

245	250	255	260	
aag tat cac ata gac cta gat cca cac ttc aac gat atc ctg gga caa				991
Lys Tyr His Ile Asp Leu Asp Pro His Phe Asn Asp Ile Leu Gly Gln	265	270	275	
cat tca cgg aaa cgc tgg gaa aac ttt atc cat agt gag aac aga cac				1039
His Ser Arg Lys Arg Trp Glu Asn Phe Ile His Ser Glu Asn Arg His	280	285	290	
ctt gtc agc cct gag gcc cta gat ctt ctg gac aaa ctt ctg cga tac				1087
Leu Val Ser Pro Glu Ala Leu Asp Leu Leu Asp Lys Leu Leu Arg Tyr	295	300	305	
gac cat caa cag aga ctg act gcc aaa gag gcc atg gag cac cca tac				1135
Asp His Gln Gln Arg Leu Thr Ala Lys Glu Ala Met Glu His Pro Tyr	310	315	320	
ttc tac cct gtg gtg aag gag cag tcc cag cct tgt gca gac aat gct				1183
Phe Tyr Pro Val Val Lys Glu Gln Ser Gln Pro Cys Ala Asp Asn Ala	325	330	335	340
gtg ctt tcc agt ggt ctc acg gca gca cga tga agactggaaa gcgacgggtc				1236
Val Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ala Ala Arg	345	350		
tggtgcggtt ctccacttt tccataagca gaacaagaac caaatcaaac gtcttaacgc				1296
gtatagagag atcacgttcc gtgagcagac acaaaacggt ggcaggtttg gcgagcacga				1356
actagaccaa gcgaaggga gccaccacc gtatatcaaa cctcacttcc gaatgtaaaa				1416
ggctcacttg ccttttgctt cctgttgact tcttcccgac ccagaaagca tggggaatgt				1476
gaagggtatg cagaatgttg ttggttactg ttgctccccg agccctcaa ctcgtcccg				1536
ggccgcctgt tttccagca aaccacgcta actagctgac cacagactcc acagtggggg				1596
gacgggcgca gtatgtggca tggcggcagt tacatattat tattttaaaa gtatatatta				1656
ttgaataaaa ggttttaaaa g				1677
<210> 17				
<211> 648				
<212> DNA				
<213> 人类				
<400> 17				
atg agc agc tca gag gag gtg tcc tgg att tcc tgg ttc tgt ggg ctc				48
Met Ser Ser Ser Glu Glu Val Ser Trp Ile Ser Trp Phe Cys Gly Leu	1	5	10	15
cgt ggc aat gaa ttc ttc tgt gaa gtg gat gaa gac tac atc cag gac				96
Arg Gly Asn Glu Phe Phe Cys Glu Val Asp Glu Asp Tyr Ile Gln Asp	20	25	30	
aaa ttt aat ctt act gga ctc aat gag cag gtc cct cac tat cga caa				144
Lys Phe Asn Leu Thr Gly Leu Asn Glu Gln Val Pro His Tyr Arg Gln	35	40	45	

