

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3784076号
(P3784076)

(45) 発行日 平成18年6月7日(2006.6.7)

(24) 登録日 平成18年3月24日(2006.3.24)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 9/12 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/48 (2006.01)
 G O 1 N 33/68 (2006.01)

C 1 2 N 9/12
 C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 Q 1/48 Z
 G O 1 N 33/68

請求項の数 14 (全 58 頁)

(21) 出願番号 特願平10-534999
 (86) (22) 出願日 平成10年2月9日(1998.2.9)
 (65) 公表番号 特表2002-503953(P2002-503953A)
 (43) 公表日 平成14年2月5日(2002.2.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/002522
 (87) 国際公開番号 W01998/035048
 (87) 国際公開日 平成10年8月13日(1998.8.13)
 審査請求日 平成13年5月14日(2001.5.14)
 (31) 優先権主張番号 08/797,522
 (32) 優先日 平成9年2月7日(1997.2.7)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/046,727
 (32) 優先日 平成9年5月16日(1997.5.16)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 プリンストン ユニヴァーシティ
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
 8 5 4 4 プリンストン ニュー サウス
 ビルディング 5 ピーオーボックス
 3 6
 (74) 代理人
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人
 弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変性ヌクレオチド三燐酸基質を利用できる組み換えタンパクキナーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

突然変異タンパク質キナーゼであって、

以下の突然変異タンパク質キナーゼ：

3 3 8 位にアラニン又はグリシンを有する突然変異 v - S r c、及び、

該突然変異 v - S r c 以外の突然変異タンパク質キナーゼであって、該 v - S r c 以外の
突然変異タンパク質キナーゼの A T P 結合領域と v - S r c の A T P 結合領域との間のア
ミノ酸配列アラインメントによって v - S r c の 3 3 8 位に該当することが決定された部
位にアラニン又はグリシンを有する突然変異タンパク質キナーゼ

からなる群より選ばれ、

該突然変異タンパク質キナーゼは、N⁶位に共有結合した、少なくとも3つの炭素原子を
 含む置換基を有する A T P 類縁体に結合し、更に、該 A T P 類縁体を利用するリン酸化反
 応を触媒する

ことを特徴とする突然変異タンパク質キナーゼ。

【請求項2】

以下の突然変異タンパク質キナーゼ：

3 3 8 位にアラニン又はグリシンを有し、更に、3 2 3 位にアラニン又はグリシンを有す
る突然変異 v - S r c、及び

該突然変異 v - S r c 以外の突然変異タンパク質キナーゼであって、該 v - S r c 以外の
突然変異タンパク質キナーゼの A T P 結合領域と v - S r c の A T P 結合領域との間のア

10

20

ミノ酸配列アラインメントによってv - S r cの338位に該当することが決定された部位にアラニン又はグリシンを有し、更に、該v - S r c以外の突然変異タンパク質キナーゼのA T P結合領域とv - S r cのA T P結合領域との間のアミノ酸配列アラインメントによってv - S r cの323位に該当することが決定された部位にアラニン又はグリシンを有する突然変異タンパク質キナーゼ
 からなる群より選ばれる、請求項1に記載の突然変異タンパク質キナーゼ。

【請求項3】

前記A T P類縁体が、 N^6 - (シクロペンチル) A T P、 N^6 - (シクロペンチルオキシ) A T P、 N^6 - (シクロヘキシル) A T P、 N^6 - (シクロヘキシルオキシ) A T P、 N^6 - (ベンジル) A T P、 N^6 - (ベンジルオキシ) A T P、 N^6 - (ピロリジノ) A T P及び N^6 - (ピペリジノ) A T Pからなる群より選ばれる、請求項1に記載の突然変異タンパク質キナーゼ。

10

【請求項4】

前記A T P類縁体が N^6 - (シクロペンチル) A T Pである、請求項3に記載の突然変異タンパク質キナーゼ。

【請求項5】

前記A T P類縁体が N^6 - (ベンジル) A T Pである、請求項3に記載の突然変異タンパク質キナーゼ。

【請求項6】

請求項1又は2に記載の突然変異タンパク質キナーゼをコードする核酸。

20

【請求項7】

突然変異タンパク質キナーゼに対するタンパク質基質を同定する方法であって、
 透過化処理を施した突然変異タンパク質キナーゼ発現細胞を、放射能標識類縁体と共に適切な期間インキュベートする工程、
 該細胞を溶解する工程、
 溶解物をS D S - P A G Eにより分離する工程、及び
 タンパク質基質を同定する工程
 を含み、

該類縁体が、野生型タンパク質キナーゼの突然変異型に対する基質である - P³²放射能標識 N^6 - 置換A T P類縁体であって、該野生型タンパク質キナーゼの基質としては役に立たないものであり、

30

該突然変異タンパク質キナーゼが、以下のキナーゼ：

338位にアラニン又はグリシンを有する突然変異v - S r c、

該突然変異v - S r c以外の突然変異タンパク質キナーゼであって、該v - S r c以外の突然変異タンパク質キナーゼのA T P結合領域とv - S r cのA T P結合領域との間のアミノ酸配列アラインメントによってv - S r cの338位に該当することが決定された部位にアラニン又はグリシンを有する突然変異タンパク質キナーゼ、

338位にアラニン又はグリシンを有し、更に、323位にアラニン又はグリシンを有する突然変異v - S r c、及び

該突然変異v - S r c以外の突然変異タンパク質キナーゼであって、該v - S r c以外の突然変異タンパク質キナーゼのA T P結合領域とv - S r cのA T P結合領域との間のアミノ酸配列アラインメントによってv - S r cの338位に該当することが決定された部位にアラニン又はグリシンを有し、更に、該v - S r c以外の突然変異タンパク質キナーゼのA T P結合領域とv - S r cのA T P結合領域との間のアミノ酸配列アラインメントによってv - S r cの323位に該当することが決定された部位にアラニン又はグリシンを有する突然変異タンパク質キナーゼ

40

からなる群より選ばれる

ことを特徴とする方法。

【請求項8】

前記類縁体が、 N^6 位に少なくとも3つの炭素を含む置換基を有する、請求項7に記載の

50

方法。

【請求項 9】

前記類縁体が、 N^6 - (ベンジル) ATP 及び N^6 - (シクロペンチル) ATP からなる群より選ばれる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記タンパク質基質をオートラジオグラフィーにより同定する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

突然変異タンパク質キナーゼに対するタンパク質基質を同定する方法であって、細胞抽出物を、放射能標識類縁体と共に適切な期間インキュベートする工程、該溶解物を SDS - PAGE により分離する工程、及び
タンパク質基質を同定する工程

10

を含み、

該類縁体が、野生型タンパク質キナーゼの突然変異型に対する基質である $-P^{32}$ 放射能標識 N^6 - 置換 ATP 類縁体であって、該野生型タンパク質キナーゼの基質としては役に立たないものであり、

該突然変異タンパク質キナーゼが、以下のキナーゼ：

338 位にアラニン又はグリシンを有する突然変異 v - Src、

該突然変異 v - Src 以外の突然変異タンパク質キナーゼであって、該 v - Src 以外の突然変異タンパク質キナーゼの ATP 結合領域と v - Src の ATP 結合領域との間のアミノ酸配列アラインメントによって v - Src の 338 位に該当することが決定された部

20

位にアラニン又はグリシンを有する突然変異タンパク質キナーゼ、

338 位にアラニン又はグリシンを有し、更に、323 位にアラニン又はグリシンを有する突然変異 v - Src、及び

該突然変異 v - Src 以外の突然変異タンパク質キナーゼであって、該 v - Src 以外の突然変異タンパク質キナーゼの ATP 結合領域と v - Src の ATP 結合領域との間のアミノ酸配列アラインメントによって v - Src の 338 位に該当することが決定された部
位にアラニン又はグリシンを有し、更に、該 v - Src 以外の突然変異タンパク質キナーゼの ATP 結合領域と v - Src の ATP 結合領域との間のアミノ酸配列アラインメント
によって v - Src の 323 位に該当することが決定された部位にアラニン又はグリシン
を有する突然変異タンパク質キナーゼ

30

からなる群より選ばれる

ことを特徴とする方法。

【請求項 12】

前記類縁体が、 N^6 位に少なくとも 3 つの炭素を含む置換基を有する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記類縁体が、 N^6 - (ベンジル) ATP 及び N^6 - (シクロペンチル) ATP からなる群より選ばれる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記タンパク質基質をオートラジオグラフィーにより同定する、請求項 11 に記載の方法

40

【発明の詳細な説明】

米国政府は、この発明のライセンス契約費用を支払っており、NSF グラント No. MCB9506929 および DHHS NCI グラント No. R01 CA70331-01 の協定に規定されているように、本特許権者が他の者とライセンス契約を結ぶことを請求する権利を持つ。

I. 発明の分野

本発明は、バイオテクノロジーの分野に関する。より詳細には、本発明はしばしば酵素工学とも呼ばれる分野に関連し、そこでは遺伝子改変またはその他の手段を利用して、対象とする酵素のアミノ酸配列を変更し、結果としてその触媒性能を変更または改良する。以下に記載される本発明の態様は、遺伝子操作および酵素学の分野における方法論を包含し

50

、またより具体的にはタンパクキナーゼおよび他の多重基質性酵素(このような酵素の阻害性物質を含む)の設計並びに関連物質、技術および利用を包含する。

II. 発明の背景

多細胞生物における細胞間の連絡は、迅速でなければならず、かつ該連絡は多様かつ複雑な様式で、細胞同士の相互の応答を可能とするものである必要がある、こののみが論理にかなったものである。典型的には、利用される細胞内シグナルは、「リガンド」と呼ばれる分子であり、与えられたリガンドは、このシグナルを受け取ることになる該細胞表面上の、特定の型のレセプタと結合することができる。しかしながら、この簡単なリガンド結合のみでは、該受容細胞が行う必要のある、該複雑な応答のためには不十分である。従って、細胞は、このシグナルを増幅し、かつ該細胞内での触媒活性の迅速な調節に導く、複雑な、時としてカスケード的な機構を介して、複雑性を付与し、結果として複雑な、時として劇的な細胞内応答をもたらすことができる。概して、初期のリガンド結合から、該細胞内応答の完了に至るこの過程は、「シグナル伝達」と呼ばれる。

シグナル伝達は、しばしば他の酵素に作用して、その触媒活性を変更することを可能とする、細胞内酵素の活性化によって達成される。これは、幾つかの代謝経路の活性における増加または減少をもたらす可能性があり、あるいは大きな細胞内変化、例えば特殊なパターンの遺伝子発現の開始等を引き起こす可能性さえもつ。ある酵素の、他の酵素の活性を変更する能力は、一般的に該酵素が細胞シグナル伝達に関与していることを示す。

シグナル伝達過程で利用される、最も一般的な共有結合性の変性は、ホスホリル化であり、これはホスホリル化されたこれら酵素の活性の変更をもたらす。このホスホリル化は、タンパクキナーゼとして知られている酵素によって触媒され、該タンパクキナーゼはしばしば単に「キナーゼ」と呼ばれている。

これらキナーゼの幾つかの重要な特徴のために、該キナーゼはシグナルタンパクとして理想的なものとなっている。その一つは、これらがしばしば重複ターゲット基質特異性をもつことにあり、これは種々のシグナル経路の中で、「クロストーク」を可能とし、結果として種々のシグナルの統合を可能とする(1)。これは、応答が誘導される前に、各キナーゼが幾つかの基質をホスホリル化する必要がある、その結果として多くの型の多様なシグナル発生をもたらすものと考えられている。例えば、ある所定のキナーゼは、該細胞表面に結合している、細胞外リガンドの構造に依存して、一例においては成長阻害シグナルを伝達し、また他の例では成長促進シグナルを伝達する(2)。

第二の重要な特徴は、該キナーゼが、幾つかの分子状の機能的領域または「ドメイン」に統合されることにある(3)。「SH3」として知られる一つの領域は、長さがアミノ酸55 - 70個分に相当する、プロリンに富む領域であり、「SH2」として知られるもう一つのドメインは、長さがアミノ酸約100個に相当するホスホチロシン結合領域である。これら二つのドメインは、該タンパク基質の認識およびこれとの結合に関与するものと考えられている。第三のドメイン「SH1」は、約270個のアミノ酸で構成され、触媒反応に応答性のドメインである。これは、またエネルギー源および燐酸塩ドナーとして利用される、ヌクレオシド三燐酸に対する結合サイトをも含む(3)。SH2およびSH3に沿った、ミリスチル化およびパルミチル化サイトを包含する他のドメインは、多重タンパク複合体の構成に応答し、該複合体は、該触媒ドメインを正しいターゲットに導く(3, 22, 23)。これら種々のドメインによる分子の識別は、X - 線回折法およびNMR法を利用することによって研究されている(24 - 28)。

これらのドメインは、進化を介して交配しかつ適合して、大きなタンパクキナーゼ「群」を生成したものであると思われる。1000個ものキナーゼが、哺乳動物のゲノムにおいてコードされ(4)、かつ250個を超えるキナーゼが、すでに同定されている。細胞内部に存在することが知られている、該多数のホスホリル化によって調節された酵素および該多数のキナーゼが、迅速なシグナル増幅および多数の点における調節を可能とする。

該キナーゼの第三の重要な特徴は、その応答の迅速さである。ホスホリル化および脱ホスホリル化の速度は、多くの細胞において極めて迅速であり(ミリ秒のオーダー)、その結果迅速な応答および短時間の回復時間をもたらす、結果として反復的なシグナル伝達

10

20

30

40

50

を可能とする(5)。

該キナーゼのこれら特徴のために、該キナーゼは、極めて多岐に渡る細胞内シグナル伝達メカニズムにおいて利用されている。例えば、成長因子、転写因子、ホルモン、細胞周期調節タンパク、および多くの他の群に属する細胞レギュレータが、そのシグナルカスケードにおいてチロシンキナーゼを利用している(12、13)。チロシンキナーゼは、そのタンパク基質上の一種以上のチロシン残基に、接触的に燐酸塩を付着する。該チロシンキナーゼは、該細胞周期制御エレメントc-abl(14-16)、細胞質チロシンキナーゼドメインc-srcを含む表皮成長因子レセプター(12)、多くの免疫細胞機能に関与している非-レセプターチロシンキナーゼ(13)、およびTyk2即ち該p91タンパクのホスホリル化に関与する細胞質チロシンキナーゼを包含する、多くの多岐に渡る機能を持つタンパクを含み、該p91タンパクは、レセプター刺激の際にその核に転移され、転写因子として機能する(17)。セリン/スレオニンキナーゼは、該キナーゼ群の残りの全てではないにしても、その多くを構成し、これらはそのタンパク基質中のセリンおよびスレオニン残基を接触的にホスホリル化し、かつこれらは同様に多岐に渡る役割を有する。これらは、その270アミノ酸の触媒ドメインにおいて、チロシンキナーゼとの相同性をもつ。このように、以下の議論は、より具体的にはチロシンキナーゼに着眼しているが、該議論は、一般的にセリン/スレオニンキナーゼにも当てはまる。

10

不幸にも、シグナル伝達において、キナーゼをこれほどに有用なものとしており、かつ殆どの細胞機能に対して中心的なものとしているこれらの特徴は、その研究並びに理解を、不可能ではないにしても、極めて困難なものとしている。該キナーゼの重複タンパク特異性、その構造並びに触媒的な類似性、その数の多さ、およびその応答の迅速性は、従来の遺伝学的および生化学的な技術を利用した、そのインビボタンパク基質の具体的な同定を、不可能ではないにしても、極めて困難なものとしている。このことが、チロシンキナーゼ-媒介シグナル伝達に関与する、該シグナルカスケードの解読にとって、主な障害となっている(4、6-8)。

20

シグナル伝達カスケードにおける特定のチロシンキナーゼの関与を、詳しく調べる努力は、インビボおよびインビトロでの、タンパク基質特異性の欠如のために徒労に終わっている(4、8)。チロシンキナーゼの該触媒ドメインは、ドメイン交換実験によって証明されているように(18-23)、固有の基質特異性を全くまたは殆どもたない。一つのチロシンキナーゼ由来の該触媒ドメインは、異なるチロシンキナーゼのタンパク基質特異性を殆ど変化させずに、その中のドメインと置換することができる(22)。

30

このキナーゼのインビトロでの貧弱な特異性は、所定のキナーゼのインビボでの機能がどうなっているかを推定することをも、不可能ではないにしても、困難にしている。対象とする単離されたチロシンキナーゼは、しばしば多くのテストタンパク基質を、同等の効率でホスホリル化するのである(29)。この見かけ上の貧弱な基質特異性は、またインビボでも見出されており、例えば遺伝子ロックアウト実験等の多くの研究が、他の細胞チロシンキナーゼによる補償のために、解釈可能な表現型を与えることはない(30、31)。

もう一つの複雑さは、多くのチロシンキナーゼが、それ自身もチロシンキナーゼである、下流側および上流側のタンパクをホスホリル化することが報告されていることであり、これは複雑な正のフィードバックループを可能とするかに思われるが、これによって、該カスケードの詳細な検査は、更に一層困難なものとなっている(1)。

40

インビボおよびインビトロ両者における、該酵素の役割を解読し、かつその機能を理解するための、一つの重要な方法は、特異的な酵素阻害剤の使用である。一種以上の化合物が該酵素を阻害することが明らかとなった場合、該阻害剤は、該酵素の活性を調節するのに利用でき、またその低下作用を観測することができる。このような方法は、介在する多くの代謝経路を解読する際の手段であり、また酵素速度論を学ぶ上で、また触媒メカニズムを決定する上で重要であった。

更に、このような阻害剤は、最も重要な薬理化合物として公知である。例えば、アスピリン(アセチルサリチル酸)がこのような阻害剤である。これは、プロスタグランジン合成の第一段階を触媒する酵素を阻害し、結果として疾病の発症に関与するプロスタグランジン

50

の生成を阻害する(72)。伝統的な薬物の発見は、疾患-原因タンパクと特異的に結合し、かつこれを不活性化するように工夫された、化合物の設計並びに修飾として特徴付けられ、このような努力の相対的な成功は、該ターゲットタンパクに対する該薬物の選択性および同様な酵素活性をもつ非-疾患関連酵素に対する阻害性の欠如に依存している。

このような方法は、多くのヒト癌が、(例えば、原癌遺伝子が、遺伝子転座を介して、癌遺伝子に転化された場合には)正常なタンパクの非調節性に起因しているので、癌に対する治療法を開発するための有力な方法であると思われる。また、キナーゼは、有力なレギュレータであるので、該キナーゼは、極めて一般的な原癌遺伝子となり、従って理想的なドラッグデザインのターゲットとなっている。

選択的な阻害剤の設計法は、少数の類似酵素のみが該ターゲット生物中に存在するに過ぎない場合、例えばバクテリアに対して特有のタンパクの阻害剤が、ターゲットとなり得る場合には、比較的単純である。しかしながら、不幸なことに、該キナーゼ間の類似性とその数の多さとが、特定の阻害剤の開発および設計を殆ど完全に無効にしており、また原癌遺伝子レベルでの、目的とする特定の薬理的治療法を開発する多くの望みを阻んでいる。大多数の候補阻害剤が、特定の精製されたキナーゼを、まず阻害するものとして同定される可能性があるものの、多数のキナーゼを阻害するであろう。

しかしながら、このことは、少なくとも幾分かのキナーゼ特異性をもつ阻害剤が発見できないことを意味するものではない。幾つかの天然生成物が、特定のキナーゼ群に対して比較的特異的であることが同定されているが、これらに基いて、キナーゼ阻害に関する一般的な規則を導き出す試みは、成功していない。更に、以下の実施例で示すように、多くの場合における特異性は、極めて制限されている。例えば、化合物ダムナカンタル(Damcanthal)が、第2A図に示すように、キナーゼp56lck(73)の「高活性の選択的阻害剤」であることを報告しており、この化合物は、該キナーゼに対する阻害定数(IC_{50})を有し、これはキナーゼsrcに対する値よりも殆ど数倍低いものである(該 IC_{50} は、触媒活性を50%だけ減ずるのに添加する必要のある阻害剤の濃度である)。化合物PPI(第2B図)は、極めて強力な($IC_{50}=0.005\mu M$)、該キナーゼlckに対する結合アフィニティーをもつが、不幸なことに、該src群に属する他のキナーゼの阻害は、極めて類似している。これは、殆ど同等の IC_{50} ($0.006\mu M$)をもつキナーゼfynを阻害し、しかもキナーゼhckに対して約4倍高い IC_{50} をもつ($IC_{50}=0.020\mu M$)に過ぎない。該化合物CGP57148(第2C図)は、キナーゼabl($IC_{50}=0.025\mu M$)およびPDGFR($IC_{50}=0.030\mu M$)に対して、「半-選択性」であることが報告されている(74)。それにも拘らず、莫大な数のキナーゼおよびその関連する細胞の重要性を考慮し、また上記阻害剤がここ2年間に於いてのみ報告されているに過ぎないことを考慮すると、選択的キナーゼ阻害剤の発見もしくは設計の成功は、著しく制限される。

上記したこれら困難さは、科学者の単なる挫折感をはるかに越える意味を持ち、科学者は該キナーゼカスケードおよびこれらカスケードおよびその他の細胞メカニズムにおける個々のキナーゼの機能を解明する努力を無にした。キナーゼ活性および機能のこのような理解は、幾つかのヒト疾患が、効果的に治療され、予防されもしくは治癒される以前に本質的なことである可能性がある。例えば、30年以上に渡り、該癌遺伝子bcr-ablが、重要なドラッグデザインのターゲットとなり得る、慢性骨髄性白血病の原因となるタンパクキナーゼであることが知られており、依然として明確に同定されていない(11)。この欠点にも拘らず、楽観すれば、上記の阻害剤CGP 57148は、報告されたことによれば、骨髄性白血病の治療で使用するための、臨床的な試みの最中であるとされている。但し、インビボでのホスホリル化を遮断できる基質は、未知である。