gct cta gac atg atc ttg gac ctg gag cct gat gaa gaa ctg gaa gac Ala Leu Asp Met Ile Leu Asp Leu Glu Pro Asp Glu Glu Leu Glu Asp 50 55 60	192
aac ccc aac cag agt gac ctg att gag cag gca gcc gag atg ctt tat Asn Pro Asn Gln Ser Asp Leu Ile Glu Gln Ala Ala Glu Met Leu Tyr 65 70 75 80	240
gga ttg atc cac gcc cgc tac atc ctt acc aac cgt ggc atc gcc cag Gly Leu Ile His Ala Arg Tyr Ile Leu Thr Asn Arg Gly Ile Ala Gln 85 90 95	288
atg ttg gaa aag tac cag caa gga gac ttt ggt tac tgt cct cgt gtg Met Leu Glu Lys Tyr Gln Gln Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Pro Arg Val 100 105 110	336
tac tgt gag aac cag cca atg ctt ccc att ggc ctt tca gac atc cca Tyr Cys Glu Asn Gln Pro Met Leu Pro Ile Gly Leu Ser Asp Ile Pro 115 120 125	384
ggt gaa gcc atg gtg aag ctc tac tgc ccc aag tgc atg gat gtg tac Gly Glu Ala Met Val Lys Leu Tyr Cys Pro Lys Cys Met Asp Val Tyr 130 135 140	432
aca ccc aag tca tca aga cac cat cac acg gat ggc gcc tac ttc ggc Thr Pro Lys Ser Ser Arg His His His Thr Asp Gly Ala Tyr Phe Gly 145 150 155 160	480
act ggt ttc cct cac atg ctc ttc atg gtg cat ccc gag tac cgg ccc Thr Gly Phe Pro His Met Leu Phe Met Val His Pro Glu Tyr Arg Pro 165 170 175	528
aag aga cct gcc aac cag ttt gtg ccc agg ctc tac ggt ttc aag atc Lys Arg Pro Ala Asn Gln Phe Val Pro Arg Leu Tyr Gly Phe Lys Ile 180 185 190	576
cat ccg atg gcc tac cag ctg cag ctc caa gcc gcc agc aac ttc aag His Pro Met Ala Tyr Gln Leu Gln Leu Gln Ala Ala Ser Asn Phe Lys 195 200 205	624
agc cca gtc aag acg att cgc tga Ser Pro Val Lys Thr Ile Arg 210 215	648

<210> 18

<211> 2180

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 18

gggtttcttcc ttcatatgcc agctagagag ccttgccctcc ctggagctca tagtccaggc	60
tgtgttcttg ggacctgagg ggtgtggtca gggcacagag actctctcag agcactggga	120
gtgggattcc tgctgtaagg gaaggatgt cataggctcag ttgaccaatg accagacctt	180
aacatggctc ccagccttag gcatgcggag cctaggagtc ccttcaaccc tggcctgtga	240
ttttccagc tcagatgaca aagacatcta ggcccagtgt cttgagaatc cctatagtca	300
aggattagag tcctcctcag tgagtcagct cccccagtca gtaccctcac aagatatcaa	360
ccgaattcgg tttttttttt tttttttttt taaatatgta aggctttcaa tttattacag	420
atcacccaag aacataatga tatacatgta gtcagaaaac acgatgtaga aatcatagtg	480

agttgtccag acatagtcag tagattattc tttctggcat gctccagtgt caagacctca	540
ataaagagca ctaaaatcct tccatacaat taagtatcag cgatgtacca tattgcagaa	600
aggggtggct gagcaacagt ttgttgatac tataagactt ccatgctcaa cagtcgtacg	660
gttgactca gcacagctct ggtttccata tacaatttt ccatctcgta ggggagcgcg	720
gctagtgcg ctgccgcttc caccgcagta actgccagat cttccaacat cacgttcagc	780
tttgtccgtc aacctgtctg ac atg tcg gga ccc gtg cca agc agg gcc aga	832
Met Ser Gly Pro Val Pro Ser Arg Ala Arg	
1 5 10	
gtt tac aca gat gtt aac aca cac aga ccc cga gag tac tgg gac tat	880
Val Tyr Thr Asp Val Asn Thr His Arg Pro Arg Glu Tyr Trp Asp Tyr	
15 20 25	
gaa tca cat gtg gtg gaa tgg gga aat caa gat gac tac cag ctt gtt	928
Glu Ser His Val Val Glu Trp Gly Asn Gln Asp Asp Tyr Gln Leu Val	
30 35 40	
cga aaa tta ggc agg ggc aaa tac agt gaa gtg ttt gag gcc atc aat	976
Arg Lys Leu Gly Arg Gly Lys Tyr Ser Glu Val Phe Glu Ala Ile Asn	
45 50 55	
atc aca aat aat gaa aaa gtt gtt gtt aaa att ctc aag cca gta aaa	1024
Ile Thr Asn Asn Glu Lys Val Val Val Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys	
60 65 70	
aag aag aaa att aag cgt gaa ata aag att ttg gag aat tta aga ggt	1072
Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Leu Glu Asn Leu Arg Gly	
75 80 85 90	
ggg ccc aac atc atc aca ctt gca gac att gtg aaa gac cct gtg tct	1120
Gly Pro Asn Ile Ile Thr Leu Ala Asp Ile Val Lys Asp Pro Val Ser	
95 100 105	
cga acc cct gcc ttg gtt ttt gaa cat gta aac aac aca gac ttc aag	1168
Arg Thr Pro Ala Leu Val Phe Glu His Val Asn Asn Thr Asp Phe Lys	
110 115 120	
caa ttg tac cag acg tta aca gac tat gac att cga ttt tac atg tat	1216
Gln Leu Tyr Gln Thr Leu Thr Asp Tyr Asp Ile Arg Phe Tyr Met Tyr	
125 130 135	
gaa att ctg aaa gcc ctg gat tat tgt cac agc atg ggg att atg cac	1264
Glu Ile Leu Lys Ala Leu Asp Tyr Cys His Ser Met Gly Ile Met His	
140 145 150	
aga gac gtg aaa ccg cat aat gtc atg att gat cat gag cac aga aag	1312
Arg Asp Val Lys Pro His Asn Val Met Ile Asp His Glu His Arg Lys	
155 160 165 170	
ctt cgg cta ata gat tgg ggt tta gca gag ttt tac cat cct ggc caa	1360
Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu Phe Tyr His Pro Gly Gln	
175 180 185	
gag tat aat gtc cga gtt gct tcc cga tat ttc aaa ggt cca gag cta	1408
Glu Tyr Asn Val Arg Val Ala Ser Arg Tyr Phe Lys Gly Pro Glu Leu	
190 195 200	
ctt gta gat tat cag atg tac gat tat agt ttg gat atg tgg agc ttg	1456
Leu Val Asp Tyr Gln Met Tyr Asp Tyr Ser Leu Asp Met Trp Ser Leu	
205 210 215	
ggg tgt atg ctg gca agt atg atc ttc cgg aag gag cca ttt ttc cat	1504
Gly Cys Met Leu Ala Ser Met Ile Phe Arg Lys Glu Pro Phe Phe His	
220 225 230	
gga cat gac aat tat gat cag ttg gtg agg ata gcc aag gtt ctg gga	1552
Gly His Asp Asn Tyr Asp Gln Leu Val Arg Ile Ala Lys Val Leu Gly	
235 240 245 250	
acg gaa gat tta tat gac tat att gac aag tac aac att gaa tta gat	1600
Thr Glu Asp Leu Tyr Asp Tyr Ile Asp Lys Tyr Asn Ile Glu Leu Asp	
255 260 265	
cca cgt ttc aac gat atc ttg ggc aga cac tcc cgt aag cga tgg gaa	1648
Pro Arg Phe Asn Asp Ile Leu Gly Arg His Ser Arg Lys Arg Trp Glu	