これら難点の医学的意味は、更にラウス肉腫(RSV)によって示され、これは発癌におけるキナーゼの役割を研究するための重要なモデル系になっている。繊維芽細胞のRSV形質転換は、シグナルウイルス遺伝子生成物、上記タンパクチロシンキナーゼv-src(32)によって制御される。RSVを、あらゆる細胞中の、発癌活性研究のための模範としているのは、繊維芽細胞のRSV形質転換中の、迅速な時間的過程および顕著な形態的变化である。V-Srcの起源(33)、調節(3, 8, 34, 35)、および構造(25, 27, 36)は、活発に研究され、また十分に理解されている(8, 37, 38)。しかしながら、この広範に研究されたキナーゼに関す

10

20

30

40

50

る中心的な問題は、未解決のままである。即ち、その直接的な細胞基質が何であるのか。その触媒活性の阻害は、形質転換を効果的に阻害するのか、あるいはその逆なのか。このような阻害は、RSV形質転換に対する有効な治療法または予防法であるのか。不幸なことに、上記のように、これらの疑問に対する回答は、容易には与えられない。というのは、細胞性キナーゼの数が莫大であり(哺乳動物ゲノムの2%が、タンパクキナーゼをコードするものと予想されている(4))、かつチロシンキナーゼが重複基質特異性を示し(8, 39)、しかも触媒ドメインを分け合っていて、特異的な阻害剤の設計を著しく困難にしている、ことと大いに関連している。

繊維芽細胞におけるv-Srcの発現は、50個に及ぶ細胞タンパクの、チロシンホスホリル化をもたらす(37)。これら同一の基質は、また形質転換されていない繊維芽細胞中の他のキナーゼによってもホスホリル化される(40)。形質転換された繊維芽細胞の抗 - ホスホチロシンタンパクブロット、繊維芽細胞の形質転換 - 欠損v - Src突然変異体によるトランスフェクション、温度感受性v - Src突然変異体、細胞性Srcの遺伝子のノックアウト研究、宿主 - レンジ依存性Src突然変異体抗 - v - Src免疫沈殿法およびキナーゼ特異的な阻害剤の使用を包含する、最も洗練された生化学的かつ遺伝学的な技術さえも、v - Srcの直接的な基質の明確な同定に導くことはなかった(包括的な概論については、参考文献(38)を参照のこと)。しかしながら、この状況は固有のものではなく、事実大多数の細胞性キナーゼに対する該直接的な基質は、同定されないままである(8)。その上、上で論じたように、個々のキナーゼを選択的に、あるいは関連する一群のキナーゼさえも、選択的に阻害する化合物は、殆ど知られていない。

上記困難には威圧されるが、合理的なドラッグデザインの新規方法および組み合わせによる有機合成は、十分な資源が与えられれば、キナーゼ特異的な阻害剤の設計または発見を、実行可能なものとする。しかしながら、該キナーゼネットワークが高度に縮退しており、かつ未知の様式で相互に関連しているので、キナーゼが攻撃して阻害すべき、多くの疾患に関するかなりの不確定さが存在する。その上、所定のキナーゼの特異的な阻害剤が、インビボまたはインビトロの何れかにおいて、該疾患に何等かの影響を与えるであろうことについては、決して明らかとはいえない。キナーゼは、著しく混然としているので、あるキナーゼの阻害が、単にもう一つのキナーゼに「その位置を占めさせる」であろう、有意な機会が存在する。従って、特定の阻害剤を設計しもしくは発見するための非常に困難な努力がなされる前に、所定のキナーゼを阻害する、生化学的並びに細胞的作用を決定するための、単純かつ直接的な方法に対する需要がある。

上記のことから、永きに渡り必要性が感じられていたものの、不十分であった、どの細胞タンパクが個々のタンパクキナーゼによる作用を受けるかを同定する方法に対する需要があった。このような方法は、また理想的には所定のキナーゼの、そのタンパク基質に及ぼす相対的な活性の、定量的な測定をも可能とするものであり、該方法は、例えば実際のまたは有力な薬物化合物がキナーゼ活性を調節するか否か、あるいは如何にして調節するかを検出するのに使用できるものである。更に、個々のキナーゼまたはキナーゼ群の特異的な阻害剤に対する需要もあり、これらは(どのタンパクが、該阻害剤の存在下でホスホリル化されず、またより軽度でホスホリル化されるかを、探求することによって)タンパク基質を同定し、キナーゼ媒介疾患を治療する薬物として使用するための、所定のキナーゼ活性を迅速にダウンレギュレーションする、生化学的効果および表現型の効果を研究するために、またより伝統的な阻害剤を設計しまたは開発するための多大な努力が、妥当であることを確認するために利用することができる。以下で、より一層詳細に説明するように、本発明は、第一に個々のキナーゼを高度に特異的に阻害するための方法を提供し、ここで該キナーゼは、当該キナーゼの野生型または他の組み換え操作されていないキナーゼよりも一層迅速に、該阻害剤と結合するように操作されている。本発明は、また該操作されたキナーゼおよび該キナーゼが適合する阻害剤をも提供する。

更に、以下で明らかになるように、この方法は、該キナーゼと同様に、ある基質の少なくとも一部を少なくとも一つの他の基質に、共有結合的に付着させる、他の酵素の研究についても同様な利点を与えることから、より一層広範囲に渡り適用できる。

10

20

30

40

50

本発明は、キナーゼおよび他の多重基質型酵素を組み換えて、野生型によっては容易に結合されない、阻害剤と結合できるようにすることを含む。これらと結合できる変性基質および変異酵素を使用して、延長因子(41)およびシクロフィリンA(42)に対するレセプターを研究する。しかしながら、本発明以前には、少なくとも幾分かの触媒活性、および該阻害剤の不在下で、該レシピエント基質に対する少なくとも幾分かの特異性を依然として維持したままで、ドナー基質の一部または全てを、レシピエント基質に共有結合的に結合する多重基質型酵素が如何にして阻害剤と結合するように組み換えできるか、あるいはこのような組み換えが可能であるか否かについては知られていなかった。本発明は、以下に説明するように、これを実施することを可能とし、また本発明は最初に個々のキナーゼの選択的な阻害に関する扉を開放し、これは該キナーゼカスケードおよび他の複雑な触媒細胞メカニズムを理解するための重要な手段であるばかりか、これらのメカニズムが作用し始める疾患における、治療法を提供することをも可能とする。

10

III. 発明の概要

本発明は、単一のタンパクキナーゼを特異的に阻害することができ、しかも他のタンパクキナーゼを同時に阻害することのない、物質並びに方法を提供することによって、上記問題点に対する解決策を提供する。

第一の局面において、本発明はキナーゼおよび他の多重基質型酵素を、その野生型によっては容易に利用されない変性基質を利用できるように、組み換え操作することを含む。本発明は、更にこのように化学的に修飾されたヌクレオチド三リン酸基質、これらの製法、およびこれらの利用法をも提供する。本発明の方法は、該組み換え操作されたキナーゼと共に、該変成された基質を使用して、どのタンパク基質が該キナーゼに作用するかを同定し、このような作用の程度を測定し、かつテスト化合物が、このような作用を調節するか否かを、決定する方法を含む。

20

更なる局面において、本発明は組み換え操作されたタンパクキナーゼを提供し、該キナーゼは、これら酵素の野生型とは容易に結合することのない、阻害剤と結合することができる。このような組み換え操作されたキナーゼ全てを製造し、かつ使用する方法をも提供する。本発明は、更にこのような阻害剤、その製造方法、およびその使用方法をも提供する。本発明のこれらの方法は、該組み換え操作されたキナーゼと共に該阻害剤を使用して、どのタンパク基質が該キナーゼに作用するかを同定し、このような作用の速度を測定し、かつこのような阻害の生化学的および細胞的效果を決定する方法を含む。これらは、またこのような阻害剤および組み換え操作されたキナーゼを使用して、どのキナーゼが疾患に

30

関与するかを評価することにも関連する。従って、これらキナーゼは、その野生型のより伝統的な特異的阻害剤を設計し、もしくは発見するための努力の課題となり得、該特異的阻害剤は、該キナーゼ関連疾患または障害を治療する上で価値あるものであることが立証されている。

更に、該方法では、また該組み換え操作されたキナーゼを、細胞または完全な動物中に、好ましくは対応する野生型のキナーゼの代わりに挿入し、次いで該キナーゼに適合する該阻害剤を、該キナーゼと疾患との関連性を研究するための手段として使用し、かつ最終的に該疾患の治療用の薬物として使用する。

40

本発明は、またより一般的には多重基質型酵素の組み換え操作された型にも関連し、該酵素は、少なくとも一つの(ドナー)基質の一部または全体を、少なくとも一つの他の(レシピエント)基質に共有結合的に結合する。これらの組み換え型は、これら酵素の野生型によっては容易に結合されない、変性された基質および阻害剤を受け取る。本発明は、またこのような組み換え酵素並びに該変性されたドナー基質を製造し、使用する方法にも関連する。本発明のこの方法は、該組み換え酵素と共に、該変性された基質および阻害剤を使用して、どの基質が該酵素に作用するかを同定し、このような作用の速度を測定し、該変性された基質の場合には、該ドナー基質の一部または全部が結合する、該レシピエント基質を決定し、このような作用の程度を測定し、かつテスト化合物によるその調節の程度を同定しかつ測定するための方法をも包含する。

阻害剤の場合には、該方法はこのような阻害を測定するためのものである。該方法はまた

50

、このような阻害剤および組み換え酵素を使用して、どの酵素が疾患に關与する可能性があるかを評価することにも及び、従ってこれらの酵素は、その野生型の特異的阻害剤を設計し、もしくは発見するための努力の課題となり得、該特異的阻害剤は、該キナーゼ関連疾患または障害を治療する上で価値あるものであることが立証されている。更に、該方法では、また該組み換え操作された酵素を、細胞または完全な動物中に、好ましくは対応する野生型酵素の代わりに挿入し、次いで該酵素に適合する該阻害剤を、該酵素と疾患との関連性を研究するための手段として使用し、かつ最終的に該疾患の治療用の薬物として使用する。

本発明によれば、酵素の組み換えを通して、ある対象とするタンパクキナーゼのヌクレオチド結合サイトと、他のキナーゼのヌクレオチド結合サイトとの間の、構造上の識別を行うことを可能とする。この識別は、該組み換えられたキナーゼが、ヌクレオチド三リン酸または該キナーゼの野生型または他のキナーゼとは容易に結合しない阻害剤を利用することを可能とする。該阻害剤と関連する好ましい態様においては、使用される該阻害剤は、該キナーゼに対する「天然」のヌクレオチド三リン酸基質に対して「オルソゴナル(orthogonal)な」、あるいは特異性の低い阻害剤(例えば、該キナーゼの野生型と容易に結合するもの)に対してオルソゴナルなものである。以下でさらに議論するように、この用語「オルソゴナル(orthogonal)」とは、該基質または阻害剤が構造の点では類似する(以下に説明するように、幾何学的には類似するが、化学的には非類似であるものを含む)が、該野生型と結合する能力を規定する様式において異なっていることを意味する。

本発明によって作成された組み換えキナーゼは、細胞中に存在する他の組み換え操作されていないキナーゼによっては容易に利用されない、オルソゴナルなヌクレオチド三リン酸基質を利用できるであろう。好ましくは、これは他のキナーゼによっては実質的に利用されない、オルソゴナルなヌクレオチド三リン酸基質を利用することができ、また最も好ましくは、該キナーゼは、他のキナーゼによっては全く利用され得ない、オルソゴナルなヌクレオチド三リン酸基質を利用することができ、例えば放射性リン(P^{32})を使用して、該オルソゴナル基質上の該リン酸基を標識し、次いで該標識した基質を、透過性とされた細胞または細胞抽出物に添加することによって、該組み換えられたキナーゼの該タンパク基質が標識され、一方で他のキナーゼのタンパク基質は、少なくとも低度に標識され、好ましくは他のキナーゼのタンパク基質は実質的に標識されず、最も好ましくは、これらは全く標識されない。

以下に与えられる説明および実施例は、始原型のチロシンキナーゼv-Srcの直接的な基質をユニークに標識するための、この方法の利用について記載する。タンパクの組み換えによって、アミノ酸配列内に化学的相違が形成され、これは該変性されたv-Srcのヌクレオチド結合サイトと、他のあらゆるキナーゼのヌクレオチド結合サイトとの間に、新たな構造上の識別を与える。我々が組み換えを行ったこのv-Srcキナーゼは、野生型キナーゼのヌクレオチド基質に対してオルソゴナルである、ATP類似体(A^+TP)、即ち N^6 -(シクロペンチル)ATPを認識する。オルソゴナル A^+TP 基質に対する特異性をもつ、v-Src変異体の生成は、 $[^{-32}P]N^6$ -(シクロペンチル)ATPを使用して、v-Srcの直接的な基質をユニークに放射性標識することを可能とする。というのは、これは該組み換えられたv-Srcキナーゼに対する基質として機能し得るが、実質的に他の細胞キナーゼに対する基質として機能することはできないからである。

以下に与えられる詳細な説明および実施例は、始原型のチロシンキナーゼv-Srcの直接的な基質をユニークに同定するための、この方法の利用について記載する。タンパクの組み換えによって、アミノ酸配列内に化学的相違が形成され、これは該変性されたv-Srcのヌクレオチド結合サイトと、他のあらゆるキナーゼのヌクレオチド結合サイトとの間に、新たな構造上の識別を与える。作成されかつここに提示される、この組み換えられたv-Srcキナーゼは、より一般的なキナーゼ阻害剤PP3：化合物N04シクロペンチルPP3のオルソゴナル類似体と結合する。このような阻害剤に対して特異性をもつv-Src変異体の生成によって、該変異体を阻害することが可能となり、一方で同一のテスト系における他のキナーゼは、実質的に阻害されず、またこの同一のキナーゼの野生型も阻害されない。

上記説明から明らかなごとく、本発明の目的の一つは、燐酸基ドナー基質として、オルソゴナルヌクレオチド三燐酸類似体を受け取る、変異タンパクキナーゼを提供することにある。

本発明のもう一つの目的は、このような変異タンパクキナーゼをコードするヌクレオチド配列を提供することにある、また本発明の更なる目的は、このような核酸配列の製法を提供することにある。

本発明の目的は、またこのような変異タンパクキナーゼを、例えばかかる核酸配列を発現することによって、製造する方法を提供することにある。

同様に本発明の目的は、このようなオルソゴナルヌクレオチド三燐酸およびその合成法を提供するものであり、該三燐酸は N^6 -(シクロペンチル)ATP、 N^6 -(シクロペンチルオキシ)ATP、 N^6 -(シクロヘキシル)ATP、 N^6 -(シクロヘキシルオキシ)ATP、 N^6 -(ベンジル)ATP、 N^6 -(ベンジルオキシ)ATP、 N^6 -(ピロリジノ)ATPおよび N^6 -(ピペリジノ)ATP(27)を包含する。

更に別の本発明の目的は、あるテスト化合物が、一またはそれ以上のタンパク基質に関して、タンパクキナーゼの活性を正または負に調節するか否かを決定する方法を提供することにある。

より具体的に、かつ本発明の更なる局面によれば、本発明の主な目的は、阻害剤と結合し、かつこれによって阻害される変異タンパクキナーゼを提供することにある、該阻害剤は、対応する野生型のキナーゼとはそれ程容易には結合せず、あるいはこれによって容易には阻害されない。

本発明の他の目的は、このような変異タンパクキナーゼをコードする核酸配列を提供することにある、またこのような核酸配列の製法を提供することも本発明のもう一つの目的である。

また、本発明の目的は、このような変異タンパクキナーゼを、例えばかかる核酸配列を発現することによって、製造する方法を提供することにある。

更に、上記の如き阻害剤、例えば化合物N-4シクロペントイルPP3およびその合成法を提供することも本発明の目的の一つである。

他の本発明の目的は、与えられたタンパクキナーゼに対する基質が何であるかを決定する方法を提供することである。

更に別の本発明の目的は、ある特定のキナーゼの特異的な阻害が、あるテスト系、例えば細胞を含まない抽出物、細胞培養物、または生きた多細胞生物における、生化学的効果または表現型の効果を発生するか否かを決定する方法を提供することにある。

本発明の更なる目的は、特定のキナーゼの阻害が、疾患の治療において、治療価値を持つか否かを、決定する方法を提供することにある。

更に別の本発明の目的は、あるキナーゼの活性、速度論および触媒的なメカニズムに関する研究を、本発明の対応する変異体の阻害を研究することによって、行う方法を提供することにある。

本発明の更に別の目的は、キナーゼ - 関連疾患を、野生型の酵素をもつ生物を好ましくは減少させ、最も好ましくは枯渇させた、罹患した細胞に、本発明の阻害剤 - 適合性変異キナーゼを導入し、次いで該阻害剤を投与して、該疾患を媒介する変異キナーゼの活性を、該疾患の原因または症状を軽減または排除するように調節することによって、予防しかつ治療する方法を提供することにある。

上記のおよび以下に与えられる本発明の詳細な説明に基いて、当業者は、本発明がより一般的に、該キナーゼが行っているように、共有結合的にドナー基質またはその一部を、レシピエント基質に伝達する、多重基質型酵素を研究するために利用できることを、容易に認識するであろう。本発明のこのような用途は、以下の詳細な説明の項において更に記載される。

従って、本発明の更なる目的は、阻害剤と結合する、変異多重基質型酵素を提供することにある、該阻害剤は、その野生型の酵素または同様な活性をもつ他の酵素と、それ程容易に結合する訳ではない。

本発明の他の目的は、このような変異多重基質型酵素をコードするヌクレオチド配列を提

10

20

30

40

50

供することにあり、またこのような核酸配列の製法を提供することも本発明の目的の一つである。

また、本発明の目的は、このような多重基質型酵素を、上記のような核酸配列を発現させることによって、製造する方法を提供することにある。

本発明の目的は、更に上記のような阻害剤およびその製法を提供することにある。

もう一つの目的は、ある与えられた多重基質型酵素に対する基質がなんであるかを決定する方法を提供することにある。

更に、本発明の目的は、特定の多重基質型酵素の特異的阻害が、テスト系、例えば細胞を含まない抽出物、細胞培養物、または生きた多細胞生物等において、生化学的効果または表現型の効果を発生するか否かを決定する方法を提供することにある。

10

更なる本発明の目的は、特定の多重基質型酵素の阻害が、治療中の疾患において治療的価値を持つか否かを決定する方法を提供することにある。

更に別の本発明の目的は、ある多重基質型酵素の活性、速度論および触媒的なメカニズムに関する研究を、本発明の対応する変異体の阻害を研究することによって、行う方法を提供することにある。

本発明の更なる目的は、多重基質型酵素媒介疾患を、野生型の酵素をもつ生物を、好ましくは減少させ、最も好ましくは枯渇させた、罹患した細胞に、本発明の阻害剤 - 適合性多重基質型酵素を導入し、次いで該阻害剤を投与して、該疾患を媒介する変異酵素を、該疾患の原因または症状を軽減または排除するように調節することによって、予防しかつ治療する方法を提供することにある。

20

本発明のこれらおよびその他の目的は、詳細な説明、実施例、および以下に示す請求の範囲から、当業者には明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

第1図は ν -Src、XD4(残基77 - 225の欠損をもつ)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)-XD4融合タンパク、およびGST-XD4融合タンパク二種変異体(V323A, I338A)のタンパクドメイン構造を、模式的に示した図である。

第2図は、 N^6 位に結合した一つの「X」をもつアデノシン三リン酸(ATP)の模式的な図であり、また下方のボックスにおいては、実施例に記載した、オルソゴナルATP類似体各々の「X」の位置を占めている12個の側鎖(これらは常に太文字で示される数値1 - 12で表される)を、模式的に示すものである。

30

第3図は、ATPまたはATP類似体(A^+TPs)の一種により、マウスリンパ細胞の細胞溶解物処理した後の、タンパクチロシンホスホリル化のレベルを示した、抗 - ホスホチロシン免疫プロットである。

第4図は、cAMP依存性タンパクキナーゼ(1ATP)中の、ATP結合ドメインを示す、X - 線モデルの詳細な図である。

第5図は、(a) XD4およびGST-XD4(V323A, I338A)を表す、細胞溶解物の抗 - ホスホチロシンプロット、(b) 細胞溶解物が、反射性標識されたATPのみまたは放射性標識された N^6 (シクロペンチル)ATPのみを与える場合の、ホスホリル化のレベルを示すオートラジオグラム、および(c)放射性標識されたATPおよび放射性標識された N^6 (シクロペンチル)ATP($A^+TP(8)$)による、GST-XD4およびGST-XD4(V323A, I338A)の自己ホスホリル化を示すオートラジオ

40

グラムである。

第6図は、ATPおよび該12個のATP類似体各々が、放射性標識されたATPによる、GST-XD4およびGST-XD4(V323A, I338A)によって触媒されたホスホリル化を阻害する相対的な度合いを示す、棒グラフである。

第7図は、燐酸基ドナー基質として、放射性標識されたATPおよび放射性標識された N^6 (シクロペンチル)ATPの何れかが与えられた場合の、幾つかの ν -Src位置338における単一変異体による自己ホスホリル化のレベルを示す、オートラジオグラムである。

第8図は、細胞内のどのホスホリル化基質が、特定のキナーゼ(ここでは ν -src)によってホスホリル化されたかを決定するための、本発明の方法を示す模式的な図である。

第9図は、本発明の組み換えられたキナーゼが、他のキナーゼの存在下においても、どの

50

ようにして本発明の阻害剤によって阻害されるか、および該キナーゼのタンパク基質を明らかにするのに使用できるかを示す、模式的な図である。

第10図は、3種の公知のキナーゼ阻害剤、ダムナカンタール、PPIおよびCGP57148に関する化学的構造を、いくつかのキナーゼに関する阻害定数(IC_{50})の該略と共に示す図である。

第11A図は、アデノシンおよびPP3のコア構造を示す図であり、また

第11B図は、PP3のN4窒素に付加して、 IC_{50} 値を第1表に示した、該阻害剤候補化合物を製造することのできる、幾つかの嵩高い置換基の構造を示す図である。

第12図は、N-4シクロペントイルPP3の化学構造および野生型のv-Srcまたはその変異体(I338G)の何れかの存在下で、N-4シクロペントイルPP3の存在によって放射性標識された、泳動タンパクのオートラジオグラムを示す図である。