Cys	Glu	Asn	Gln	Pro	Met	Leu	Pro	Ile	Gly	Leu	Ser	Asp	Ile	Pro	Gly	
115						120					125					
gag	gcc	atg	gtg	aag	ctc	tac	tgc	ccc	aag	tgc	atg	gac	gtg	tac	aca	548
Glu	Ala	Met	Val	Lys	Leu	Tyr	Cys	Pro	Lys	Cys	Met	Asp	Val	Tyr	Thr	
130					135					140					145	
ccc	aag	tcc	tct	agg	cac	cac	cac	acg	gat	ggc	gca	tac	ttc	ggc	act	596
Pro	Lys	Ser	Ser	Arg	His	His	His	Thr	Asp	Gly	Ala	Tyr	Phe	Gly	Thr	
				150					155					160		
ggt	ttc	cct	cac	atg	ctc	ttc	atg	gtg	cat	ccc	gag	tac	cgg	ccc	aag	644
Gly	Phe	Pro	His	Met	Leu	Phe	Met	Val	His	Pro	Glu	Tyr	Arg	Pro	Lys	
			165					170					175			
cgg	ccg	gcc	aac	cag	ttt	gtg	ccc	agg	ctc	tac	ggt	ttc	aag	atc	cat	692
Arg	Pro	Ala	Asn	Gln	Phe	Val	Pro	Arg	Leu	Tyr	Gly	Phe	Lys	Ile	His	
		180					185					190				
cca	atg	gcc	tac	cag	ctg	cag	ctc	caa	gcc	gcc	agc	aac	ttc	aag	agc	740
Pro	Met	Ala	Tyr	Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Ser	Asn	Phe	Lys	Ser	
	195					200					205					
cca	gtc	aag	acg	att	cgc	tga	gtgccctccc	acctcctctg	cctgtgacac	cacc						795
Pro	Val	Lys	Thr	Ile	Arg											
	210															
gtccctccgc	tgccaccctt	tcaggaagtc	tatggttttt	agtttaaat	aaaggaattg											855
ttactgtggt	ggggatatga	aataaaggaa	gagaaggcta	aaaaaaaaa	aaaaaacga											915
attcggcatc	tcacctaggt	gtatacagct	gcacattacc	aatggctgca	gaacacccaa											975
tcatgacctc	tagtgcttta	tagcaaaagt	gtaaagtgtg	acctgggtga	ccagcattgc											1035
catggttaca	tccatttgcg	taatcaagca	gctgtgcaac	tgctcttcta	acagatgaac											1095
agctgcatgc	atctccagca	ggcatggatt	gtctcttgtc	tatgacctc	agtgcgttca											1155
cttagagtat	ttctagagtt	tgagtccttg	ccgtgataga	gccatgtagg	gaatgcactg											1215
attgcatggt	accccaagcg	tcatgaaacc	ttccgacacg	gtgacctatt	taatggtctt											1275
gtttgttgac	atgacaaatt	aacattctta	gagttacatc	tcgaaaaaag	catttgtgat											1335
agataagccc	tttgagcett	gtggctaaat	ttttgtggct	ttgtttaact	ttcaaagggt											1395
atatatgcac	taaccttttt	tgatggctaa	gtaggcttta	aattacagta	aattttttca											1455
aataaaaactg	gctgtaaaat	atattttgaa	ttagagttgt	tcactttttc	atagctactt											1515
atgttttttt	cccaataatt	tatttcacat	ctctaccagt	gaacgcagcc	catcactaga											1575
aaatgacctt	gtcctgattt	cagtttcaac	tattagtttt	aaagctcact	gttgaataag											1635
aggaagtggg	ggtgcatttt	aaattgactt	tcatgtgctt	ttaaaatatg	acagatctcc											1695
ttgataatgt	acttttattt	gatctcaagt	tgtataaaac	caataaattt	gtgttacttt											1755
gattgcagta	gtatcttatg	catagtgtat	ccatgttata	tgcagactag	ttaggcaact											1815
gttttcttag	ttacaagctt	cacttttgtg	cagttaaaaa	aacaaaaagta	ggctacagtc											1875
tgtgccatgt	tgatgtacag	tttctgaaat	tgttttacaa	gactttgata	ataaaaccct											1935
taaactcaca	aaaaaaaaaa	aaaaaaacc														1964

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抑制人酪蛋白激酶2 β 亚单位RNA的siRNA

<400> 20

cuaccgacaa gcucuagact t

21

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抑制人酪蛋白激酶2 β 亚单位RNA的siRNA

<400> 21

gucuagagcu ugucgguagt t

21

<210>	22	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抑制人酪蛋白激酶2 β 亚单位RNA的siRNA	
<400>	22	
	cuaccgacaa gcucuagaca t	21
<210>	23	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抑制人酪蛋白激酶2 β 亚单位RNA的siRNA	
<400>	23	
	gucuagagcu ugucgguagt g	21
<210>	24	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抑制大鼠酪蛋白激酶2 β 亚单位RNA的siRNA	
<400>	24	
	aucuuacugg acucaaugat t	21
<210>	25	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抑制大鼠酪蛋白激酶2 β 亚单位RNA的siRNA	
<400>	25	
	gauggcuguu cgagaucugt t	21
<210>	26	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	测定酪蛋白激酶2活性中使用的酪蛋白激酶2的底物	
<400>	26	
	Arg Arg Arg Glu Glu Glu Thr Glu Glu Glu	
	1 5 10	
<210>	27	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	测定酪蛋白激酶2活性中使用的酪蛋白激酶2的底物	
<400>	27	
	Arg Arg Glu Glu Glu Thr Glu Glu Glu	
	1 5	

表达比 (酪蛋白激酶 /G3PDH)