第13A-C図は、本発明に従って調製されかつテストされた、付随的な阻害剤類似体を示す図である。

第14A図：a)細胞シグナル発生をデコンボリューション(deconvolute)するために、小分子タンパクキナーゼ阻害剤を使用したことに関連する特異性の問題を、模式的に示す図である。キナーゼ触媒ドメイン(赤い卵型)が、高度に保存されている。かくして、有力な阻害剤の大部分は、密接に関連したキナーゼの活性を遮断し、かつキナーゼ活性によって媒介される経路を広範にダウンレギュレートする。b)本明細書に記載する、選択的にタンパクキナーゼを阻害する方法を模式的に示す図である。変異を形成する空間は、選択されたキナーゼ(Src)のATP結合サイトに導入される。この変異は、Src内に活性サイトのポケット(ノッチ)を生成し、これは合理的に設計された小分子阻害剤によって、固有の様式で認識できる。この阻害剤は、嵩高い化学基(突起)を含み、該基はこの阻害剤を、野生型タンパクキナーゼに対してオルソゴナルにする。該相補的キナーゼ/阻害剤の設計は、この状況で全細胞の該ターゲットキナーゼの高度に選択的な阻害を可能とする。

第15図：a)N-6シクロペンチルオキシアデノシン(1)の構造。b)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン阻害剤類似体の構造。2は、Hanefeld等の方法に従って製造した。(i)RCOCl(10当量)、ピリジン、5 で1時間、次いで22 で1時間加温、(ii)LiAlH₄(3.0当量)、アルゴン雰囲気下で乾燥THF、0 にて30分間、次いで30分間加熱還流。全ての化合物は、¹H NMR(300 MHz)および高解像度のマスマスペクトル法(EI)によって特徴付けした。

第16図：a)クエルセチン(5)およびAMP PNP(6)の化学構造。b)src群のキナーゼ活性サイトにおける、2の予想された結合配向。AMP PNP(赤)と結合したHckおよびクエルセチン(青)と結合したHckの結晶構造は、該Hckタンパク骨格(白)に従って重ねられた。引き続き、2(黄色)の構造は、2のピラゾロ[3,4-d]ピリミジンリング系を、該AMP PNPのアデニンリングと重ねあわせることによって、該キナーゼの活性サイトに結合された。c)2のN-4とsrc群のキナーゼにおける残基338の側鎖との間の予想された密接な接触。分子2は、第3b図におけるように、該src群のキナーゼHckの該ATP結合サイトに係留されている。該スレオニン338側鎖および2の原子は、その基本的な構成に従って色分けされており(緑=炭素、青=窒素、赤=酸素、白=水素)、また該Hck骨格は、紫で示されている。該スレオニン側鎖のメチル水素は、図示されていない。この像は、プログラムInsight IIを使用して作成した。

第17図：阻害剤類似体3gは、B細胞レセプター媒介チロシンホスホリル化を阻害しない。マウス脾臓細胞を、1.1% DMSO(レーン1-2)、100mMの3gの1.1% DMSO溶液(レーン3)、または100mMの2の1.1% DMSO溶液(レーン4)と共にインキュベートした。B細胞刺激(レーン2-4)を、10mM/mlのヤギ抗-マウスIgMの添加によって開始させた。細胞タンパクを、10% PAGEによって解像し、ニトロセルロースに転写し、ホスホチロシン(4G10)に対するモノクローナル抗体により免疫プロット処理した。

第18図：阻害剤3gは、I338G v-Src中のp36ホスホリル化を遮断するが、WT v-Src形質転換NIH3T3繊維芽細胞のホスホリル化を遮断しない。形質転換されていないNIH3T3細胞(レーン1)、WT v-Src形質転換NIH3T3細胞(レーン2-3)、およびI338G v-Src形質転換NIH3T3細胞(レーン4-5)を、1.1% DMSO(レーン1, 2および4)または100mMの3gの1.1% DMSO溶液(レーン3および5)と共にインキュベートした。12時間後に、該細胞を溶解した。ホスホ

10

20

30

40

50

リル化レベルを、第4図に示すように測定した。

第19図：I338G v - Src形質転換繊維芽細胞は、選択的に平坦な形態を獲得し、かつ3gと共にインキュベートした際に、選択的にアクチンストレス繊維を再度獲得する。形質転換されていない(a-b)、WT v - Src形質転換(c, d, g, h) およびI338G v - Src形質転換(e, , f l, j)NIH3T3繊維芽細胞を、1.1% DMSO (a-c, e, g, l)または100mMの3gの1.1% DMSO溶液(d, f, h, j)の何れかによって処理した。48時間後に、細胞を写真撮影し(a, c-f)、ファロイジン(phalloidin)-FITCで染色し、また蛍光顕微鏡によって可視化(b, g-j)した。

V. 発明の詳細な説明

第9図：

本図は、以下においてSrcタンパクキナーゼの基質を発見するために、本発明で使用する、キナーゼ基質を同定するための実験を模式的に示す図である。本図の上部における卵型は、矢印に隣接するタンパクキナーゼによってホスホリル化される、タンパクキナーゼ基質を表す。線で結ばれた数個の卵型を含む該タンパクキナーゼは、タンパクキナーゼ(Src, Fyn, Lck)の「Src - 群」の構成員である。一つのキナーゼ(Src)は、切り取られたノッチを含み、これはこのキナーゼのアデニン結合ポケットに余分の空間を生成する、I338G変異を表す。このキナーゼ上の記号は、そのオルソゴナル阻害剤を表し、該阻害剤は、突起を含み、該突起はその固有の阻害によって生ずる、該Src I338Gキナーゼにおける該変異を補充する。一個の大きな丸い卵型と二つの突出する針状の部分をもつこのキナーゼは、F-アクチン依存性タンパクキナーゼ(FAK)である。ただ一つの卵型をもつタンパクキナーゼは、セリンまたはスレオニン特異的タンパクキナーゼ群の構成員である。小さなPを含む、矢印の下方の卵型は、該タンパクキナーゼによる作用後の、ホスホリル化された(P)基質を表す。本図の下部のシミュレートされたゲルは、野生型のSrcの代わりに、全ての野生型キナーゼまたは一つの変異キナーゼ(Src - I338G)の何れかを発現する細胞を、該オルソゴナル阻害剤で処理した場合に、予想される結果を表す。該阻害剤は、該細胞中に存在するリンタンパクに何等の作用も及ぼさないはずであり、該細胞は該変異Srcキナーゼを発現せず(ゲルの左側の同等のパターン)、また幾つかのリンタンパクは、該阻害剤による、該変異体発現細胞の処理後には、存在しないはずである(右側のゲル)。

本発明の阻害剤

第11Aおよび11B図は、種々の嵩高い置換基を持つ構造を示す図であり、該置換基は、PP3のN - 4またはアデノシン二リン酸のN⁶、もしくはアデノシン一リン酸のN⁶、またはアデノシン(特に、N⁶シクロペンチルオキシアデノシン)に付加して、本発明の組み換えられたキナーゼである、該変異キナーゼv - Src(T120G)の阻害剤を生成する場合に使用される。これら阻害剤の合成並びに阻害定数は、以下の実施例12で議論する。

このような阻害剤は、該キナーゼおよび他のキナーゼの、他の有用な変異体を開発するための研究において、および本明細書の至る個所に記載されている幾つかの方法にとって有用である。しかしながら、本発明の範囲は、これら特定の阻害剤の使用に制限されず、また当業者は多くの他の可能な構造が、本明細書に記載のものと置換でき、また代替品となり得ることに気付くであろう。

例えば、種々の、簡単な、およびより複雑な脂肪族または芳香族基が、ADPのN⁶位置またはPP3のN₄位置に付加できる。さらに、本発明の阻害剤は、該N⁶位置におけるヌクレオチドの変性または該N₄位置におけるPP3の変性に制限されない。このような化合物の種々の位置で変性するための化学的手段は、公知であり、得られる誘導体の全ては、本発明の範囲内に入り、またそのリング構造における変更または置換を行うことさえ可能である。例示的な変異体をここに与え、また第13図を特に参照するが、該図には類似体およびその活性に関連するデータ両者を示す。勿論、このような阻害剤の使用は、該キナーゼのタンパク配列の、種々の位置を変更して、これらと結合するであろう組み換えキナーゼを生成することが必要とされる可能性があるが、このような種々の変更も、本発明の範囲内にある。

更に、本発明の阻害剤が、ADPおよびPP3誘導体に制限されるものではないことに注意することも重要である。例えば、このような阻害剤として、他の天然ヌクレオチドリン酸ドナー

10

20

30

40

50

基質の誘導体を利用することも可能であるはずである。幾つかのキナーゼを研究するためには、種々の類似の塩基が、実際に好ましい可能性がある。例えば、いくつかのキナーゼが、燐酸基ドナーとしておよびエネルギー源としてGTPを利用して、このようなキナーゼの組み換え型に対する阻害剤を生成することは公知であり、グアノシン二燐酸の類似体が適している。更に、該天然基質と関連する化合物(例えば、他の塩基)および該基質に対して化学的には無関係の化合物が、予想に反して、活性サイトに結合し、かつ(本発明の目的にとっては不要であるが)該酵素による化学的触媒作用を通して、他の基質に作用され、またはこれに作用する可能性がある。しばしばこれらは、該天然基質と同様に、またしばしば異なる様式で触媒反応に関与する。このような化合物およびその誘導体は、これらに対してオルソゴナルである阻害剤を設計するための適当な出発点であり、これらも本発明の範囲内にある。同様に、他の公知のキナーゼ阻害剤を、構造を第10図に見ることができるような、本発明の阻害剤の合成のための開始点として使用することができる。勿論、一般的には未知の阻害剤の誘導体でさえも、一旦同定されれば、本明細書に記載し、その一部となっているように、本発明の阻害剤を設計するための、適当なコア構造である。更に、本発明の阻害剤は、化学的な合成手段によって製造されるものばかりか、天然に見られ、かつ該役割(その幾つかについては、上で論じた)を果たし得る化合物をも包含する。更に、当業者は、ここに記載するもの以外の他の変形も存在し、またそれらも本発明の範囲内にあることを理解するであろう。

本発明で使用するための候補である、該阻害剤は、有利にスクリーニングして、これらが野生型のキナーゼによって受け取られる程度を決定することができ、該スクリーニングは、以下の実施例13に示すような手順によって、あるいは本明細書の実施例9に示すような、タンパクキナーゼに富む細胞または細胞群の使用を含む手順によって実施される。このようなアッセイによって、各阻害剤が、該組み換えキナーゼよりも低い程度に、野生型キナーゼと結合するか否か、あるいは好ましくは該野生型キナーゼが、該阻害剤と実質的に結合しないかどうか、あるいは最も好ましくは該阻害剤と全く結合しないかどうかを決定することができる。全く容易には結合しないこれらの基質に関連して、対象とする該キナーゼを、これらにより容易に結合するように組み換える試みは有益である。勿論、該組み換えキナーゼをまず製造し、次いでこれを該野生型キナーゼと共にアッセイして、これが該野生型よりも良好に、所定のオルソゴナル基質を利用するか否かを決定することができる。これは、実施例13で使用した方法である。しかしながら、多くの状況の下では、上記のように予備スクリーニングすることが好ましい。勿論、他のアッセイ法も当業者には明らかであり、またこのようなアッセイの利用は、本発明の範囲内にある。

組み換えキナーゼ

キナーゼを再度組み換えして、野生型のチロシンおよびセリン/スレオニンキナーゼの存在下で、その真正の基質をユニークに標識する上で満たすべき、いくつかの基準がある。該組み換えキナーゼは、(1)野生型タンパクキナーゼによってはさほど容易に利用されない、ATP類似体(A^*TP)を受け取り、好ましくは野生型キナーゼによっては実質的に利用されない A^*TP を受け取り、最も好ましくは野生型キナーゼによっては全く利用されない A^*TP を受け取り、(2)好ましくは、高い触媒効率をもつ A^*TP 類似体を利用し、かつ(3)好ましくは、天然のヌクレオチド基質(ATP)に対して低い触媒活性をもち、結果として細胞レベルのATP(1 - 2mM)の存在下で、該突然変異キナーゼは、該燐酸基ドナーとして、優先的に A^*TP を利用する。このような組み換えキナーゼを、該野生型キナーゼのタンパク基質特異性の研究で使用する場合には、これらの基準は、該キナーゼのタンパクターゲット特異性を実質的に変えること無しに満たす必要がある。

同様に、キナーゼを再度組み換えして、本発明の阻害剤によって阻害されるようにするためには、いくつかの基準を満たす必要がある。該組み換えキナーゼは、(1)野生型キナーゼとはさほど容易に結合しない、阻害剤と結合し、好ましくは該阻害剤は野生型のキナーゼと実質的に結合せず、また最も好ましくは野生型キナーゼとは全く結合せず、(2)好ましくは該組み換えキナーゼは、高いアフィニティー(即ち、低い IC_{50})で該阻害剤と結合する。該阻害剤が、該組み換えキナーゼに対応する該キナーゼの野生型と結合するか否かは

10

20

30

40

50

、一般的には特に重要である訳ではない。というのは、このような結合並びに結果としての阻害が、該組み換えキナーゼの阻害を増大するからである。しかしながら、該キナーゼの野生型が、他の野生型のキナーゼよりも良好に該阻害剤と結合しないことが、最も可能性が高い。阻害性の組み換えキナーゼを、該野生型のキナーゼのタンパク基質特異性を研究するのに使用し、あるいは以下で更に議論するように、遺伝子療法または他の手段によって、該キナーゼの野生型を置換するのに使用する場合には、対応する野生型と比較して、該組み換えキナーゼのタンパクターゲット特異性を変更すること無しに、上記の基準を満たすことが好ましい。

本発明を開発した際の技術の視点から見ると、これら基準を同時に満たすことが可能であるか否かを、予測することはできなかった。事実、このことは疑問であった。というのは、組み換えられたATP結合サイトが、第二の基質結合サイトと極めて近接しているからである。しかし、以下の実施例に示すように、好ましい基準を含む、これら基準の全てが、記載されたv-Src変異体を作成し、これらにN⁶(シクロペンチル)ATPを与え、かつこれらをN4-シクロペンチルPP3を用いて阻害した場合には、同時に満足された。

実施例1は、12個のATP類似体を記載し、これらは、変異体v-Srcに関する研究で使用され、以下の実施例において説明される。これらのオルソゴナルATP類似体は、このおよび他のキナーゼの、その他の有用な変異体を開発することを目的とする研究において、また本明細書の至る部分に記載されている、いくつかの方法にとって有用である。しかし、本発明の範囲は、これら特定のATP類似体に制限されることはなく、また当業者は多くの他の可能なオルソゴナル基質が、本明細書に記載の、置換でき、もしくはその代用品となり得ることを認識するであろう。例えば、異なる、及びより複雑な脂肪族または芳香族基を、ATPのN⁶位に付加することができる。更に、本発明のオルソゴナル基質は、N⁶位におけるヌクレオチドの変性に制限されない。アデノシン上の種々の位置における変性のための化学的手段は公知であり、これらのいずれも本発明の範囲内にあり、またヌクレオチドのリング構造を変更し、置換することさえ可能である。勿論、このようなオルソゴナル基質の使用は、該キナーゼのタンパク配列の、種々の位置を変性して、これらに結合する組み換えキナーゼを製造することが必要となる可能性があるが、このような種々の変性も、本発明の範囲内にある。

更に、本発明のオルソゴナル基質がATP誘導体に限定されないことに注目することは重要である。種々のキナーゼを研究するためには、実際に種々の類似体塩基が好ましい。例えば、いくつかのキナーゼが、燐酸基ドナー基質およびエネルギー源として、GTPを利用することは、公知であり、このようなキナーゼの研究のためには、グアノシン三燐酸の類似体が好ましいであろう。それにも拘らず、該天然基質とは化学的に無関係の化合物が、しばしば活性サイトと結合することが出来、かつ該酵素による、化学的触媒反応を介して、他の基質によって作用され、もしくは該基質に作用し得ることは、周知である。しばしば、これらは、該天然の基質と同一の様式で、またしばしば異なる様式で、該触媒反応に参与する。このような化合物およびその誘導体も、また本明細書で使用する、用語「天然基質」及び「オルソゴナル基質」の範囲内にある。

更に、本発明のオルソゴナル基質は、化学的合成手段によって製造されるものに制限されず、天然において見出すことが出来、かつそのような役割を演じることのできる化合物をも包含する。当業者は、ここに記載したもの以外の変法が存在し、かつこれら全てが本発明の範囲内に入ることを理解するであろう。

本発明で使用するための候補である、該オルソゴナルヌクレオチドを、有利にスクリーニングに付して、以下の実施例2に記載のような、スクリーニング法を利用して、これらが野生型のキナーゼによって受け取られる程度を決定することができる。このようなアッセイによって、各オルソゴナル基質が、このようなキナーゼに対する正常な基質よりも低い程度にて、野生型キナーゼによって受け取られるか否かを、あるいは好ましくは、該基質を実質的に受け取らず、あるいは最も好ましくは、これを全く受け取らないことを、決定することができる。容易に受け取られることのない、これらの基質に関連して、対象とする該キナーゼを、より一層容易にこれらを受け取るように組み替える試みを行うことは価

10

20

30

40

50

値あることであり得る。勿論、まず組み替えキナーゼを製造し、次いで野生型の酵素と共にこれをアッセイして、これが、該野生型のキナーゼよりも良好に、所定のオルソゴナル基質を利用するか否かを、決定することができる。しかし、多くの状況のもとでは、実施例2に記載したような、予備スクリーニングが好ましいであろう。勿論、他のアッセイ法も、当業者には明らかであり、このようなアッセイの利用も、本発明の範囲内にある。

組み替えv-Srcの設計は、以下の実施例3で説明する。記載されるように、該組み換え型は、全部ではないが、殆どのキナーゼに見られるものと相同である、ドメインを持つ、他のキナーゼの結晶構造を参照して、設計される。明らかなごとく、ここに記載される、例示的な変異キナーゼは、タンパクキナーゼの全配列を含むのではなく、そのフラグメントとして構成されている。しかし、完全な配列を使用した場合の性能と、実質的な差はない。勿論、概念及び実施可能性は、フラグメントまたは全キナーゼの何れを使用したかとは無関係に、同一であり、これら両者は、本発明の範囲内にある。それ故に、該用語「キナーゼ」とは、請求の範囲を解釈する場合を含めて、全酵素またはそのフラグメントを包含するものと理解すべきである。

この方法を利用して、殆ど全ての他のキナーゼの、同様な変異体を設計することが可能である。これを実施する方法は、以下の工程：(a) 同等なまたは同種の酵素の磷酸ドナー基質、または公知のキナーゼ阻害剤(これは、キナーゼに対して非-特異的であり得、一般的にキナーゼに対して特異的であり得るが、該キナーゼに対しては特異的でなくてもよく、あるいは該キナーゼに対して特異的であってもよい)と結合した該酵素の結晶構造から、グリシン以外的一种以上のアミノ酸を同定し、ここで該アミノ酸は、該結合磷酸ドナー基質または阻害剤上のある置換基と十分に近接していて、推定上のオルソゴナル阻害剤中の、該置換基と結合した嵩高い置換基の侵入を、立体的に制限しており、および(b) 該野生型のタンパクキナーゼをコードするヌクレオチド配列を、該同定されたアミノ酸の一種以上をコードする、該ヌクレオチドトリプレットが、該同定されたアミノ酸よりも立体的に嵩高くない側鎖をもつ、アミノ酸をコードするヌクレオチドトリプレットに転化するように、変異形成する工程を含む。

上記の方法は、導入の立体的制限、または排除を、どのアミノ酸が変更されるか、および如何にこれらを変更するかを決定するための基準として利用する。しかし、本発明は、このようには制限されない。また、キナーゼのオルソゴナル基質と結合する能力を、他の因子、例えば疎水性、親水性、イオン結合または反発、水素結合、該酵素とオルソゴナル基質上の求電子基との間の共有結合形成等を考慮して、該キナーゼを組み換えすることも可能である。

本発明を利用したタンパクキナーゼの研究は、多くの異なるキナーゼのドメイン構造、およびその一般的な相同配列に関連する莫大な知見によって、大幅に簡単化される。"The Protein Kinase Fact Book"(71)は、まさに数百のタンパクキナーゼの3つの機能的ドメインに関するタンパク配列データを与え、これと共に、主な文献において入手できる配列情報は、本発明の該キナーゼに対する、更なる応用を更に一層容易にするはずである。同様な情報は、他の多重基質型酵素について入手でき、これはその研究および本発明によるその利用を、容易にするはずである。

本発明の好ましい方法は、基質類似体および変異タンパクキナーゼの合理的な設計を包含するが、これら両者は、また組み合わせ法として知られている方法を利用することによって製造することも可能である。有機化合物を合成するための、多数の組み合わせ法がある。このような方法の一つを利用すれば、逐次的な化学的工程を使用して、樹脂ビーズ上でヌクレオシド類似体を合成し、次いでホスホリル化に付して、そのヌクレオチド三磷酸を製造する前に、該樹脂から該類似体を遊離させる。このような方法を利用して、v-Srcキナーゼ、他のタンパクキナーゼ、または他の多重基質型酵素の変異体に対する、推定上のオルソゴナル基質のライブラリーまたは集団を形成した後に、該集団またはライブラリーを、特に好ましい結合または触媒特性について、スクリーニングすることができる。これは、このような推定的オルソゴナル基質の構造、形状および電子的特徴の、より一層十分な研究を可能とする。更に、所定の基質の多数の類似体を検討した場合に、予想外のこと

10

20

30

40

50

に、有効な基質または阻害剤が見出されることがしばしばある。その上、該最良の化合物を具体的に設計するのに、十分に理解されたパラメータのみを使用した場合に、しばしば最も望ましい化合物が、選択されないこともある。

また、タンパク変異体を製造するための、当分野で公知の多数の組み合わせ法がある。これらは、「エラープローン(error prone)」ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、「セクシュアル(sexual)」PCR、または該タンパク配列における固定位置にランダムなヌクレオチドをもつプライマーを使用するPCR法を含む。他の配列ランダム化法は、cDNAまたはプラスミドDNAまたはバクテリアのMutD型の菌株の化学的な変異形成体を使用する方法を含み、これらは発現するタンパク中に、ランダムに変異を誘発することが知られている。ランダムに変異形成されたタンパクキナーゼまたは他の多重基質型の酵素を製造するために、このよう
10
な方法を利用し、次いで特定の高い活性をもつ、特定のオルソゴナル基質をもつ、あるいは上記の章において記載したように、組み合わせ合成法を利用して製造した、該推定的なオルソゴナル基質の幾分かまたはその全部を持つものについて、スクリーニングすることによって、本発明を実施することができる。以下の実施例に記載するアッセイ法は、この目的にとって適しており、また当業者は容易に別の方法を工夫することができよう。

小さな有機分子の構造的空間およびタンパク配列の空間を探索するために開発された、これらの方法および他の方法は、ここに記載した技術的応用のために特に有用であり、ここでは我々は、該タンパク御階推定上の阻害剤両者を変更または改変して、最良の可能な非-天然(即ち、オルソゴナル)適合を見出す。任意のこれらの方法またはここに記載した任意の他の方法を利用することも、本発明の範囲内にある。
20

一個の組み換えキナーゼの合成を、実施例4に記載する。この努力の着眼は、ATPの該N⁶の約4オングストローム内の、アミノ側鎖にあるが、この距離について不思議なことは何もない。約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10オングストローム、またはそれ以下、それ以上、またはその中間の距離内にある側鎖をもつ残基も、変性のターゲットと考えるべきである。約3~約6オングストロームの側鎖をもつアミノ酸は、好ましいターゲットであろう。一般的に、密接した側鎖をもつこれらのアミノ酸は、より間隔の大きな側鎖をもつものよりも好ましい。というのは、これらが、該阻害剤上の該オルソゴナル置換基に、最大の立体障害または他の障害を与えるものと予想されるからである。また、極めて近接した側鎖をもつものが、最も好ましい。

勿論、実施例で使用方法以外にも、今日ではサイト特異的変異形成等の、遺伝子配列
30
を変更しかつ発現するための、他の多くの方法があり、我々は、将来において他の方法が開発されるであろうことを期待する。これらの任意の方法または全ての方法の利用が、本発明の範囲内に入る。更に、今日では恐らく遺伝子操作法の利用が、このような変異体の調製のための好ましい方法であるが、これが唯一の方法ではない。例えば、ある組み替えられたキナーゼを設計し、次いで化学的なペプチド合成のための、公知の方法によって、該タンパクを合成することができた。あるいは、一又はそれ以上の側鎖が、サイズ、疎水性、または他の特徴を変化させ、より容易にオルソゴナル基質を利用するように、特定の位置において所定の酵素を化学的に変性することができる。このような方法の利用全てが、本発明の範囲内に入る。

実施例7は、該組み換えキナーゼが、そのタンパク基質特異性を保持するか否かを決定す
40
るために実施することのできるテストを記載する。該野生型タンパク基質特異性は、実施例におけるように、該キナーゼがどの基質に作用するか、あるいはその作用がどの程度であるかを研究するために、該組み換えキナーゼを使用することが最終目標である場合には、実質的に維持されることが好ましく、また例えば遺伝子操作によって、インビボで対応する野生型のキナーゼと置換するのに、あるいはその代用品として、該キナーゼを使用する。しかし、このような目的にとっては、該キナーゼが依然としてその野生型キナーゼと同一の基質を識別することが重要であり、これが同一の速度でこれを識別することは重要ではない。即ち、該キナーゼが、緩慢に、迅速に、あるいは高率でもしくは低率で識別を行う場合には、該組み換えキナーゼは、依然としてこのような目的にとって実質的な価値を持つ可能性がある。該組み換えキナーゼが、該野生型酵素と同一のタンパク基質を認識
50

しない場合には、これは野生型酵素の研究の際の価値は低い、依然としてタンパクのホスホリル化および一般的なキナーゼの研究における実質的な価値を持つ可能性があり、また依然として本発明の範囲内にある。

勿論、実施例7で使用する特定のアッセイは、有用ではあるが、必ずしも利用する必要はない。当業者は、容易に匹敵する情報を与えることのできる、他のアッセイを開発し、もしくは採用することができよう。

一旦、所定のオルソゴナル基質類似体を受け取る、あるいは所定の阻害剤によって阻害される、変異キナーゼを製造すれば、実施例5および6に記載したような、古典的な酵素の運動学的分析を利用して、特徴付けすることができる。また、実施例8に示すように、該変異体が該類似体によって阻害される、あるいはこれを利用することのできる程度、および該類似体が、野生型の該酵素に対する、「死んだ」(即ち、完全に不活性な)阻害剤であるか否か、を研究することができる。勿論、実施例で使用する該方法が、唯一の方法ではなく、これらの研究は、別の方法を利用して行うことが出来、また当業者は、容易に別法を工夫することができる。

実施例10に示すように、本発明の阻害剤によって阻害される変異体を提供するためには、多数のアミノ酸置換を行う必要はない。変異体GST-XD4(I338A)およびGST-XD4(I338G)の場合におけるように、単一のアミノ酸変化を行うことのみが必要である。

キナーゼ基質を同定するためのアッセイ

本発明の極めて簡単な態様を、以下に示す。まず、該オルソゴナル阻害剤を、該組み換えキナーゼに対して付加された遺伝子を発現するか、あるいは対象とする該キナーゼの正常な複製体を発現する、対象とする2種のサンプルに添加する。この阻害剤は、シグナルカスケード(例えば、透過性にされた細胞、細胞抽出物、または自然な状態でこれらに対して透過性である細胞)の活性化の前、後またはその間に、添加することができる。次に、細胞または細胞画分中のホスホリル化されたタンパク全ての検出を、放射性燐[$-^{32}\text{P}$]ATPを使用することによって、またはホスホリル化されたアミノ酸に対して特異的なモノクローナル抗体を使用することによって可能とする方法を、対象とする該キナーゼの特異的阻害の結果を明らかにするために使用する。対象とする該キナーゼの正常な複製物を発現する細胞において、元のキナーゼの該タンパク基質が、該阻害剤の存在下においてさえ標識され、一方で該組み換えキナーゼの該タンパク基質は、少なくとも低度に標識され、好ましくは該組み換えキナーゼの該タンパク基質は、実質的に標識されず、また最も好ましくはこれらは全く標識されない。

該変異体に相当する野生型キナーゼが、該細胞から、例えばそのための細胞遺伝子の「ノックアウト」によって除去される場合も好ましい。このようなアッセイの該標識されたタンパクを、該野生型キナーゼを含むが、該変異キナーゼを含まないコントロールサンプルと共に検査した場合には、いくつかのバンドにおいて、該変異体で処理したサンプルの強度が、該コントロールと比較して、低下する。好ましくは、強度におけるこの差は高く、最も好ましくは、該阻害剤で処理した、変異体含有サンプルにおいて消失するバンドが存在する。このことは、該キナーゼの野生型が、これらの特異的に標識されたタンパクをホスホリル化し、該キナーゼが阻害された場合には、これらのバンドは、標識されない。

実施例10は、本発明の変異体キナーゼを、どれが、該タンパクキナーゼに対する細胞内タンパク基質であるかを検出する場合には、そのオルソゴナル基質類似体またはその阻害剤と共に使用する方法の一例を与える。このようなテストの開発は、本発明に至る研究の主な目的の一つである。

一般的に、実施例10および第8図に記載した方法は、一般的に適用可能であるが、使用できる他の多くの方法があり、オルソゴナル基質類似体または阻害剤を受け取る変異体が、調製される。例えば、該燐酸塩を[$-^{32}\text{P}$]燐酸塩で置換することによって、末端燐酸塩上に標識された部分を含むように、まず該天然の燐酸ドナー基質を調製する。次いで、該類似体または阻害剤と共に、この基質を、溶解した細胞、細胞抽出物、透過性にされた細胞、または該オルソゴナルヌクレオチド三燐酸基質類似体または該阻害剤に対して元々透過性であり、該変異キナーゼを発現し、もしくは該変異キナーゼが外因的に(例えば、微量

10

20

30

40

50

注入によって)添加された、細胞のサンプルに添加する。該変異キナーゼが阻害され、および/または阻害されない程度まで、そのタンパク基質をホスホリル化することができる条件下にてインキュベートした後、該標識された生成物を抽出し、かつコントロールサンプルについて得られるものとの比較において、分析する。該コントロールサンプルは、実質的に同一の方法で処理されているが、夫々該類似体または阻害剤は添加されていない。標識されたタンパクの検出法は周知であり、また定量的および定性的方法両者を含む。更に、タンパクを特徴付けし、かつ同定するための全ての方法を、特異性を持つ該タンパク基質が何であるか、およびその機能がなんであるかを決定するために使用できる。最終的に、該種々のタンパクキナーゼ各々がどのタンパク基質に作用するかに関する理解を発展させ、および細胞シグナル伝達の不思議さを極めて詳細に明らかにすることが可能となるはずである。

10

一旦、一以上の細胞タンパク基質が同定されると、同様なアッセイを利用して、所定のタンパクキナーゼの、一以上の基質に及ぼす活性を調節することのできる、薬物または他の化合物を、同定することが可能となる。例えば、種々のこのような化合物の溶液を、少量添加して、細胞を含まない抽出物、変異キナーゼを、標識されたオルソゴナル基質類似体および/または阻害剤と共に含有するサンプルを、テストすることができた。次いで、該標識されたタンパクを、例えばオートラジオグラフィーを伴うゲル電気泳動法によって同定し、同様に処理されたが、薬物または他の化合物は添加されていない一対のテストサンプルの結果と比較することができる。

添加された化合物+該類似体および/または該阻害剤によって処理されたサンプル中で標識される、基質類似体および/または阻害剤を含有するサンプル内で、タンパクが標識されない場合、この事実は、該添加された化合物によって、該キナーゼがあるタンパクをホスホリル化することを意味しており、該タンパクは、該化合物の不在下では作用しない、即ち該化合物は、該タンパクに対する該キナーゼの活性を高めるように調節する。また、標識タンパクが、該化合物または薬物を添加したテストサンプル中に出現するが、該化合物または薬物を添加していないテストサンプル中には出現しない場合、この事実は、該添加された化合物が、該キナーゼによるタンパクのホスホリル化を阻害し、ここで該タンパクは、該化合物の不在下では作用せず、即ち該化合物は、該タンパク基質に対する該キナーゼの活性を低下するように調節する。

20

更に、例えばオートラジオグラムを走査し、データを積分することによって、各標識タンパクについて定量的測定を行った場合、より微妙なキナーゼ活性に及ぼす作用を検出できる。例えば、あるタンパクが、所定の化合物の存在下または不在下で、より完全にまたはより不十分にホスホリル化されること(即ち、殆ど顕著な調節が見られない)を、理解することが可能である。また、いくつかの化合物は、いくつかのタンパクに対するキナーゼ活性を高めるように調節し、かつ同時に他のタンパクに対するキナーゼ活性を低下するように調節するものと、予想することができる。

30

ドラッグデザインターゲットキナーゼのスクリーニングにおける利用

上記のように、キナーゼは種々の疾患において、重要な役割を演じているので、単一の野生型キナーゼまたは一群の野生型キナーゼを、特異的に阻害することのできる阻害剤を開発することは、極めて興味深いことである。これらの疾患関連キナーゼの活性をダウンモジュレーションすることによって、該疾患の症状を軽減し、もしくは該疾患を治癒することさえ可能となるはずである。

40

しかしながら、上で簡単に記載したように、野生型のキナーゼの阻害剤を製造する際に経験する大きな難点が、この方法の能力を制限している。その主な難点は、特異的であり、かつ意図したターゲット以外の他のキナーゼを阻害しない、阻害剤を見出すことである。このような非-特異性に関する理由は、(i)キナーゼのヌクレオチド三リン酸結合サイトが、進化において高度に保存されており、また(ii)多くのキナーゼが、「縮退」状態にあり、即ち十分に類似する活性と特異性とを有しており、その結果該キナーゼは、遺伝子欠損または他の利用から、細胞内には不在でありまたはその濃度が減少する、他のキナーゼと置換可能である。該結合サイトの類似性の問題は、多くの例において、例えば注意深い

50

合理的な阻害剤の設計、または特異性に基く、組み合わせライブラリーからの阻害剤の選択によって、解消することができる。しかしながら、別のキナーゼと、真に縮退しているキナーゼを使用した、そのための努力は、同様に成功しなかった。共に縮退関係にある全てのキナーゼの何れも、最良の候補化合物によっても阻害され、あるいは該ターゲットが阻害されたとしても、縮退したキナーゼが「取って代わる」ために、該阻害されたものの活性を求めることは不可能であろう。

そのために、キナーゼをスクリーニングして、どの野生型キナーゼが縮退しているか、即ち特異的阻害にとっては恐らく貧弱な候補がどれであるか、どれが縮退していないか、即ち特異的阻害にとっては好ましい候補がどれであるかを、決定するための方法に対する需要がある。本発明は、このような方法を提供する。本発明は、対象とする任意のキナーゼの、特異的で固有のキナーゼを、選択された候補阻害剤によって阻害されるように特異的に設計された、キナーゼの変異体を製造し、次いでその阻害の効果を検討することによって、生成する手段を提供する。

これを達成する一つの手段は、細胞または細胞抽出物をインビトロでテストすることである。例えば、末端磷酸基に、ある種のラベル(「第一のラベル」)をもつ、このようなサンプルに、ATPを添加し、該末端磷酸基において様々に標識された(「第二の標識」)、該特異的な阻害剤を添加することができる。所定のタンパク基質上の該第二の標識の出現率における低下は、(例えば、ゲル電気泳動によってみられるように)該変異キナーゼの特異的阻害を示し、またその同一の基質上の該第一の標識の出現率は、該他のキナーゼが、そのホスホリル化の役割を果たしていることを示し、その程度は、このような標識化の相対的な割合によって示される。該組み換えキナーゼが、特異的に阻害されることが明らかになり、また他のキナーゼが、該組み換えキナーゼが阻害された場合に、その基質のホスホリル化を行わない、あるいは少なくとも完全にはホスホリル化を行わない場合には、該キナーゼは縮退しておらず、あるいは少なくとも完全には縮退しておらず、従ってこれは恐らく、これが関連する疾患を治療するための薬剤として使用するための、該野生型の特異的な阻害剤の開発のための良好な候補ではない。しかしながら、該変異キナーゼの、本発明の阻害剤による阻害が、他のキナーゼによって補償されない場合には、これは該野生型キナーゼの阻害剤を開発するための、好ましい候補物質である。

このようなスクリーニングのためのもう一つの好ましい方法は、対象とする疾患の動物モデルを生成し、次にその野生型遺伝子を「ノックアウト」し、更に遺伝子操作によって、本発明の変異キナーゼをコードする遺伝子をそのゲノムに挿入する(「ノックイン」)ことである。次に、本発明の阻害剤、好ましくはインビトロで該変異体を阻害することが示されたものは、この変異キナーゼをダウンレギュレーションするのに利用できる。ダウンレギュレーションが、該モデル動物内での該疾患の症状または病状を軽減し、もしくは該疾患を治癒した場合には、該キナーゼは、該野生型の特異的阻害剤を開発するための好ましい候補である。

遺伝子療法的応用

本発明の変異キナーゼおよび阻害剤は、またヒト並びに動物における疾患を治療するために、直接利用することもできる。動物モデル系について、すぐ前に記載したように、これらのキナーゼが媒介する疾患に罹った患者に、遺伝子置換法を利用することもできる。一種以上のこのような野生型のキナーゼに対する、この野生型の遺伝子は、例えば当分野で公知の「ノックアウト法」によって除去し、次いでこれら一以上のキナーゼの、特異的に阻害可能な変異体を、例えば「ノックイン法」または当分野で公知の遺伝子療法により、動物のゲノムに添加する。従って、該阻害剤は、これら一以上の変異キナーゼをダウンモジュレートし、結果として該疾患を、少なくともある程度まで改善することを可能とする、薬物として使用できるが、正常な細胞機能のために必要であることが知られている、これらのキナーゼの活性の程度を、維持することができる。勿論、該キナーゼは、治療上有効であることが明らかである場合には、強力に阻害することによって、本質的に活性低下させることも可能である。更に、該疾患が、ダウンレギュレーションまたは活性低下期間中に、大幅に改善または治癒されることが明らかとなった場合、該阻害剤の投与を中断す

10

20

30

40

50

ることができ、また該疾患は再発または悪化することは、殆どない。そうでなくとも、阻害を長期間に渡り、あるいは永続的に中断し、外患者の残りの人生では、該野生型のキナーゼの代わりに、該変異体を機能状態に維持することも可能である。本発明のこの特異的な阻害剤は、環境中には存在しないので、該変異キナーゼは、正に野生型と同様に挙動するはずである(但し、該組み換え操作が、その活性または速度を変更する可能性があることを除く)。また、該疾患が、将来において再発または突発した場合には、該遺伝子交換を繰り返すこと無しに、外患者を該阻害剤で、再度治療することができる。

他の多重基質型酵素

上記のように、本発明は変異キナーゼ、オルソゴナル阻害剤、およびその合成並びに使用に制限されない。本発明は、他の多重基質型酵素に対しても、同様に良好に機能し、該酵素は、本明細書でドナーと呼ぶ一基質の一部または全体を、本明細書でレシピエントと呼ぶ他の基質に伝達する。また、これから発見されるであろう多くのこのような酵素が存在する。このような例の何れかにおいて、本明細書を検討した当業者は、本発明のこのような酵素に対する適用性を、十分に理解するであろう。このような例において利用できる作業は、上記のキナーゼについてここに詳細に記載したものと、全く同一である。まず、該ドナー基質が何であるかを同定し、および/または該キナーゼを阻害できる化合物(たとえ該化合物が該キナーゼに対して特異的ではないにしても)を同定する必要がある。

第二に、嵩高い置換基が、該基質または該阻害剤に付加され、結果として該野生型のキナーゼとは容易に結合せず、あるいは好ましくは実質的に該野生型のキナーゼとは結合せず、また好ましくは全く結合しない可能性がある場合を、考慮する必要がある。キナーゼの場合または上記のような他の多重基質型酵素の場合には、これらの内のどの類似体に対して制限性とするべきかについては、実際には必要なく、理想的とは思えない幾つかを包含する、その種々のものを製造し、スクリーニングによって、何れのものが最良であるかを決定することができる。如何にしてこれを実施するかに関する更なる手引きは、以下の実施例から得ることができる。結果を第16図に示した、この阻害アッセイは、このようなスクリーニングに特に適した、非-限定的なアッセイの例である。

第三の工程は、該類似体が結合している場合に、該嵩高い基が存在すると予想される三次元位置における一以上のアミノ酸が、あまり嵩高くない側鎖をもつアミノ酸で置換されるように、該キナーゼを組み換え操作に付して、該阻害剤の該嵩高い部分に対して、「空間を形成する」ことである。勿論、工程2および3を逆の順序で実施することも可能である。

例えば、トランスフェラーゼ酵素が、本発明を利用する研究に対する最も興味深い候補である。本明細書に与えられる教示にしたがって、オルソゴナル阻害剤を受け取る変異トランスフェラーゼを調製することができ、またこれらを一緒に使用して、該キナーゼについて上記した方法によって、相同トランスフェラーゼの大きな群内の、一つの特定のトランスフェラーゼに関する、直接的な基質を同定することができる。メチルトランスフェラーゼの該群は、全く興味深いものであり、本明細書に与えた方法を利用して、全く容易に研究することができる。これら酵素は、すべて同一のヌクレオチドを基本とするコファクター、S-アデノシルメチオニン(AdoMet)を、メチル基(CH₃)ドナーとして利用する。この群の種々の構成員は、AdoMetの該メチル基を、広範に及ぶ細胞成分、例えばタンパク(この場合、該メチル基はアルギニン、アスパラギン、およびグルタミン側鎖に付加される)、DNA(この場合、該メチル基はシトシンのC-5位、またはグアニンのN-7位に付加される)、細胞膜成分、例えば燐脂質、およびホルモンを包含する小さなアミンの多くに伝達できる。多くの新たなターゲットも、この酵素の多様な群に関して同定されている。本発明は、これらの酵素が行っている、著しく複雑な細胞メカニズムを解明する機会を与える。

例えば、N-6位に、または他のリング位置に、付随的な嵩高い疎水性の基を含む、一群のAdoMet類似体を合成することが出来、これらの位置は該類似体をオルソゴナルとし、天然の基質と同様に、野生型のメチルトランスフェラーゼによって容易に受け取られることはない。また、該転移されたメチル基の領域における該構造は、該メチル基が転移に対してより化学的に耐性となるように、あるいは例えばS-アデノシルシステインが、代替りの出発化合物として使用できるように、変更される。DNAメチルトランスフェラーゼ、M.HhaI

10

20

30

40

50

およびカテコールメチルトランスフェラーゼ、カテコールO-メチルトランスフェラーゼ(COMT)の結晶構造を利用して、タンパクキナーゼについて我々が行ったように、変異に対する候補である、アデニン結合ポケット中のこれらのアミノ酸を同定することが出来、また当業者は変異形成される一群の残基を同定して、一種以上の該オルソゴナル基質の、該高い疎水性の基を容易に蓄積できるはずである。

例えば、大きな疎水性の基を変異させて、より小さなアラニンまたはグリシン残基とし、あるいは水素結合しているアミノ酸を、AdoMetの該オルソゴナルプリン類似体を与える他のものに置換することができる。勿論、無数の他の可能な変異も良好に機能する可能性があり、これらすべては本発明の範囲内にある。また、メチルトランスフェラーゼの配列整合性および結晶構造から、これらが、共通の触媒ドメイン構造を持つことが知られており(70)、従ってこの方法は、M.HhaIおよびCOMTに制限されないが、同様に他のメチルトランスフェラーゼにも適用できるはずである。