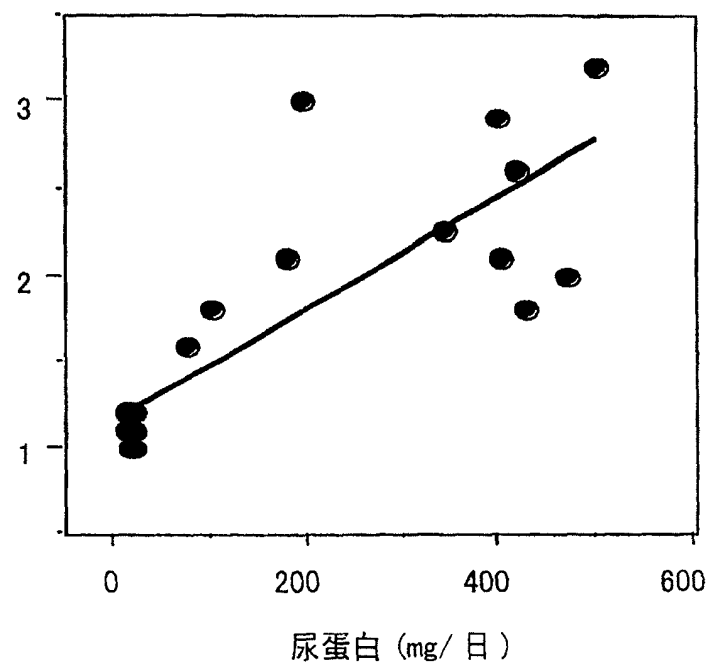


图 1

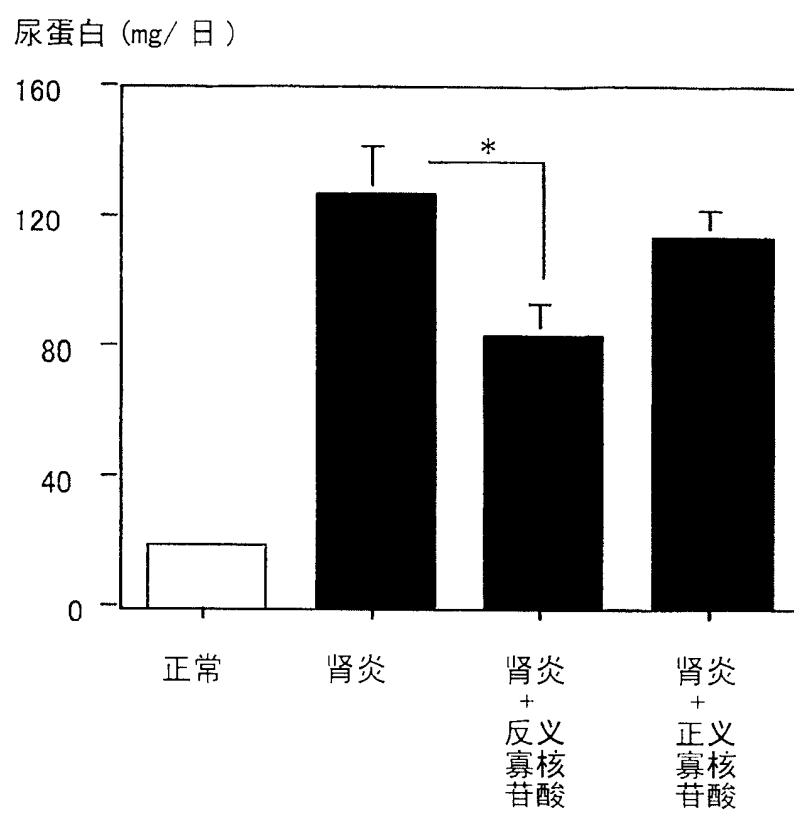


图 2

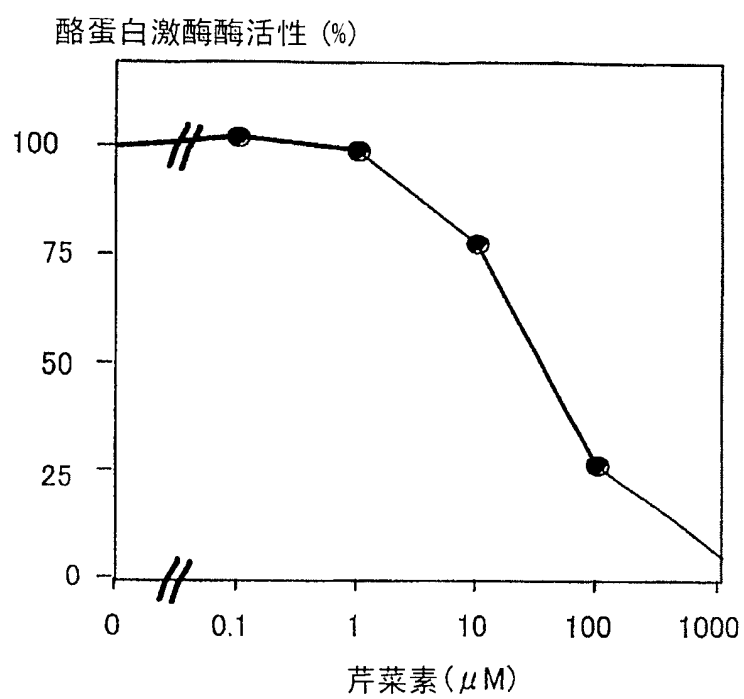


图 3