オルソゴナル阻害剤を受け取る、メチルトランスフェラーゼ変異体を同定した後、AdoMetの硫黄原子に結合したC-14標識メチル基を含む、放射性標識されたAdoMetを合成することができる。この放射性標識された類似体を、一個の変異メチルトランスフェラーゼを発現する細胞に添加した場合、該サンプル中の全メチルトランスフェラーゼの直接的な基質(例えば、タンパク、DNAまたはポリアミン)を、該C-14メチル基によって特異的に放射性標識する。しかし、これを該オルソゴナル阻害剤の存在下で行った場合には、対象とする該メチルトランスフェラーゼに対する特異的な基質は、該阻害剤を含まないサンプルと比較して、あまり標識されず、好ましくはこれらは実質的に標識されず、また最も好ましくは全く標識されないであろう。このように、あるいは該キナーゼの研究に関連してここに記載した、他の方法の使用を通して、メチルトランスフェラーゼの直接的な基質を同定することができる。癌、胚の発生、多形核性白血球の走化性、または神経学的諸疾患において重要である。更に、次いで本発明の方法を利用して、該酵素の活性を調節する化合物が同定できるか否かを決定することができる。恐らくここでは説明しない、本発明の幾つかの他の局面は、該メチルトランスフェラーゼに適用でき、また他の多重基質型酵素にも適用できる。

該メチルトランスフェラーゼに対する本発明の適用に関する上記の議論は、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の、該タンパクキナーゼ以外の多重基質型酵素に対する適用を例示するものである。当業者には理解されるように、本発明は同様に、同様な方法を使用して、他の多重基質型酵素に対して適用することができる。

用語

生物学において一般的であるように、本明細書における本発明の説明は、多数の技術的用語の使用を必要としている。完全に説明し尽くすことは実際的ではないが、これら用語の幾つかに関する定義を、照会を容易にする目的でここに与える。他の用語に関する定義も、本明細書の至る部分に見られるが、これらについて、ここでは繰り返さない。ここに定義する、あるいは本明細書の至る部分で定義する用語は、当業者が当分野で使用する際にもつものと理解しているであろう以上の意味を与える意図はない、ことに注意することは重要である。従って、これら用語のおよび本明細書の至る部分で定義された用語の意味を解釈する上で、他の原典をも参考とすべきことを主張するものである。しかし、ここでおよび本明細書の至る部分で与えられた定義は、該定義された用語の意図された範囲並びに意味を決定する上で、常に考慮すべきである。

ここで使用する用語「オルソゴナル」とは、構造的におよび/または幾何学的に、所定の酵素に対する天然物質、または該酵素の野生型の阻害剤に対して、類似するが、該天然物質に対するよりも、該酵素の野生型に対する、化合物の結合能力を低いものとする、化学的構造における差をもつ、該化合物を意味する。「天然」基質とは、該酵素の野生型によって利用される基質を意味する。本発明の該オルソゴナル阻害剤は、ここでは種々の様式で言及され、例えばしばしばこれらは、「変性された基質」、「変性された阻害剤」、「類似体」、「誘導体」、正に「基質」または「阻害剤」、および恐らく他の用語によっても言及される。しかしながら、各例において、同一の意味が意図されている。勿論、「オ

10

20

30

40

50

ルソゴナル」およびその同義語は、更に上記本発明の説明において説明されている。

ここに記載される発明の態様の、推定的オルソゴナル基質および阻害剤は、夫々天然の基質または既知のキナーゼ阻害剤上のある原子に、嵩高い置換基を付加することによって製造される。しかし、本発明はこのようには限定されない。例えば、既知の阻害剤または該天然の基質よりも小さな、オルソゴナル基質を、例えば該天然の基質中に存在する一以上の原子または置換基を失っている類似体を調製することによって、製造することができる。このような推定上のオルソゴナル基質または阻害剤を使用して、該酵素を、その野生型のアミノ酸配列に見られるものよりも、大きな側鎖をもつ、一以上のアミノ酸を含むように、変異形成することができる。従って、該オルソゴナル基質または阻害剤が、結合した場合に、これらのより嵩高いアミノ酸側鎖は、該失われた原子または置換基によって形成される余分の空間を満たし、あるいはその一部を満たす。このように、該変異体は、該オルソゴナル基質または阻害剤と結合し、および/またはこれによって阻害されるが、実質的に該正常な基質を利用しないことが予想される。というのは、該付加された嵩高いアミノ酸が、その結合に対する立体障害を及ぼすからである。このような方法は、該得られる変異体の、高度の選択的制御を可能とする。

本発明の実施例の該基質および阻害剤は、非 - 競合型のものであるが、これが本発明の範囲の限定であると考えるべきではないことを、記憶にとどめておくことは重要である。多くの異なる型の酵素基質および阻害剤が公知であり、例えば競合型、非 - 競合型、不競合型、「スイサイド」阻害剤等がある。競合型阻害剤は、その結合サイトに対する基質と競合する。しかし、該阻害剤は、該酵素が行う触媒反応に関与できないので、これは触媒反応の速度を低下する。非 - 競合型阻害剤は、該活性サイトと結合するが、結果として該酵素のタンパク構造と、共有結合的にまたはイオンの結合して、分離できなくなる。従って、これらは、該反応から酵素分子を完全に取り去ることによって、触媒反応を阻害する。これらのおよび他の競合的メカニズムのより詳細な説明は、様々な源に見出すことができる(例えば、72)。このようなメカニズムに関する技術の理解を、本発明の阻害剤の設計に適用することによって、この種の全ての阻害剤を製造することができた。

例えば、結合できるが、反応はしない類似体は、競合的阻害をもたらし、また結合の際に該酵素と共有結合的に付着する類似体は、非 - 競合的阻害剤、即ち毒素である。このような型の全ての阻害剤は、本発明の範囲内にある。

本発明において、用語「相同」とは、ある酵素を変性する方法に関する情報が、如何にして他の関連する酵素の三次元構造に関する情報から、推定できるかを記載するのに使用する。当分野で周知であるように、第二の酵素の一部に対して「相同」である、ある酵素の一部は、該第二の酵素に関連するタンパク配列を持つ。この関係は、これらが、相互に対して同一の相対的位置に、多数のアミノ酸を含むことにある。例えば、想像上の配列：Asp-Met-Phe-Arg-Asp-Lys-Gluおよび想像上の配列：Asp-Met-Ile-Arg-Glu-Lys-Aspは、同一の相対的な位置に4つのアミノ酸および3つの異なるアミノ酸を有している。また、これらは相同配列を持つと言われる。これら鎖間で異なっている該3つのアミノ酸は、第一の配列に相対的な該第二の配列における該置換が、その側鎖上の類似の官能性をもつアミノ酸によるものである点において、「保存性の」差であることに注意すべきである。例えば、GluおよびArg両者は、カルボン酸基で終端している脂肪族側鎖をもち、またPheおよびIle両者は、疎水性である。これは、しばしば相同タンパク配列に関する場合であるが、必ずしもそうである必要はなく、これら2つの想像上の配列は、その差が保存性でなかったとしても、依然として相同であると考えられる。

ある特定の配列またはドメインが、相互に相同であるか否かは、任意の特異性によって、例えば%を使用して表すことはできない。というのは、このような絶対的なものさしは存在しないからであり、どの配列が「相同」であり、かつ相同でないかの定義を、当分野に任せる必要がある。参考文献71は、既知のキナーゼのどのドメインが、当分野により「相同」であると考えられているかに関する優れた概説を与えている。更に、当分野では、一般的には同意できないが、相互に同一の配列も、互に相同であると考えことにする。

「ドメイン」なる用語も、当分野で周知のものであり、また特定の官能性を持つものとし

10

20

30

40

50

て同定されている、あるタンパクの一領域を意味する。例えば、タンパクキナーゼの3つのドメインが、本明細書のいたる部分で議論されており、またその機能的役割も、議論されている。しばしば、該キナーゼの場合と同様に、同一の群の異なる酵素は、各々同一の機能を果たす、同一の数のドメインを有し、かつこれらはしばしば(しかし、常にではない)、該タンパク配列に沿って、同一の順序で配列されている。興味深いことに、該キナーゼに場合と同様に、ある酵素は、他のものとは異なる、そのドメイン間のタンパク配列長をもつことができる。しかし、2つの関連する酵素の該ドメインは、一般的に(しかし、常にではない)相互に相同であり、このことは一般的に対応するドメインの同定を妨害することはない。

本発明のより広い局面を説明する際に、「多重基質型」なる用語を使用する。これは、2またはそれ以上の基質と結合する酵素を意味する。ここで最も興味深いこれらの多重基質型酵素は、ある基質の少なくとも一部および少なくとも一つの他の基質と、接触的に結合するものである。該キナーゼおよび該トランスフェラーゼは、このような多重基質型酵素の2群を構成し、また当業者は、他のこのような酵素および酵素群が存在することを認識するであろう。

「認識」なる用語は、ある基質がある酵素上の活性サイトと特異的に結合する、基質の能力を記載するのに、本明細書でしばしば使用する。これは、単にある酵素の基質(あるいはしばしば基質誘導体もしくは該基質を模倣する完全に異なる化合物であってもよい)が、接触し、かつ該酵素の活性サイトと結合できるが、他の化合物とは結合しないという事実を意味する。この概念は、当分野では周知である。酵素学者は、しばしば該酵素はその基質に対してアフィニティーをもつ、あるいは該基質は該酵素に対してアフィニティーを持つという。彼らは、更にある酵素が、「基質特異性」をもつともいう。実際に、これらはすべて同一の現象を記載するものである。

関連する用語は、「結合」である。ある阻害剤は、一般的に一以上の疎水性、親水性、水素および/またはイオン結合、あるいは非-競合的阻害剤の場合には共有結合を介して、活性サイトに結合または付着させる。

阻害剤の結合および阻害の理由に関する当分野における複雑な理解は、興味深いことであるが、このような理解は、本発明を理解する上で必須ではない。単に、阻害剤による結合が、該触媒反応の阻害を生ずることを明記することで十分である。

本発明の酵素を記載するのに使用した場合、「変異体(mutant)」および「組み換え型(engineered form)」とは、単に、その野生型酵素の配列と比較した場合に、これらが一以上の位置において、異なるアミノ酸を持つ配列を有することを意味する。このような変異体を記載する場合、数値によって分離された二つの文字は、行われたアミノ酸変異を表す。これらの文字は、単一文字アミノ酸コードであり、また該数値は完全な野生型酵素内の、アミノ酸残基の位置である。例えば、GST-XD4は、野生型のv-Srcの特定の部分として同一の配列を持つフラグメントXD4に含有する、融合タンパクである。表記GST-XD4(V323A, I338A)において、完全な野生型v-Src配列中の位置323を表す、v-SrcフラグメントXD4の配列中の該バリンは、アラニンによって置換されており、該完全な野生型v-Src配列中の位置338を表す、該XD4中のイソロイシンも、アラニンによって置換されている。

以下の実施例に記載するように、本発明を利用して、我々は、v-Srcキナーゼを設計し、作成し、かつその有用性を立証した。該キナーゼは、合成阻害剤に対して高い特異性を示し、一方でチロシン含有ペプチドおよびタンパクに対する、その野生型の特異性を維持し、かくして我々の初期の研究目標を満足する。該キナーゼの超群(superfamily)全体に渡る、該ATP結合サイトの高度に保存された特徴および他のタンパクキナーゼからの構造に関する情報の入手性を利用して、v-Src自体に関する如何なる詳しい構造上の情報をも必要とすること無しに、v-Srcに対する新規な阻害特異性を組み換えによって得ることができた。かくして、我々は、オルソゴナルATP類似体を設計するための青写真として、無関係のキナーゼを使用して、v-srcの該直接的な細胞基質を標識し、また同様な起源の阻害剤を調製したことは、この方法が他のキナーゼに対しても、同様に作用することを立証している。

10

20

30

40

50

実施例

下記の実施例は、本発明を具体的に説明するためのものである。それだけで本発明の範囲を制限するものと解釈してはならない。当業者は、他の多くの実施態様が上記及び請求の範囲の本発明の範囲内に包含することを十分理解するであろう。

実施例1

ATP類縁体の合成

12種類の異なる直交性ATP類縁体を合成した。図2は、それらの構造の図式である。図は、アデノシン三リン酸(ATP)を示し、“X”は6位に結合し、下の枠内の図式は実施例に記載された各直交性ATP類縁体の“X”の場所に用いる12の側鎖を示す(常に太字の数字1-12で表される)。これらの類縁体は下記の通りである。

| | |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1-N ⁶ (メトキシ)ATP | 7-N ⁶ (ピロリジノ)ATP |
| 2-N ⁶ (エトキシ)ATP | 8-N ⁶ (シクロペンチル)ATP |
| 3-N ⁶ (アセチル)ATP | 9-N ⁶ (シクロペンチルオキシ)ATP |
| 4-N ⁶ (i-プロポキシ)ATP | 10-N ⁶ (ピペリジノ)ATP |
| 5-N ⁶ (ベンジル)ATP | 11-N ⁶ (シクロヘキシル)ATP |
| 6-N ⁶ (ベンジルオキシ)ATP | 12-N ⁶ (シクロヘキシルオキシ)ATP |

類縁体1、2、4、6、9及び12をFujiiら(43)の方法に従ってアデノシンから出発して4工程で対応するN¹アルコキシアデニン誘導体のジムロー転位により合成した。類縁体5をN¹ベンジルアデノシン(44)のジムロー転位により同様に合成した。類縁体3は、McLaughlinら(45)に従ってトリメチルシリルエーテルとしてアデノシンヒドロキシル基のその場保護に続いて塩化アセチルで処理することにより調製した。類縁体7、8、10及び11は、6-クロロプリンリボシド(Aldrich)を各々ピロリジン、シクロペンチルアミン、ピペリジン及びシクロヘキシルアミンで処理することにより合成した(46)。

三リン酸の合成は、ピロリン酸の調製を除いてLudwig(47)の方法に従って行った。従って、ビス-トリ-N-ブチルアンモニウムピロリン酸は、1当量のピロリン酸と2当量のトリブチルアミンとを(1:1)の水:エタノール混合液に均一な溶液が得られるまで混合することにより調製した。溶媒を減圧下で除去して乾固し、ピロリン酸をP₂O₅上で一晩保存した。

全ての非放射性ヌクレオチドを¹H-NMR、質量スペクトル分析及び強陰イオン交換(SAX)HPLC(Rainin # 83-E03-ETI)で確認した。

[⁻³²P]N⁶-(シクロペンチル)ATPをHecht & Kozarich(48)の方法に従って合成した。放射性標識類縁体をDEAE(A-25)セファデックス(Pharmacia)カラムクロマトグラフィーで精製し、放射性標識物質をN⁶-(シクロペンチル)ATPの基準試料と共にSAX陰イオン交換HPLCカラム(Rainin)(5~750mMリン酸アンモニウムpH3.9、10分、0.5ml/分)に同時注入することにより三リン酸を同定した。反応液の化学収率は70~80%に変動した。

実施例2

ヌクレオチド類縁体のスクリーニング

既存の細胞キナーゼ(53)が基質として受容しない化合物を同定するために、タンパク質チロシンキナーゼ(13)を多く含むマウスリンパ球溶解物(CF)において合成ATP類縁体のパネルをスクリーニングした。

単離し、5%ウシ胎仔血清(BCS)、1% HEPES及びDNaseI(1 µg/ml)を含有するRPMI-1640培養液で洗浄した脾細胞(プリンストン大学動物施設より生後8~30週の雄と雌のC57/B6マウス)を用いて分析を行った。赤血球を17mMトリス塩化アンモニウムpH7.2で処理することにより4 で溶解した。その細胞をFukazawaら(51)の方法に従って1mM HEPES pH7.4、5mM MgCl₂、ロイペプチン(10 µg/ml)、アプロチニン(10 µg/ml)及び100 µM PMSFに10分間氷上で低浸透的に溶解した。攪拌し、500 × gで遠心分離した後、上清を集めた。細胞を4 で20分間保存して基礎タンパク質リン酸化レベルを減弱させた後に緩衝液を20mM HEPES pH7.4、10mM MgCl₂及び1mM NaFに調整した。次に、パナジン酸ナトリウム(100 µM)を添加してホスホチロシンホスファターゼの活性を阻害した。

各ヌクレオチド三リン酸を5 × 10⁶細胞等価物に最終濃度100 µMまで添加し、37 で5分間でインキュベートした後に細胞溶解物に4 × レミリゲルローディングバッファーを加えて

10

20

30

40

50

反応液を急冷した。タンパク質を12.5% SDS-PAGEで分離し、プロトランBA85(Schleicher-Schuell)に移した。プロットを抗ホスホチロシンクローナル抗体4G10(Upstate Biotechnology)でプローブし、高化学発光(cat.34080 Pierce)に続いてHRP結合ヤギ抗マウス抗体(VWR cat.7101332)で処理することにより製造業者の説明書に従って結合抗体を検出した。結果を図3に示す。マウスリンパ球細胞溶解物(CF)を100 μ MのATP又は A^*TP (1-12)で処理した後のタンパク質チロシンリン酸化レベルを示す抗ホスホチロシンタンパク質イムノプロットである。使用した細胞溶解物は、チロシンキナーゼSrc、Fyn、Lck、Lyn、Yes、Fgr、Hck、Zap、Syk、Btk、Blk、及びB及びTリンパ球、マクロファージ及び濾胞樹枝状細胞(13)が含まれる。分子サイズ標準(キロダルトン)を示す。最少の N^6 置換基、1(メトキシ)、2(エトキシ)及び3(アセチル)を含む A^*TP は細胞チロシンキナーゼ基質として働く能力を示した(レーン3-5)。 N^6 置換基、4(*i*-プロポキシ)、5(ベンジル)及び6(ベンジルオキシ)、及び環状脂肪族置換基を含む全ての類縁体(7~12)は、ほとんど又は全くリン酸化を示さなかった(図3、レーン6-8、11-16)。 A^*DP 及びATPを得る直交性 A^*TP (7-12)と細胞ADPとの起こりうるメタセシスを試験するために、1mM ADPを図3に示されるものと同じ細胞溶解物キナーゼ反応液に加えた；(データは示されていない)；リンタンパク質のパターンは同じであり、 A^*TP の有意なメタセシスは完全な細胞溶解物系に生じないことが示された。これらの結果に基づいて、類縁体(7~12)は野生型チロシンキナーゼの“死んだ基質”であると思われる。即ち、野生型基質はリン酸供与基質としてのこれらをほとんど又は全く受容しない。従って、これらの類縁体は、v-Srcのヌクレオチド結合を再操作する最も好ましい標的として使用される。

実施例3

突然変異v-Srcの設計

不活性キナーゼのいくつかの構造は解析されているが、チロシンキナーゼの活性コンホメーションの結晶構造は解析されていない(54、55)。しかしながら、触媒活性ser/thrキナーゼの2つの結晶構造は解析されている(56、57)。双方のキナーゼファミリー(cAMP依存性キナーゼのK72、v-SrcのK295)(58、58)中の同じ触媒活性リシン残基を親和性標識することにより示されるようにser/thrとチロシンキナーゼ触媒ドメイン間に高程度の機能相同性がある。PKA(56)とサイクリン依存性キナーゼ-2(CDK2)-サイクリンA(7)結晶構造から結合ATPの N^6 アミノ基の4 範囲内に2つのアミノ酸側鎖：V104/M120(PKA)及びV64/F80(CDK2)(60)が示された。

図4は、ATPに結合するcAMP依存性タンパク質キナーゼ(PKA)のATP結合部位を示すクローズアップ図である。ATPの N^6 アミノの4 範囲内に3つの残基(Val104、Met120及びGlu121)と触媒に不可欠なリシン残基(Lys72)が球と棒の形に示されている。タンパク質の残りは、リボンの形に示されている。この図は、ラスター3Dを与えるプログラムにモルスクリプト出力を加えることによりつくった(68、69)。このモデルにおいては、Glu121の側鎖がアデニン環結合領域から離れるのでGlu121は修飾の候補ではなかったことに留意されたい。PKA(配列番号1)、CDK2(配列番号2)、及びv-Src(配列番号3)のATP結合領域の配列アラインメントを下に示す。太字で示した残基は、キナーゼ結合ATPの N^6 アミノ基の5 範囲内に側鎖を有するアミノ酸に対応する。

サブドメイン

PKA(配列番号1)(99)NFPFLVKLEFSFKDNSNLYMVMEYVPG(125)

CDK2(配列番号2)(59)NHPNIVKLLDVIHTENKLYLVFEFLHQ(85)

v-Src(配列番号3)(318)RHEKLVQLYAVVSE-EPIYIVIEYMSK(343)

上記キナーゼ間の機能類似性に基づいて、PKAのV104/M120及びCDK2のV64/F80に対応するv-Src触媒ドメイン内の位置V323とI338を突然変異することに決定した。これらの残基をアラニンに突然変異することにより、更にv-Srcのヌクレオチド結合部位に“ポケット”をつくって好ましい直交性 A^*TP (4~12)の1種の結合を可能にすることが望まれる。

実施例4

突然変異体の合成、発現及び精製

突然変異体(V323A、I338A)を下記のように作成した。v-Src触媒ドメインの野生型と二重

10

20

30

40

50

アラニン変異体(XD4断片)を共にグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質(GST-XD4)(61、62)として作成した。下記の実施例に記載される内在チロシンキナーゼを欠くことから良好な発現宿主である大腸菌中でこれらを作成した。無傷SH1触媒ドメインを含むが非触媒SH3及びSH2調節ドメインを欠き、全長v-Srcより比活性が高いことからv-SrcのXD4断片を用いた。

オーバーラップ拡張PCRを用いてGST-XD4(V323A、I338A)(49)を作成した。Pfuポリメラーゼ(Stratagene)を製造業者のプロトコールに従ってPCR反応に用いた。6個の合成オリゴヌクレオチドを用いた。

配列番号4(5'-TTTGGATCCATGGGGAGTAGCAAGAGCAAG),

配列番号5(5'-TTTGAATTCCTACTCAGCGACCTCCAACAC),

配列番号6(5'-TGAGAAGCTGGCTCAACTGTACGCAG),

配列番号7(5'-CTGCGTACAGTTGAGCCAGCTTCTCA),

配列番号8(5'-CTACATCGTCGCTGAGTACATGAG),

配列番号9(5'-CTCATGTACTCAGCGACGATGTAG)。

プライマー配列番号4はBamHI部位を含み、プライマー配列番号5はEcoRI部位を含む(イタリック体で示されている)。プライマー配列番号6と配列番号7は、V323A突然変異を導入するヌクレオチド配列変化を含む(突然変異をコードしているヌクレオチドは太字で示されている)。プライマー配列番号8と配列番号9は、I338Aミスマッチを含む。

YEp51-XD4プラスミド(タフツメディカルスクールのB. Cochranからの寄贈)由来のXD4遺伝子をプライマー配列番号4と配列番号5で増幅した。PCR産物をBamHIとEcoRIで消化し、BamHI及びEcoRI消化pGEX-KTに結合してからE. coli株DH5 に形質転換した。

プライマー配列番号、配列番号5、配列番号6及び配列番号7を鋳型としてのGST-XD4プラスミドと共に用いてGST-XD4(V323A)を構築した。2段階方法からのPCR産物をBamHIとEcoRIで消化し、BamHI及びEcoRI消化pGEX-KTに結合し、DH5 E. coli細胞に形成転換した。プライマー配列番号8と配列番号9を鋳型としてのGST-XD4(V323A)と共に用いて同様の方法でGST-XD4(V323A、I338A)を作成した。

GST融合キナーゼの発現及び精製は、細胞を4 で一晩保存した後に遠心分離しフレンチプレスで溶解する以外はXuら(50)に記載されたE. coli株DH5 中で行った(一晩保存することは高度に活性なキナーゼを生産するために不可欠である)。

Sf9昆虫細胞における6-His-Xd4と6-His-XD4(V323A、I338A)の発現は、ライフテクノロジーBAC-to-BACシステムを用いて達成した。概要としては、6-His-XD4と6-His-XD4(V323A、I338A)遺伝子を鋳型として対応するpGEXベクターをプライマー配列番号4と配列番号5と共に用いてPCRにより作成し、続いてBamHIとEcoRIで消化した。得られたPCR断片をBamHIとEcoRIで消化したpFASTBACの中へクローン化した。HB10BAC細胞の形質転換、次のXD4又はXD4(V323A、I338A)を含むBacmidによるSf9細胞のトランスフェクションは、製造業者によって示されるように行った。

ここで行われた代替的方法においては、pGEX-v-Srcベクター(4)由来のv-src遺伝子をNIH 3T3細胞において高レベルの発現のためのプロモーターを含むpBabeベクター(5)の中へクローン化することによりv-src又はv-src(I338G)突然変異キナーゼのトランスフェクションを行った。pBabev-Src(I338G)プラスミドをウイルスパッケージング細胞系BOSC 23(6)にトランスフェクションし、(6)に記載されたように2日後にウイルス粒子を収集した。NIH 3T3細胞に(7)に記載されたようにウイルス粒子を感染し、(5)に記載されたようにピュロマイシン含有培養液に安定なトランスフェクタントを選択した。安定なトランスフェクタントをピュロマイシンを含む培養液中で維持してv-Srcの発現のロスを行わせなかった。

最終結果を図1に示す。Src相同3、2及び1(SH3、SH2及びSH1)を含むv-Srcのドメイン構造を示す図であり、ドメイン境界は枠をした各ドメインの上に示されたアミノ酸残基数によって示した。XD4のドメイン構造も示され、残基77-225の欠失を含む(77-225)。XD4(v-Srcからの番号)とのグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合物、及び二重に突然変異したGST-XD4(V323A、I338A及びI338Gと共に示している)のドメイン構築も概略図で示す。

10

20

30

40

50

実施例5

突然変異v-Srcについて直交性ATP類縁体を結合する能力を試験する

次に、各ATP結合部位に結合する能力の尺度である、 $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ によるRR-Srcの野生型及び突然変異キナーゼリン酸化を微分阻害する N^6 置換ATP類縁体(1~12)の能力を評価した。50mMトリス、10mM MgCl_2 、1.6mMグルタチオン、1mg/ml BSA、GST-XD4(100nM)又はGST-XD4(V323A、I338A)(100nM)を含む1mM RR-Srcペプチド及び $10\mu\text{M}$ $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (100cpm/pmol)[D upont NEN]を含むpH8.0の最終容量30 μl の緩衝液中37℃で3回の実験で分析を行った。冷却ATP又は A^*TP 類縁体(100 μM)(1~12)を加えた後にキナーゼを加えた。30分後、25 μl の反応容量をp81ホスホセルロースディスク(Whatman)上にスポットすることにより反応液を急冷し、これらを250mlの10%酢酸に>30分間浸漬し、続いて標準法(52)に従って洗浄及びシンチレーション計数を行った。

結果を図1に示す。GST-XD4の相対的阻害は黒いバーで示され、GST-XD4(V323A、I338A)による相対的阻害は対角線の黒いバーで示される。阻害% $(1 - v_1/v_0)$ は、 v_1 (100 μM の指定した三リン酸及び $10\mu\text{M}$ $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000cpm/pmol)の存在下のcpm)/ v_0 ($10\mu\text{M}$ $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000cpm/pmol)のみ-ホスホセルロースディスクに結合する非特異的 $10\mu\text{M}$ $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ に基づくバックグラウンドcpm(<0.1%の全入力カウント)の比として示される。S.D.を示す誤差バーは、3種類の複製物を用いた4回の別個の実験により求めた。

野生型キナーゼGST-XD4は、リンパ球キナーゼ分析(図3)から予想されるようにほとんどの A^*TP 類縁体(図6、黒いバー)に対して結合親和性が不十分であった。対照的に、二重に突然変異したGST-XD4(V323A、I338A)は立体を必要とする N^6 置換ATP類縁体(図6、斜線バー)により優れた阻害を示す。最も顕著には、GST-XD4(V323A、I338A)変異体はATP類縁体5、8、9及び11によって ^{32}P -ATPによるRR-Srcのリン酸化がほとんど阻害され、野生型キナーゼ、GST-XD4は天然基質ATPによって ^{32}P -ATPによるRR-Srcのリン酸化が阻害される。GST-XD4(V323A、I338A)及び全長GST-v-Src((V323A、I338A)は A^*TP (1~12)と同じ阻害パターンを示すことが確認された(データは示されていない)。

野生型キナーゼ特異性(図3)のスクリーンに確認した9種の“死んだ”基質のうち4種は、突然変異キナーゼに十分に結合する。野生型キナーゼによって受容されない突然変異v-Srcの新規な基質を同定する点でこの高い成功率は、v-Srcヌクレオチド結合部位の重要な特徴、即ち、ATPの N^6 アミノ基の周りに密接に適合する残基を同定したことを示している。v-SrcのI338(PKAの120位)に対応する位置にアラニンを含む野生型タンパク質キナーゼでないことについて知っていることは注目すべきことである。この位置に立体的に必要とするアミノ酸側鎖がキナーゼの特異性を求めるのに重要な役割を果たす場合には、ここに記載されたものと非常に似た方法を用いて直交性基質を受容するように操作することが十分可能でなければならない、かかる操作したキナーゼは十分本発明の範囲内である。

実施例6

最適な直交性ATP類縁体による突然変異v-Srcの触媒効率を求める

類縁体8が野生型キナーゼ(図3、レーン12)でわずかに低いレベルのリン酸化を示したことから他の3種のATP類縁体5、9及び11について野生型GST-XD4とGST-XD4((V323A、I338A)変異体双方の触媒的にコンピネントな基質として働く N^6 -(シクロペンチル)ATP、8の能力を試験することが選ばれた。

GST-XD4((V323A、I338A)及びGST-XD4によるATP及び N^6 -(シクロペンチル)ATP依存性RR-Srcリン酸化(1mM)を3回の実験において低基質転化率(<5%)で行った。速度データ(64)のラインウィーバー・バークプロットの分析によって速度定数を求めた。50mMトリス、10mM MgCl_2 、1.6mMグルタチオン、1mg/ml BSA、GST-XD4(100nM)か又はGST-XD4(V323A、I338A)(100nM)を含む1mM RR-Srcペプチド及び指定した $10\mu\text{M}$ $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000cpm/pmol)又は $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6$ -(シクロペンチル)ATP(5000cpm/pmol)を含むpH8.0の最終容量30 μl の緩衝液中37℃で3回の実験で分析を行った。

表 1

リン酸供与基質の速度論

| ヌクレオチド | GST-XD4 | | GST-XD4(V323A、I338A) | | | |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|
| | K_{cat} | K_M | K_{cat}/K_M | K_{cat} | K_M | K_{cat}/K_M |
| | (min^{-1}) | (μM) | ($\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$) | (min^{-1}) | (μM) | ($\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$) |
| ATP | 2 ± 0.5 | 12 ± 3 | 1.6×10^5 | 0.8 ± 0.2 | 150 ± 20 | 5.3×10^3 |
| N^6 -(シクロ ペンチル)ATP | | $2000(K_i)$ | $(5 \pm 2) \times 10^{-2}$ | | 15 ± 3 | 3.3×10^3 |

上記表1に示されるように、野生型キナーゼGST-XD4は[$^{-32}\text{P}]\text{N}^6$ -(シクロペンチル)ATPでRR-Srcペプチドをほとんどリン酸化せず、この類縁体が野生型キナーゼの重要な基質でないという我々の前の所見が確認された。対照的に、GST-XD4(V323A、I338A)は、直交性ATP、[$^{-32}\text{P}]\text{N}^6$ -(シクロペンチル)ATPでミカエリス・メンテン速度論を示した。直交性基質に対する変異体の K_M は、ATPに対するGST-XD4の K_M に非常に近かった。一方、変異体のATPに対する K_M は、GST-XD4のATPに対する K_M の10倍を超える。

相対する基質に対する触媒を位置付けるために用いられるパラメーターは、ミカエリス・メンテン定数 K_{cat}/K_M に対する代謝回転数の比(“特異性定数”)(64)である。直交性基質[$^{-32}\text{P}]\text{N}^6$ -(シクロペンチル)ATPによる操作した突然変異GST-XD4(V323A、I338A)の K_{cat}/K_M は、天然基質による野生型キナーゼの K_{cat}/K_M 値のわずか1/50である。野生型に比した場合にATPによる突然変異キナーゼの低い触媒効率と相まって直交性ATP基質によるこの触媒効率は上記2つの設計基準を満たしている。

GST-XD4が自己リン酸化のリン酸化供与体としてこの類縁体を全く用いることができないことが明らかであるように；これは図5・レーン3に示されている、新規な基質、[$^{-32}\text{P}]\text{N}^6$ -(シクロペンチル)ATPが野生型GST-XD4によってほとんど用いられないことは重要である。図5・は、GST-XD4の[$^{-32}\text{P}]\text{ATP}$ 依存性自己リン酸化、レーン1、又はGST-XD4(V323A、I338A)、レーン2；及びGST-XD4の[$^{-32}\text{P}]\text{N}^6$ -(シクロペンチル)ATP依存性リン酸化、レーン3、又はGST-XD4(V323A、I338A)リン酸化、レーン4を示すオートラジオグラムである。GST-XD4に対照的に、操作したキナーゼは[$^{-32}\text{P}]\text{N}^6$ -(シクロペンチル)ATPで効率よく自己リン酸化される(図5(c)、レーン4)。

実施例7

タンパク質基質特異性の保持を確認する

下記の表2に示されるように、野生型GST-XD4キナーゼは、v-Srcの十分に確認されたペプチド基質、RR-Srcを文献と一致した速度論でリン酸化することがわかった。これにより、配列操作はタンパク質基質に対して酵素の触媒活性にほとんど影響しなかったことが示される。

表2

タンパク質基質 RR-Src の速度論

| | GST-XD4 | GST-XD4(V323A、I338A) |
|---------------------|---------------|----------------------|
| ヌクレオチド K_M (mM) | | K_M (mM) |
| (飽和) | | |
| ATP | 2.6 ± 0.9 | 3.1 ± 0.9 |
| N6-(シクロ ペンチル)ATP | ----- | 2.1 ± 0.9 |

10

50mM トリス、10mM $MgCl_2$ 、1.6mM グルタチオン、1mg/ml BSA、GST-XD4(100nM)か又はGST-XD4(V323A、I338A)(100nM)を含む1mM RR-Srcペプチド及び $10 \mu M$ [$-^{32}P$]ATP(1000cpm/pmol)[Dupont NEN]を含むpH8.0の最終容量30 μ lの緩衝液中37℃で3回の実験でRR-SrcのGST-XD4及びSGT-XD4(V323A、I338A)リン酸化の分析を行った。

アラニン突然変異はタンパク質基質特異性に対して影響するかを求めるために、RR-Srcペプチドの野生型及び突然変異融合タンパク質双方の K_M を測定した。[$-^{32}P$]ATPの飽和濃度で、野生型及び突然変異体はRR-Srcの実質的に同じ K_M 、各々 2.6 ± 0.9 mM及び 3.1 ± 0.9 mM(63)を示す。更に、直交性基質の飽和量の存在下にタンパク質基質の変異体の K_M は、実質的に同じ、 2.1 ± 0.9 mMであった。これらの知見から隣接のホスホアクセプター結合部位に近接するATP結合ポケットのアラニン突然変異はタンパク質標的特異性に影響しないことが示される。

20

これを支持して、操作したキナーゼは各々がSf9昆虫細胞中で発現される場合に野生型XD4によってリン酸化される幅広い同じ設定のタンパク質をリン酸化する。これを図5(a)に示す。6-His-XD4、レーン2又は6-His-XD4(V323A、I338A)、レーン3を発現するSf9昆虫細胞からの細胞溶解物(10^8 細胞等価物/レーン)の抗ホスホチロシンタンパク質プロットを示す。実施例2のプロットと同様の手順を用いて0.1%トリトン-X-100、50mM トリス、pH8.0を含む緩衝液中で 10^6 細胞の溶解後にこれらのプロットを行った。

30

Sf9昆虫細胞系は、これらの細胞が哺乳動物細胞に見られるものと活性がより似ているキナーゼを生じるタンパク質に転写後修飾を行うことが必要な同じ機構のほとんどを含むことから少量のチロシンキナーゼを発現する良好な宿主である。更に、図5(a)、レーン1に示されるように感染していないSf9細胞は内在チロシンキナーゼ活性を欠くので、図5(a)のレーン2及び3のホスホチロシン含有タンパク質は発現した6-His-XD4又は6-His-XD4キナーゼの基質である。具体的なタンパク質のリン酸化レベルの小さな差は野生型キナーゼに比べて突然変異XD4(V323A、I338A)の触媒活性が低いことによるものであると我々は考える。

纏めると、これらのデータから操作したキナーゼのペプチド特異性は野生型v-Srcとほとんど同じであることが示される。

40

実施例8

操作したキナーゼは好ましい直交性基質を受容するが、野生型キナーゼはほとんど受容しないことを確認する

本実験の最後の目標は、合成基質類縁体に特異的な突然変異キナーゼを用いて全細胞又は細胞溶解物中の直接タンパク質基質を標識することである。このために、ser/thr特異的キナーゼを含む野生型キナーゼ(全てのホスホアミノ酸の0.03%だけがチロシンであるように細胞リン酸化の大部分を行う)(65)がほとんど合成基質を受容しないことが好ましい。[$-^{32}P$]N⁶-(シクロペンチル)ATPが全ての野生型細胞キナーゼに対して実質的に“死んだ基質”であることを確かめるために、[$-^{32}P$]ATP又は[$-^{32}P$]N⁶-(シクロペンチル)AT

50

Pとの試験管内キナーゼ反応はマウスリンパ球溶解物で行った。

放射性標識[^{-32}P]ATP又は[^{-32}P]N⁶-(シクロペンチル)ATP(5000cpm/pmol)を 5×10^6 細胞等価物による最終濃度100 μM まで添加し、37℃で10分間インキュベートしてから4 \times レミリゲルローディングバッファーを細胞溶解物に添加して反応液を急冷したものをを用いることを除いて実施例2に示された方法と同様の方法でこれらの分析を行った。タンパク質を12.5% SDS-PAGEで分離した。ゲルを10%酢酸、10%イソプロパノールに1時間浸漬した後、ゲルドライヤーで乾燥し、バイオマックスMS膜(Kodak # 111-1681)に1時間暴露した。結果を図5(b)に示す。[^{-32}P]ATP、レーン1又は[^{-32}P]N⁶-(シクロペンチル)ATP、レーン2による低浸透的に溶解したマウスリンパ球のリン酸化レベルを示すオートラジオグラムである。[^{-32}P]N⁶-(シクロペンチル)ATPの添加後の細胞溶解物に放射性リンタンパク質がなく、全ての野生型タンパク質キナーゼに対してN⁶-(シクロペンチル)ATPの直交性の真の性質が確認される。新たに単離したマウスリンパ球の代わりに[^{-32}P]ATP又は[^{-32}P]N⁶-(シクロペンチル)ATP及びNIH 3T3細胞溶解物との試験管内キナーゼ反応を用いた場合に同じ結果が見られた(示されていない)。

10

原則として、他の全ての細胞キナーゼの存在下にタンパク質キナーゼの活性を行う能力は具体的な細胞型における直接キナーゼ標的の同定を可能にする。これを達成するために、現在、我々は膜浸透化処理(66)と細胞透過性のATPを用いて[^{-32}P]ATPを細胞に導入している(67)。

実施例9

単一突然変異v-Src変異体の構築と分析

20

単一突然変異がN⁶-(シクロペンチル)ATPを基質として効率よく用いることを十分可能にするかを求めるために、実施例4にと同様の方法を用いて3種のv-Src由来変異体を更に調製した。しかしながら、338位に単一突然変異のみ有した。また、GST-XD4融合タンパク質として発現した。次に、これらの突然変異GST-XD4(I338A)、GST-XD4(I338S)及びGST-XD4(I338G)を実施例8に記載されるように試験した。

結果を図7に示す。図7の左上に示されたゲルレーンは、338位にアラニンを含む変異体と同じ位置にセリンを含む変異体より容易に天然基質、ATPを用いることができたことを示している。図7の左下に示されるゲルレーンは、338位にアラニンを含む変異体とその位置にグリシンを含む変異体より基質としてATPを用いるほうがよいことを示している。

図7の右側のパネルは、より興味深いストリーを知らせている。右上のパネルからは、338位にセリンを有する変異体がほとんどN⁶-(シクロペンチル)ATPを用いることができないこと及びその位置にアラニンを有する変異体であることが明らかである。しかしながら、下のパネルは、338位にグリシンを有する変異体とその位置にアラニンを含む変異体より基質としてN⁶-(シクロペンチル)ATPを用いる方がよいことを示している。

30

これらの結果は、最も有望である。単一突然変異はこの直交性基質の使用を十分可能にすると思われる。特に、338位にグリシンを含む変異体はこれまで作製した最良の操作したv-Src変異体であると思われる。

更に、グリシン置換がここで実験することは非常に驚くべきことである。一般的には、グリシン置換は、酵素構造にあまり多くの可撓性を導入するので所望の成果に悪影響を及ぼすことからかかる状態で実験することは予想されない。

40

実施例11

v-Src基質を同定する

v-Src基質を同定する実験法の概略を図8に示す。GST-XD4(V323A、I338A)のような操作したv-Srcを[^{-32}P]N⁶-(シクロペンチル)ATPのような放射性標識した直交性基質と共に細胞抽出液又は透過性を上げた細胞に加える。典型的には、これは3回の実験で行われる。インキュベートした後、細胞を溶解(まだ溶解していない場合)、得られた試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。ゲルから取り抗ホスホチロシンで標識したウェスタンブロットは、試料中の全てのリン酸化タンパク質を示し、ゲルのオートラジオグラムからv-Srcによりリン酸化されたことが示される。

実施例12

50

阻害剤の合成

最初の6種の阻害剤のピラゾロピリマジン骨格を図11Aに示す。“R”位置にフェニル基をもつ4-アミノ-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、化合物1(図10に示されるPP1と同じ構造であるがフェニル環にパラメチル基を含まない)の合成をHanefeldら(76)の方法に従って行った。“R”位置に各々シクロブトイル、シクロペントイル、シクロヘキソイル、ベンゾイル、及び2-フロイル置換基をもつ化合物2~6(図11B)は、1を各々塩化シクロブトイル、塩化シクロペントイル、塩化シクロヘキソイル、塩化ベンゾイル、又は塩化フロイルで乾燥ピリジン中室温で1時間処理することにより合成した。各置換基の構造を図11Bに示す。シリカゲルクロマトグラフィーで精製して純粋な生成物を収率16~84%で得た。化合物1~6を¹H-NMRと質量スペクトル法で確認した。

10

実施例13

野生型キナーゼに対して直交性の阻害剤のスクリーニング

既存の細胞キナーゼを阻害しない化合物を同定するために、Shahら(79)に記載されたキナーゼ活性の放射性標識トレーサーとして[⁻³²P]ATPを用いたペプチドリン酸化分析において2つの密接に関連した精製チロシンキナーゼ、v-Src及びFynに対して合成ピラゾロピラミジン類縁体(1~6)のパネルをスクリーニングした。

結果から、化合物2~6の各々のIC₅₀値がSrcの阻害に対して400μMを超えことがわかり、化合物3及び5は野生型Fynの阻害に対して400μMを超えるIC₅₀値で示され、これらの類縁体(2及び5)は代表的な野生型キナーゼに直交性である(阻害しない)ことが示された。

実施例14~16

20

従来の遺伝子及び生化学法を用いてタンパク質キナーゼシグナリング経路を解析することは、密接に関連したキナーゼの圧倒的多数のために難しかった。各個々のキナーゼの細胞透過性阻害剤が設計された場合には、各タンパク質キナーゼ役割は系統的に評価される。結果：がん遺伝子タンパク質チロシンキナーゼ、v-Srcの最初のユニークな特異的細胞透過性阻害剤を開発するために化学及び遺伝学を合わせた方法を考えた。機能的なサイレント活性部位突然変異をv-Srcにつくり他の全ての細胞キナーゼから区別した。野生型キナーゼを阻害しないこの突然変異キナーゼの強固に結合している(IC₅₀=430nM)細胞を設計し合成した。試験管内及び全細胞分析により突然変異v-Src/阻害剤対のユニークな特異性が確立された。この阻害剤は操作したv-Srcの細胞発現の形質転換作用を逆転するが、野生型v-Src仲介細胞形質転換を破壊しない。これらの細胞系は単一のタンパク質キナーゼ中単一アミノ酸によってのみ異なり、細胞シグナリングの劇的な変化は操作したキナーゼの特異的阻害に直接起因するものであることが確立された。対応するサイレント突然変異を含む他のチロシンキナーゼ、Fynを操作することによりこの方法の一般性を試験した。同じ化合物もこの突然変異キナーゼの強力な阻害剤(IC₅₀=830nM)であることがわかり、多重チロシンキナーゼの対立遺伝子特異的阻害剤を作成する戦略の一般性が確認された。