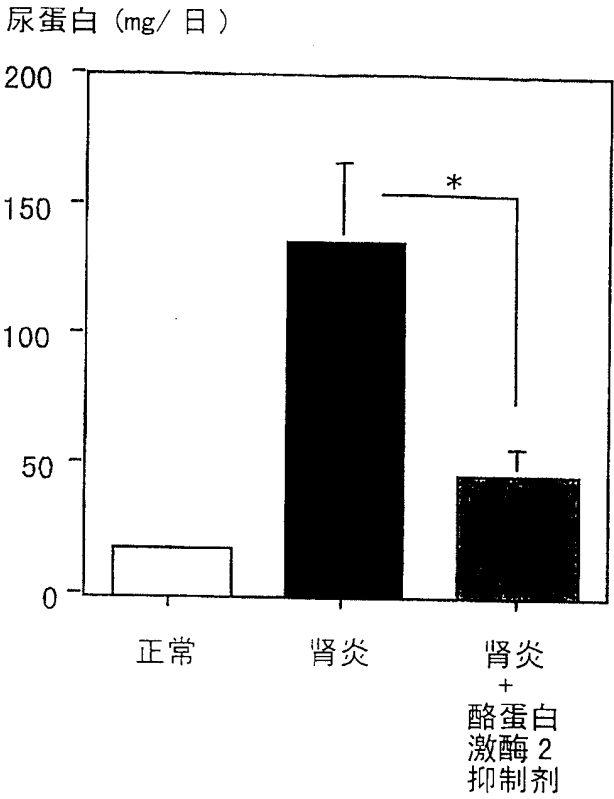


图 5

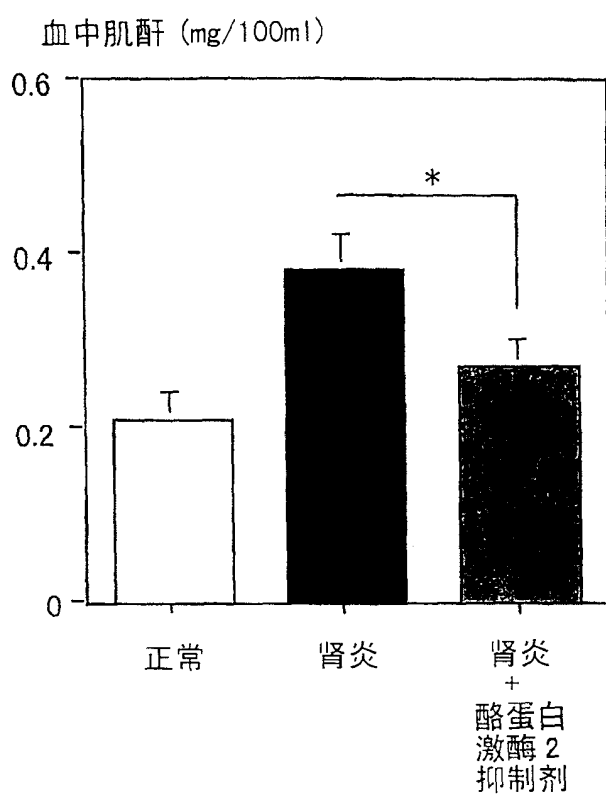


图 6

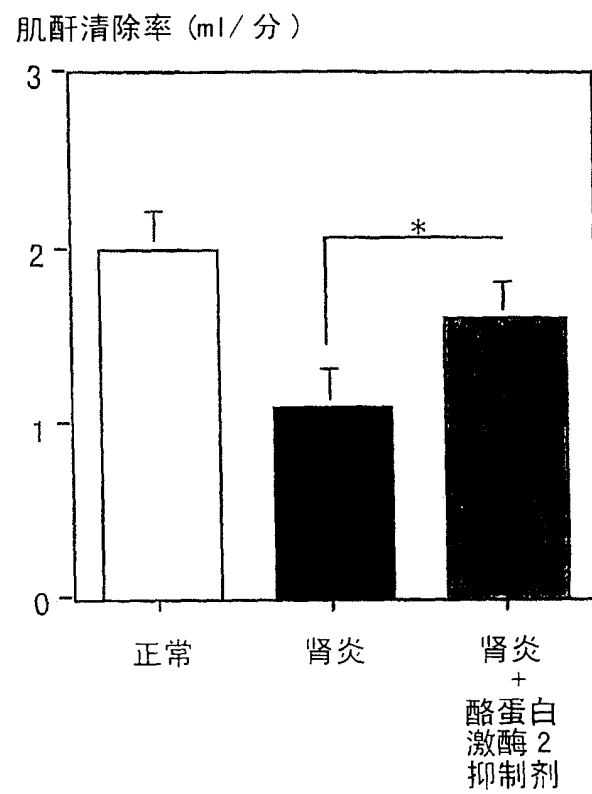


图 7