30

結論：個々のSrcファミリーキナーゼの対立遺伝子細胞透過性阻害剤は化学と遺伝学を合わせた方法を用いて迅速に開発される。突然変異v-Src形質転換NIH 3T3線維芽細胞をユニークな特異的v-Srcで処理すると形質転換の形態学的特徴が戻る。阻害剤は、野生型v-Src対立遺伝子によって形質転換された細胞に対して効果を示さず、阻害剤処理によって誘導された表現型が単一阻害因子の結果であることが強く示される。一般的な方法でキナーゼ特異的阻害剤を迅速に生成する能力は、キナーゼ仲介細胞経路の解析及び試験管内及び生体内双方の薬剤発見の良好な標的として新規なキナーゼを確証するのに有効である。

40

前述のように、合理的に設計された小分子阻害剤によってユニークに阻害される“化学感受性”突然変異キナーゼの生成を可能にする化学と遺伝学を合わせた戦略が考えられた。我々の方法は機能的サイレント突然変異で問題のキナーゼの活性部位にユニークなポケットを操作することを含む。次に、操作したキナーゼの特異的阻害剤は、新規な活性部位ポケットに適合するように設計された嵩のある基を含む既知のキナーゼ阻害剤を誘導体化することにより合成される。嵩のある基は、野生型キナーゼの阻害剤の効力を失わせる。従って、成功した相補的設計により、操作したキナーゼ/阻害剤複合体においてのみ可能な好ましい結合相互作用がもたらされる。操作したキナーゼをコードしている遺伝子で細胞

50

をトランスフェクションすると1種のキナーゼのみが設計した阻害剤によって遮断される細胞を生成する(図14参照)。

重要なことに、突然変異キナーゼが野生型キナーゼと同じ機能を働くので、変異体の阻害剤は非トランスフェクション細胞において野生型の選択的阻害剤と同様の方法で細胞シグナリングに影響する。タンパク質キナーゼの選択的阻害後に細胞の表現型を見出す能力は、シグナル形質導入カスケードにおける個々のキナーゼのユニークな役割を求める迅速な方法を与える。

細胞機能を仲介するのに偏在する重要性のために阻害剤設計に特異的なsrcファミリータンパク質チロシンキナーゼを標的にした。激しい研究にもかかわらず、個々のsrcファミリー部分の役割は細胞同時局在及び高配列同一性のために評価することが難しかった。srcファミリーキナーゼの強力な阻害剤は既知であるが、密接に関連した酵素間で効果的に区別することができる(1つのsrcファミリー部分に対して20倍の選択性)分子は同定されなかった。

2種の機能的に重要なsrcキナーゼ、v-Src及びFynを突然変異キナーゼ/阻害剤設計の主要な標的として選んだ。Srcキナーゼは乳がん、肺がん及び結腸がんのがん遺伝子を含むことから主導的な薬剤標的として出てきた。v-Srcはがん遺伝子のチロシンキナーゼの表現型であるが、このキナーゼに対して高度に選択的な小分子阻害剤は発見されていない。Fynは、T細胞レセプター仲介リンパ球活性化に重要なsrcファミリーチロシンキナーゼである。SrcとFynは、類似のドメイン構造を共有し、触媒ドメインにおいて約85%のアミノ酸同一性を有する。srcファミリー部分の密接な構造関係は、高度な相同なキナーゼ間の酵素/阻害剤特異性を操作する能力の理想的な試験を与える。細胞透過性阻害剤を用いて密接に関係したsrc部分間で区別することができる場合には、他のタンパク質キナーゼファミリーの部分に対する特異性が類似の方法を用いて達成されると思われる。

結果及び検討

酵素操作

新規なATP特異性を有するキナーゼを操作する我々の前の努力から、キナーゼのホスホアクセプター特異性又は生物学的機能を修飾せずにグリシンに突然変異されるv-Src(Ile338)のATP結合ポケットの機能的保存残基が同定された。スペースを生じる突然変異は、 k_{cat} の適度な低下、ATPの K_m の適度な増加のみ生じ、線維芽細胞形質転換レベルの定量的変化を引き起こさない(Shanh K、未発表の結果)。突然変異v-Srcの生物学的基質は変化せず、I338G v-Srcは野生型v-Srcと同じ生物学的機能を行う。ATP結合タンパク質キナーゼの全ての結晶構造により338(Srcの番号)に対応する残基とATP間の密接な接触相互作用が示された。タンパク質キナーゼ配列アラインメントの分析により、全ての既知の真核タンパク質キナーゼにおいて嵩のある側鎖(通常、Thr、Ile、Leu、Met、又はPhe)を含むことが確認された。従って、338位のグリシンの突然変異は、野生型キナーゼに存在しない新規なポケットをつくらねばならない。増大したATP結合部位のために、グリシン突然変異キナーゼは野生型キナーゼを結合しない嵩のある阻害剤を受容しなければならない。標準法を用いて前述のWT及びI338G v-Src触媒ドメインのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質がクローン化、発現及び精製された。WT Fyn、T339G Fyn(Srcの番号)、及びWT Ab1もGST融合タンパク質として発現及び精製された。

阻害剤の設計及び合成

我々の基本的な設計戦略を試験するために、WT v-SrcよりI338G v-Srcの選択的に阻害するN-6置換アデノシン分子の以前に合成したパネルに対してWT及びI338G v-Src SH1ドメインがスクリーニングされた。アデノシンは単にsrcファミリーチロシンキナーゼの適度な阻害剤であることから、操作したキナーゼの強力な阻害剤を発見することは予想されなかった。予想したように、N-6アデノシン類縁体の全てがWT v-Srcより強力にI338G v-Srcを阻害した(データは示されていない)。このスクリーンに見られる最も強力な阻害剤は50%阻害濃度がI338G v-Srcに対して1mMのN-6シクロペンチルオキシアデノシン(1、図15a)であった。選択性を試験する次の実験により、WT v-Src又はFynの検出可能な試験管内阻害を400mMまでの濃度で示さないことが証明された。この最初のスクリーニングは、我々の

10

20

30

40

50

設計が従来の阻害剤発見の主要な問題点である選択性バリアーを容易に克服させることができたのでI338G v-Srcの新規な阻害剤を開発するという戦略を追及するように我々を激励した。

阻害剤としてアデノシン類縁体は、多くの細胞機能がアデノシンとアデノシンを結合する多くの細胞タンパク質によって行われることから理想的ではない。N-6アデノシン類縁体は、アデノシンレセプター作動体及び拮抗体として作用することがわかっており、ヌクレオシドキナーゼの基質として作用するN-6アデノシン類縁体を想像することができる。このために生物学的に既知の分子の直接類縁体でない既知のチロシンキナーゼ阻害剤の種類を調べた。我々の設計戦略は、多重野生型キナーゼの強力な阻害を示しかつ容易に合成されるコア構造を求めた。また、酵素活性部位における分子の結合配向は既知であるか容易に予想できなければならない。更に、分子はIle338を示す部位が容易に修飾される方法で結合しなければならない。コア阻害剤構造として4-アミノ-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(2、図15b)を使用した。この分子は、強力なsrcファミリーキナーゼ阻害剤としてHankeと共同研究者によって報告された4-アミノ-1-tert-ブチル-3-(p-メチルフェニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(PP1)の誘導体である。一般キナーゼ阻害剤、クエルセチン(5、図16)に結合したsrcファミリーキナーゼ、Hckの同時結晶構造に基づいて、2がATPと同様のコンホメーションでsrcファミリーキナーゼに結合すると我々は仮定した。Hck中の2の予想した結合配向は、ATP PNP(6)とクエルセチン(図16b)の既知のHck同時結晶構造を重ねて示されている。このコンホメーションにおいては、2の容易に誘導可能なN-4位がAPTのN-6(残基338と密接に接触、図16c)に対応し、tert-ブチル部分はATPのリボースにほぼ対応する。この配向において、2のC-3フェニル環がHck/クエルセチン同時結晶構造に見られるようにATPのN-7を取り囲むポケットに結合することができると我々は仮定した。この分析により2のN-4誘導体化類縁体の小さなパネルを合成することが導かれた。

ユニークな選択的阻害剤の同定

ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンのパネルをWT及びI338G v-Srcキナーゼに対してスクリーニングした(図13参照)。類縁体の全てが野生型に比べて操作したv-Srcの良好な阻害剤であり、キナーゼ活性部位における2の結合配向の我々の予測が確認された。2のN-4位での誘導体はWT v-Srcに対する阻害活性を破壊する(溶解度の限界、300mMで阻害が検出できない)。10種全ての類縁体は、I338G v-Srcの測定可能な阻害を示し、数種の化合物の IC_{50} は低mM範囲である。N-4-(p-tert-ブチル)ベンゾイル類縁体(3g)は、パネル中最も強力なI338G v-Src阻害剤である($IC_{50}=430nm$)。この分子は300mMでWT v-Srcの阻害を示さず、3gが野生型に比べて突然変異v-Srcの少なくとも1000倍良好な阻害剤であることが示される。I338G v-Src活性部位にマイクロモル未満の効力を得ることを必要とする誘導体化の大きなサイズはどちらかといえば予想しなかった。ATP結合部位から4個の炭素原子だけを除去し、11個の炭素原子を有する親分子を誘導体化した。この違いは、我々の結合予想が不十分であることによるものである。また、Ile Glyの突然変異は酵素活性部位に対して大きな可撓性を与え、突然変異キナーゼが予想されたものよりも大きな阻害剤類縁体を受容することを可能にする。3gがATP結合部位でI338G v-Srcを阻害することを確認するために、種々のATP濃度での阻害速度論を調べた。ラインウィーバー・パーク分析により、3gがATPに対して競合的にI338G v-Srcを阻害定数(K_i)が約400nMで阻害することが確認された(データは示されていない)。

次に、このキナーゼと交差反応する可能性を調べるためにWT Fynに対する阻害剤類縁体のパネルをスクリーニングした。発表された親分子、PP1及びPP2が非常に強力な(低nM)Fyn阻害剤であることから野生型キナーゼの“悪い例”の対照として使用した。10種の類縁体の多くは、標的キナーゼに高選択性を示さなかった(図13参照)。飽和環系を有するN-アシル類縁体(3a~3c)は野生型Fynを効果的に阻害する。N-メチレン化合物(4b、4d、4e)はWT Fynに十分直交性であるが操作したv-Srcの適度な阻害には不十分である。重要なことに、3g、突然変異v-Srcの最も強力な阻害剤はWT Fynを非常に弱く阻害した($IC_{50}=300mM$)。従って、3gはWT Fynより操作したv-Srcを700倍を超えて効果的に阻害し、分子を最も結合す

10

20

30

40

50

ることができる野生型細胞キナーゼであると思われる。

他の非srcファミリーキナーゼが試験管内で3gによって偶然に阻害されるかを試験した。セリン/トレオニンキナーゼ、PKCd及びPKAは300mMまでの濃度で検出可能に阻害しなかった。同様に、3gはAb1チロシンキナーゼの弱い阻害しか示さなかった($IC_{50} > 300mM$)。従って、3gは1つの操作したキナーゼの強力な選択的阻害に要求される最初の設計の全てを満たした。

全細胞における選択性

3gが野生型チロシンキナーゼを阻害しないことを更に証明するためにB細胞レセプター(BCR)仲介リン酸化カスケードに対する3g処理の影響を調べた。Srcファミリー(Fyn、Lyn、Lck、Blk)及び非srcファミリーチロシンキナーゼ(Btk、Syk)は、BCR架橋時に活性化されることが既知である。BCR仲介カスケードの増幅性のために、これらのキナーゼのいずれかの阻害は活性化後の細胞ホスホチロシンの分布と強度を劇的に変える。3gが野生型キナーゼの活性部位と立体的に適合しないように設計したことから、野生型B細胞におけるチロシンリン酸化依存性シグナリングを破壊してはならない。図17(レーン3)から抗原レセプター架橋マウスB細胞の100mM 3g処理がB細胞刺激のホスホチロシンパターンに対して影響しないことが示される(レーン2と比較されたい)。主要バンド全てのシグナル強度は変化せず、重要でないバンドのごくわずかな消耗が検出でき、3gがBCR架橋によって活性化されるチロシンキナーゼのパネルをほとんど阻害しないことが確認される。しかしながら、B細胞を100mM 2で処理すると、野生型srcファミリーキナーゼの強力な阻害と一致しているチロシンリン酸化(図4、レーン4)の顕著な低下を引き起こす。

NIH3T3細胞におけるI338G v-Srcの選択的阻害

Src仲介経路を実験する選択的阻害剤を用いるために、WT及びI338G v-Src双方をNIH3T3線維芽細胞にレトロウイルスで導入した。これらの細胞は、v-Src発現に依存する形質転換表現型を得ている。3gがWT形質転換細胞に影響せずにI338G v-Src形質転換細胞のSrc依存性シグナル導入経路を選択的に妨害することを示すことを探求した。WT v-Src感染細胞(100mM 3g)の処理は対照のDMSO処理レーン(図18)と比較してチロシンリン酸化のロスを引き起こさず、設計した阻害剤がWT v-Src又はv-Src仲介細胞形質転換によって活性化される他のチロシンキナーゼを阻害しないことが証明される。I338G v-Src形質転換細胞の同等処理は、推定v-Src基質のチロシンリン酸化の劇的な減少、及びホスホチロシンの細胞レベルの全体の適度な低下を生じる。以前に、v-Src形質転換細胞を一般的なチロシンキナーゼ阻害剤で処理すると36kDタンパク質のチロシンリン酸化の減少が生じることが示されている。p36は特定のホスホチロシンホスファターゼと結合すると考えられ、阻害剤処理細胞における急速な脱リン酸がたびたび説明される。I338G v-Src発現細胞(50mM)におけるp36ホスホチロシンシグナルの3g IC_{50} は試験管内値の約100倍である(データは示されていない)。これは、おそらく阻害剤が細胞実験におけるキナーゼ活性部位のATPのミリモル濃度と競合しなければならない事実による。

I338G突然変異v-Srcの選択的阻害は形質転換細胞形態を逆転する

v-Src活性は、哺乳動物細胞のラウス肉腫ウイルス形質転換に必要である。I338G v-Src発現NIH 3T3細胞を100mM 3gで処理すると、形質転換の逆反応と一致している細胞形態の劇的な変化が生じた(図19)。阻害剤3gで処理した変異細胞は扁平に見え、形質転換細胞の増殖特性を示さなかった(即ち、相互の上で増殖する能力)。同じ条件下で、WT v-Src感染細胞はプロトタイプの丸い形態及び形質転換細胞の重なっている増殖パターンを示した。細胞形態の選択的逆転を更に証明するために、蛍光顕微鏡を用いて細胞重合アクチンをファロイジン-FITC(図19)で染色した後の3g処理細胞を見た。非形質転換NIH3T3細胞は、細胞中に生じる長いアクチン紡錘体を示している。v-Src形質転換細胞(WT及びI338G共に)は円く見え、アクチン形成の識別できるパターンはなかった。光学顕微鏡データに従って、阻害剤処理WT v-Src発現細胞は未処理WT細胞から区別できないように見える。しかしながら、3g処理I338G v-Src発現細胞は特定の重合アクチンの線をもち、非形質転換NIH3T3線維芽細胞のアクチン形成と極めて似ている。これらの阻害剤処理細胞は、肥大した扁平形態をもち、非形質転換NIH3T3細胞に存在しない周辺アクチン染色を示す。このデータが

10

20

30

40

50

ら、3gが問題のキナーゼの単一のアミノ酸変化を含むように操作する細胞においてユニークな形態学的変化を誘導することができることが示される。これは、チロシンキナーゼががん遺伝子産物に選択的な小分子阻害剤が細胞形質転換と関連がある形態学的変化を戻すことができる最初の証明である。ヘルピマイシンA(及び他のベンゾキノナンサマイシン)による形質転換の形態学的逆転の以前の例は、最近、プロテアソームに対するがん遺伝子チロシンキナーゼの熱ショック(hsp90)仲介標的からなるキナーゼ阻害に関係しないメカニズムにより作用することがわかった。

他のキナーゼに対する総括

問題の酵素と他の全ての間のユニークな分子差を与える突然変異誘発を用いる利点は、保存キナーゼ重のために方法がキナーゼスーパーファミリー中に拡張できないからである。ほとんど全ての既知のタンパク質キナーゼは、v-Srcの残基338に対応する位置に嵩のある側鎖を含む。従って、この位置に突然変異を生じるスペースは、選択的阻害に感受性のある多重キナーゼにしなければならない。これを試験するために、T339G Fynに対する類縁体の阻害を測定した(表1)。I338G v-SrcとT339G Fynの類縁体の構造活性関係に驚くべき類似性がある。I338G v-Srcのデータに従って、3gはT339G Fynに対して最も強力な阻害剤類縁体であり、 IC_{50} が830nMであった。これは、WT FynよりT339G Fynに対して300倍より大きい選択性に相当する。このデータの意味は、多重チロシンキナーゼが推定阻害剤の大きなライブラリーをスクリーニングすることを必要とせず1つの阻害剤類縁体を優先的に受容するように系統的に操作されるということである。

結論

この報告においては、化学感受性キナーゼと合理的に設計した阻害剤の相補的操作によって選択的タンパク質キナーゼ阻害の新規な方法が記載される。標的キナーゼの高選択性は全細胞で達成されること及びがん遺伝子チロシンキナーゼの活性部位阻害が形質転換細胞形態の破壊に十分であることが証明される。方法が容易に一般化されることから、シグナル導入経路の解析及び薬剤設計の標的としてキナーゼの確証には広域にわたる適用がなければならない。効果的な薬剤発見の速度は重要な薬剤標的の同定と確証によって制限される。これは、2000の相同タンパク質の環境においてささいな問題ではない。タンパク質キナーゼの化学感受性変異体の使用は、薬理的キナーゼ阻害の細胞及び生理的作用をプローブする能力を増大する。トランスフェクションした細胞系及び“ノックイン”マウスでさえ現在は速やかに作成することができるので、我々の方法は全細胞又は動物モデルにおいて一定のキナーゼの選択的阻害の影響を試験する方法を大いに効率よくしなければならない。阻害剤結合タンパク質キナーゼ結晶構造が利用できるにつれて、この戦略は全シグナル導入カスケードの範囲で一定のキナーゼの時間及び用量依存性阻害の影響の系統的研究を可能にする。

材料及び方法

化学合成

出発物質と合成試薬は全て特にことわらない限りAldrichから購入した。化合物は全て 1H NMRと高分解能質量分析法で確認した。4-アミノ-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(2)をHanefeldらに従って合成した。

2のN-4アシル化の一般手順(3a~3g). 2mlのピリジンに溶解した2(100mg)の溶液に10当量の所望のアシル塩化物を0 で加えた。反応混合液を室温まで温め、12時間攪拌した。反応液を25mlの水を加えることにより急冷した。得られた混合液を Et_2O で抽出し、合わせた Et_2O 抽出液を1N HClと5% $NaHCO_3$ で洗浄した。 Et_2O 層を $MgSO_4$ で乾燥し、蒸発した。残留物を1:1の Et_2O /ヘキサンで溶離することによる25gのシリカゲルによりフラッシュクロマトグラフィーで精製して純粋な3a~3gを得た。

4-シクロブチルアミド-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(3a): 収量0.0116g(16%), 白色粉末; HRMS(EI)分子イオン $C_{20}H_{23}N_5O$ の計算値349.19049, 実測値349.18762; 1H NMR(300 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.86(9H, s), 1.89-2.27(6H, m), 3.58(1H, m), 7.26-7.67(5H, m), 8.69(1H, s).

4-シクロペンチルアミド-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(3b): 収

10

20

30

40

50

量0.0456g(68%), 白色粉末; HRMS(EI)分子イオン $C_{21}H_{25}N_5O$ の計算値363.20615, 実測値363.20398; 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.41-1.91(8H, m), 1.87(9H, s), 2.97(1H, m), 7.51-7.67(5H, m), 8.70(1H, s).

4-シクロヘキシルアミド-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(3c): 収量0.0575g(84%), 白色粉末; HRMS(EI)分子イオン $C_{22}H_{27}N_5O$ の計算値; 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.21-1.93(10H, m), 1.86(9H, s), 2.43(1H, m), 7.51-7.67(5H, m), 8.70(1H, s).

4,2'-フリルアミノ-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(3d): 収量0.0342g(60%), 白色粉末; HRMS(EI)分子イオン $C_{20}H_{19}N_5O_2$ の計算値361.15407, 実測値361.15254; 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.87(9H, s), 6.52(1H, d), 7.23(1H, d), 7.43-7.53(5H, m), 7.95(1H, s), 8.59(1H, s).

10

4-ベンズアミド-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(3e): 収量0.1309g(56%), 白色粉末; HRMS(EI)分子イオン $C_{22}H_{21}N_5O$ の計算値371.17933, 実測値371.17324; 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.41-1.91(8H, m), 7.22-8.11(10H, m), 8.48(1H, s).

4-(p-メチル)ベンズアミド-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(3f): 収量0.0751g(33%), 白色粉末; HRMS(EI)分子イオン $C_{23}H_{23}N_5O$ の計算値385.19499, 実測値385.18751; 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.88(9H, s), 2.42(3H, s), 7.19(2H, d), 7.41-8.11(7H, m), 8.49(1H, s).

4-(p-tert-ブチル)ベンズアミド-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(3g): 収量0.1050g(42%), 白色粉末; HRMS(EI)分子イオン $C_{26}H_{29}N_5O$ の計算値427.23747, 実測値427.23474; 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.35(9H, s), 1.88(9H, s), 7.38-7.99(9H, m), 8.50(1H, s).

20

N-4アシル化合物をN-4メチレン化合物に小さくする一般手順(4b、4d、4e). 丸底フラスコに30mgの $LiAlH_4$ を充填した。そのフラスコに均圧滴下漏斗を取り付け、乾燥アルゴンでフラッシュした。 $LiAlH_4$ を3mlのTHFに氷浴上で懸濁した。約100mgの対応するN-4アシル2類縁体を5mlのTHFに溶解し、 $LiAlH_4$ の懸濁液に滴下した。反応混合液を30分間氷上で攪拌し、次に30分間加熱還流した。反応液を1mlのEtOAc、1mlの水、及び1mlの6N NaOHで順次滴下することにより急冷した。5分間攪拌した後、反応混合液をセライトパッドでろ過し、水で希釈し、 Et_2O で抽出した。 Et_2O 抽出液を合わせ、 $MgSO_4$ で乾燥し、蒸発した。残留物を4:1のヘキサン/EtOAcで溶離することによる10gのシリカゲルによりフラッシュクロマトグラフィーで精製した。

30

4-シクロペンチルメチルアミノ-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(4b): 収量0.0649g(75%), 透明な油状物; HRMS(EI)分子イオン $C_{21}H_{27}N_5$ の計算値349.22691, 実測値349.22420; 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.16-2.14(9H, m), 1.84(9H, s), 3.54(2H, d), 5.51(1H, s), 7.46-7.67(5H, m), 8.43(1H, s).

4,2'-フリルメチルアミノ-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(4d): 収量0.0620g(66%), ベージュ色の粉末; HRMS(EI)分子イオン $C_{20}H_{21}N_5O$ の計算値347.17483, 実測値347.17330; 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.83(9H, s), 4.75(2H, d), 5.64(1H, s), 6.25(2H, d), 7.34-7.63(6H, m), 8.45(1H, s).

40

4-ベンジルアミノ-1-tert-ブチル-3-フェニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(4c): 収量0.0520g(54%), 白色粉末; HRMS(EI)分子イオン $C_{22}H_{23}N_5$ の計算値357.19559, 実測値357.19303; 1H NMR(270 MHz, $CDCl_3$, ppm) d 1.82(9H, s), 4.76(2H, d), 5.63(1H, s), 7.28-7.63(10H, m), 8.44(1H, s).

タンパク質の発現と精製

WTv-Src HS1ドメイン、I338G v-Src SH1、WT Fyn、T339G Fyn及びWT Ab1のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質の遺伝子のpGEX-KTプラスミドへの部位特定変異誘発及びクローニングを前述のように行った。これらのキナーゼをDH5a E. coli中で発現し、固定化グルタチオンビーズ(Sigma)上で精製した。PKAを購入(Pierce)し、精製せずに用いた。PKCdをBac-to-Bac発現系(pFastBac Bベクター)を用いて6-His構築物として発現し

50

た。PKCdをQIAexpress(Ni-NTAアガロースカラム)を用いて精製した。

試験管内キナーゼ阻害分析

srcファミリーキナーゼ(IYGEFKKK)の最適化ペプチド基質に移った ^{32}P の1分当たりの計数(cpm)を測定することにより推定キナーゼ阻害剤の IC_{50} を求めた。種々の濃度の阻害剤を50 mMトリス(pH8.0)、10mM MgCl_2 、1.6mMグルタチオン、1mg/ml BSA、133mM IYGEFKKK、3.3 % DMSO、0.05mMキナーゼ及び11nM(2mCi)[$\text{g-}^{32}\text{P}$]ATP(6000Ci/ミリモル, NEW)と全容量30mlで30分間インキュベートした。反応混合液(25ml)をホスホセルロースディスク上にスポットし、10% H₃PO₄に浸漬し、0.5% H₃PO₄で洗浄した。 ^{32}P の移動を標準シンチレーション計数で測定した。cpmが対照ディスクの50%である阻害剤濃度であるように IC_{50} を定義した。 IC_{50} が2つの測定濃度の間に下がった場合、阻害剤濃度と2つのデータ間のcpmの間の逆比例の関係を前提として算出した。水溶液中の阻害剤類縁体の溶解限界が300 μM であることから、250 μM の IC_{50} 値は阻害上限までの完全な力価測定が試験されないので近似値である。非srcファミリーキナーゼの IC_{50} は次を除いて同様に測定した。PKAの基質としてケンブチド(Pierce, 133mg/ml)を用いた。Ab1分析に最適化Ab1基質(EAIYAAPFAKKK, 133mg/ml)を用いた。17ng/mlのジアシルグリセロール(Sigma)と17ng/mlのホスファチジルセリン(Sigma)の存在下にキナーゼ基質として170ng/mlヒストン(Sigma)と共にPKCd分析を行った。

10

マウスB細胞分析

脾リンパ球を生後6~20週のBalb/c又はC57/B6マウスから単離した。その細胞を脾臓から1 mg/ml DNase Iを含むRPMI培地に洗い、赤血球を17mMトリス-塩化アンモニウム、pH 7.2に溶解した。約 4×10^6 細胞を1.1% DMSO中100mMの3g又は2と37 で30分間インキュベートした。2mgのヤギ抗マウスIgM(Jackson Immuno Research, cat#115-005-075)を添加し、次に37 で5分間インキュベートすることによりB細胞刺激を開始した。細胞を遠心分離(13,000rpm、2分)により単離し、溶解した(溶解緩衝液: 1%トリトンX-100、50mMトリスpH 7.4、2mM EDTA、150mM NaCl、100mM PMSF、2mMオルトバナジン酸ナトリウム、10mg/mlロイペプチン、10mg/mlアポプロチン)。次に、細胞残渣を13,000rpmで15分間沈降させた。細胞タンパク質を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ウェスタンブロッティングでニトロセルロース膜に移した。ホスホチロシン含有タンパク質を抗ホスホチロシン抗体(Upstate Biotechnology社)でイムノブロッティングすることにより視覚化した。

20

NIH 3T3線維芽細胞のレトロウイルス感染

WT及びI338G v-Srcをコードしている遺伝子をパッケージング細胞系にトランスフェクションし、pBabeレトロウイルスベクター及びピューロマイシン(2.5mg/ml)記載された選択可能なマーカー(Shah, K., Liu, Y., Shokat, K.M., 準備中)を用いてNIH 3T3線維芽細胞にレトロウイルス感染した。WT及びI338G v-Src形質転換細胞を2.5mg/mlのピューロマイシンを含有するDMEM/10% BCS中で培養した。

30

NIH 3T3線維芽細胞におけるv-Srcの阻害

非形質転換NIH 3T3細胞、WT v-Src形質転換NIH 3T3細胞、及びI338G v-Src形質転換NIH 3T3細胞を1.1% DMSO又は1.1% DMSO中100mMの3gと37 でインキュベートした。12時間後、細胞をPBSで洗浄し、溶解した(溶解緩衝液: 1%トリトンX-100、50mMトリスpH 7.4、2mM EDTA、150mM NaCl、100mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、2mMオルトバナジン酸ナトリウム、10mg/mlロイペプチン、10mg/mlアポプロチン)。溶解物を13,000rpmで15分間遠心分離することにより清澄化した。溶解物のタンパク質濃度を基準化し、同量の溶解物を電気泳動で分離し、上記のようにホスホチロシン含量を分析した。

40

顕微鏡法

非形質転換した、WT v-Src形質転換した、及びI338G v-Src形質転換したNIH 3T3細胞を組織培養処理スライド上のDMEM/10% BCS中で増殖した。v-Src発現細胞を1.1% DMSOか又は1.1% DMSO中100mM 3gで処理した。48時間後、ニコンTMS光学顕微鏡で400倍の写真を撮った。光学顕微鏡法後直ちに細胞を3.7%ホルムアルデヒド/PBSに20分間固定し、0.2%トリトンX-100/PBSに60秒間透過性を上げた。透過性を上げた細胞を200ng/mlのファロイジン-FITC/PBSと20分間インキュベートした。スライドをPBSですすぎ、重合アクチンをツァイス蛍光顕微鏡により600倍の蛍光顕微鏡法で可視化した。

50

実施例6

タンパク質基質特異性及び生物活性の保持を確認する

(79)に記載されたように行われる。更に、NIH 3T3細胞のがん遺伝子形質転換におけるv-Srcの型にはまった役割がv-Srcを発現する細胞の形態学的変化を観察することにより求められる。突然変異I338G v-Srcを発現するNIH 3T3細胞は、いずれのv-Srcキナーゼも発現しないNIH 3T3細胞と驚異的に異なる野生型v-Srcを発現する細胞の同じ形態学的特徴を示し、I338G突然変異が正常なv-Srcの生物学的機能の喪失又は獲得をまねかないことが確認される。更に、“接触阻害”をせずに増殖するNIH 3T3細胞の能力の分析は、アガロース、粘性増殖培地を含む細胞培養系分析において測定される。野生型v-Src及び突然変異v-Src発現NIH 3T3細胞は、この型にはまった分析においても大きな増殖コロニーを生じる厳密に同じ能力を示し、線維芽細胞においても同じ機能(基質特異性、速度論、細胞分布等を含む)が確認される。

10

実施例7

直交性阻害剤が多重チロシンキナーゼを発現する細胞において野生型キナーゼを阻害しないことを確認する

実施例2に記載された精製キナーゼにおける化合物3の直交性に関する最初の分析を確認するために、全細胞を用いて阻害実験が行われた(図4、左の2つのレーン参照)。Coussensら(84)の方法に従って修飾したRIPA緩衝液に細胞を溶解することによりv-Srcキナーゼを発現するピラゾロピリミジン(2~6)(25 μ M)処理NIH 3T3細胞の抗ホスホチロシンプロットを行った。溶解及び抗ホスホチロシン検出前に、種々の時間で細胞を処理した。タンパク質を12.5% SDS-PAGEで分離し、プロトランBA85(Schleicher-Schuell)に移した。プロットを抗ホスホチロシンモノクローナル抗体4G10(Dr. Brian Drukerからの寄贈、オレゴンヘルスサイエンスセンター、オレゴン州ポートランド)でプローブし、製造業者の説明書に従ってHRP結合ヤギ抗マウス抗体(VWR cat. 7101332)で処理した後に高化学発光(cat. 34080, Pierce)により結合抗体を検出した。

20

実施例8

基質の同定

v-Src基質を同定する実験法の図式を図1に示し、実験の確証を示すデータを図4に示す。Coussensら(84)の方法に従って細胞を修飾したRIPA緩衝液に溶解することにより行われるv-Srcか又はv-Src(I338G)キナーゼを発現するピラゾロピリミジン(2~6)(25 μ M)処理NIH 3T3細胞の抗ホスホチロシンプロットをつくることにより分析を行った。溶解及び抗ホスホチロシン検出前に細胞を種々の時間で処理した(細胞培養 CO_2 インキュベーター内で)。タンパク質を12.5% SDS-PAGEで分離し、プロトランBA85(Schleicher-Schuell)に移した。プロットを抗ホスホチロシンモノクローナル抗体4G10(Dr. Brian Drukerからの寄贈、オレゴンヘルスサイエンスセンター、オレゴン州ポートランド)でプローブし、製造業者の説明書に従ってHRP結合ヤギ抗マウス抗体(VWR cat. 7101332)で処理した後に高化学発光(cat. 34080, Pierce)により結合抗体を検出した。実施例7で述べたように、図4の2つの左のレーンは同じリンタンパク質バンドパターンを示し、直交性阻害剤3が野生型v-Srcキナーゼを阻害しないことが示される。右のゲルの一連のレーンは、ゲルの下に目立ったバンドを示し(タンパク質分子量3キロダルトンに相当する)、100 μ Mの化合物3で処理した後に消失する。1つのリンタンパク質のこの特異的阻害は、特定のキナーゼ阻害剤の特徴である。阻害の特異性は阻害剤が希釈されるゲルの最後のレーンで確認され、36キロダルトンバンドのリン酸化は阻害剤濃度が5 μ Mより低い場合に再び現れる(測定した試験管内 IC_{50} は5 μ Mである、本文参照)。このタンパク質は、ユニークな分子量に基づいて未知の機能を有するアネキシンIIと呼ばれるタンパク質、アクチン結合タンパク質として暫定的に同定された。

30

40

1. Mustelin, T. 1994. T Cell antigen receptor signaling: Three families of tyrosine kinases and a phosphatase. *Immunity*. 1: p. 351-356.
2. Renshaw, M.W., E.T. Kipreos, M.R. Albrecht, and J.Y.J. Wang 1992. Oncogenic v-Abl tyrosine kinase can inhibit or stimulate growth, depending on the cell context. *EMBO J.* 11(11): p. 3941-3951. 10
3. Cohen, G.B., R. Ren, and D. Baltimore 1995. Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins. *Cell*. 80: p. 237-248.
4. Hunter, T. 1987. A Thousand and One Protein Kinases. *Cell*. 50: p. 823-829.
5. Eiseman, E. and J.B. Bolen 1992. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature*. 355. 20
6. Murray, A.W. 1994. Cyclin-dependent kinases: regulators of the cell cycle and more. *Chem. and Bio.* 1(4): p. 191-195.
7. White, M.F. 1991. Mini-Review: Structure and Function of Tyrosine Kinase Receptors. *J. Bioenergetics Biomem.* 23(1): p. 63-83. 30
8. Hunter, T. 1995. Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell*. 80: p. 225-236.
9. Sawyers, C.L. 1992. The bcr-abl gene in chronic myelogenous leukaemia. *Cancer Surveys*. 15: p. 37-51. 40
10. Crabtree, G.R. and N.A. Clipstone 1994. Signal Transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 63: p. 1045-1083.

11. Kurzrock, R., J.U. Gutterman, and M. Talpaz 1988. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New Engl. J. Med.* 319(15): p. 990-998.
12. Ullrich, A. and J. Schlessinger 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61: p. 203-212. 10
13. Bolen, J.B., R.B. Rowley, C. Spana, and A.Y. Tsygankov 1992. The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *FASEB.* 6: p. 3403-3409.
14. Cicchetti, P., B.J. Mayer, G. Thiel, and D. Baltimore 1992. Identification of a Protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science.* 257: p. 803-806. 20
15. Sawyers, C.L., J. McLaughlin, A. Goga, M. Havlik, and O. Witte 1994. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell.* 77: p. 121-131.
16. Kipreos, E.T. and J.Y.J. Wang 1992. Cell Cycle-regulated binding of c-abl Tyrosine kinase to DNA. *Science.* 256: p. 382-385. 30
17. Velazquez, L., M. Fellous, G.R. Stark, and S. Pellegrini 1992. *Cell.* 70: p. 313-320.
18. Duyster, J., R. Baskaran, and J.Y.J. Wang 1995. Src homology 2 domain as a specificity determinant in the c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 40

USA. 92: p. 1555-1559.

19. Mayer, B.J., P.K. Jackson, and D. Baltimore 1991. The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 88: p. 627-631.

20. Kamps, M.P., J.E. Buss, and B.M. Sefton 1986. Rous Sarcoma Virus Transforming protein lacking myristic acid phosphorylates known polypeptide substrates without inducing transformation. *Cell.* 45: p. 105-112.

10

21. Muller, A.J., A.-M. Pendergast, K. Parmar, M.H. Havlik, N. Rosenberg, and O.N. Witte 1993. En Bloc substitution of the Src homology region 2 domain activates the transforming potential of the c-abl protein tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 90: p. 3457-3461.

20

22. Mayer, B.J. and D. Baltimore 1994. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the abl tyrosine kinase. *Mol. Cell. Bio.* 14(5): p. 2883.

23. Mayer, B.J., P.K. Jackson, R.A. Van Etten, and D. Baltimore 1992. Point Mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo. *Mol. Cell. Bio.* 12(2): p. 609-618.

30

24. Koyama, S., H. Yu, D.C. Dalgarno, T.B. Shin, L.D. Zydowsky, and S.L. Schreiber 1993. Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 Family. *Cell.* 72: p. 945-952.

40

25. Yu, H., M.K. Rosen, T.B. Shin, C. Seidel-Dugan, J.S. Brugge, and S.L. Schreiber 1992. Solution Structure of the SH3 domain of Src and identification of its

ligand-binding site. *Science*. 258: p. 1665-1668.

26. Kohda, D., H. Hatanaka, M. Odaka, V. Mandiyan, A. Ullrich, J. Schlessinger, and F. Inagaki 1993. Solution Structure of the SH3 domain of phospholipase C-gamma. *Cell*. 72: p. 953-960.

27. Waksman, G., S.E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn, and J. Kuriyan 1993. Crystal structure/NMR of SH2. *Cell*. 72: p. 779-790.

10

28. Eck, M.J., S.E. Shoelson, and S.C. Harrison 1993. SH2 crystal structure. *Nature*. 362: p. 87.

29. Wang, J.Y.J., C. Queen, and D. Baltimore 1982. Expression of an Abelson Murine Leukemia Virus-encoded protein in Escherichia coli Causes Extensive Phosphorylation of Tyrosine Residues. *J. Biol. Chem.* 257(22): p. 13181-13184.

20

30. Schwartzerg, P.L., A.M. Stall, J.D. Hardin, K.S. Bowdish, T. Humaran, S. Boast, M.L. Harbison, E.J. Robertson, and S.P. Goff 1991. Mice homozygous for the abl mu mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell*. 65: p. 1165-1175.

30

31. Tybulewicz, V.L., C.E. Crawford, P.K. Jackson, R.T. Bronson, and R.C. Mulligan 1991. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*. 65: p. 1153-1163.

32. Brugge, J.S. & Erikson, R.L. 1977. *Nature* 269(5626), 346-8.

40

33. Jove, R. & Hanafusa, H. 1987. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3, 31-56.

34. Erpel, T. & Courtneidge, S.A. 1995. *Curr. Op. in Cell Biology* 7, 176-

182.

35. Pawson, T. 1995. *Nature* **373**, 573-580.
36. Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S.C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R.B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B.J., Overduin, M., Resh, M.D., Rios, C.B., Silverman, L. & Kuriyan, J. 1992). *Nature* **358**, 646-653. 10
37. Taylor, S.J. & Shalloway, D. 1993. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 26-34.
38. Brown, M.T. & Cooper, J.A. 1996. *Biochemica et Biophysica Acta* **1287**, 121-149.
39. Songyang, Z., Carraway, K.L.I., Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Smith, D.P., Eng, C., Lorenzo, M.J., Ponder, B.A.J., Mayer, B.J. & Cantley, L.C. 1995. *Nature* **373**, 536-539. 20
40. Kamps, M.P. & Sefton, B.M. 1988. *Oncogene Res.* **3**, 105-115. 30
41. Weijland, A. & Parmeggiani, A. 1993. *Science* **259**, 1311-1314.
42. Belshaw, P.J., Schoepfer, J.G., Liu, K.-Q., Morrison, K.L. & Schreiber, S.L. 1995. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**(19), 2129-2132.
43. Fujii, T., Wu, C.C., Itaya, T., Moro, S. & Saito, T. 1973. *Chem. Pharm. Bull.* **21**(8), 1676-1682. 40
44. Robins, M.J. & Trip, E.M. 1973. *Biochemistry* **12**(12), 2179-2187.

45. McLaughlin, L.W., Piel, N. & Hellmann, T. 1985. *Synthesis*, 322-3.
46. Kikugawa, K., Iizuka, K. & Ichino, M. 1973. *J. Med. Chem.* 16, 358-364.
47. Ludwig, J. 1981. *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* 16(304), 131-133.
48. Hecht, S.M. & Kozarich, J.W. 1973. *Biochim. Biophys. Acta* 331, 307-309.
49. Reikofski, J. & Tao, B.Y. 1992. *Biotech. Adv.* 10, 535-554.
50. Xu, B., Bird, G.V. & Miller, T.W. 1995. *J. Biol. Chem.* 270, 29825-29830.
51. Fukazawa, H., Li, P., Mizuno, S. & Uehara, Y. 1993. *Analytical Biochemistry*, 212, 106-110.
52. Lee, T.R., Niu, J. & Lawrence, D.S. 1995. *J. Biol. Chem.* 270(10), 5375-5380.
53. Kwiatkowski, A.P. & King, M.M. 1987. *Biochemistry* 26, 7636-7640.
54. Hubbard, S.R., Wei, L., Ellis, L. & Hendrickson, W.A. (1994) *Nature* 372, 746-754.
55. Mohammadi, M., Schlessinger, J. & Hubbard, S.R. 1996. *Cell* 86, 577-587.
56. Zheng, J., Knighton, D.R., Ten Eyck, L.F., Karlsson, R., Zuong, N.-H., Taylor, S.S. & Sowadski, J.M. 1993. *Biochemistry* 32, 2154-2161.
57. Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. & Pavletich, N.P. 1995. *Nature* 376, 313-320.

10

20

30

40

58. Kamps, M.P., Taylor, S.S. & Sefton, B.M. 1984). *Nature* **310**, 589-592.
59. Zoller, M.J., Nelson, N.C. & Taylor, S.S. 1981. *J. Biol. Chem.* **256**, 10837-10842.
60. Taylor, S.S. & Radzio-Andzelm, E. 1995. *Structure* **2**, 345-355.
61. DeClue, J.E. & Martin, G.S. 1989. *J. Virol.* **63**(2), 542-554.
62. Seidel-Dugan, C., Meyer, B.E., Thomas, S.M. & Brugge, J.S. 1992. *Mol. Cell Biol.* **12**(4), 1835-45.
63. Czernilofsky, A.D., Levison, A.D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Tischer, E. & Goodman, H.M. 1980. *Nature (London)* **287**, 198-200.
64. Fersht, A., *Enzyme Structure and Mechanism*. Second ed. 1985, New York: W.H. Freeman and Co. 475.
65. Hunter, T. & Sefton, B.M. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**(3), 1311-1315.
66. Ozawa, K., Szallasi, Z., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Mischak, H., Mushinski, J.F. & Beaven, M.A. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**(3), 1749-1756.
67. Schultz, C., Vajanaphanich, M., Genieser, H.-G., Jastorff, B., Barret, K.E. & Tsien, R.Y. 1994. *Mol. Pharm.* **46**, 702-708.
68. Merritt, E.A. & Murphy, M.E.P. 1994. *Acta Cryst.* **D50**, 869-873.
69. Bacon, D.J. & Anderson, W.F. 1988. *J. Molec. Graphics* **6**, 219-220.

10

20

30

40

70. Schluckebeir, G., O-Gara, M., Saenger, W., & Chen, X. "Universal Catalytic Domain Structure of AdoMet-dependent Methyltransferases," 1995. *Mol. Biol.* **247** pg 16-20.

71. *Protein Kinase Facts Book*, G. Hardie and S. Hanks, Eds. 1995. Academic Press, San Diego, ISBN 0-12-324719-5.

10

72. *Principles of Biochemistry*, A. Lehninger, D. Nelson and M. Cox, 2nd Ed., 1993. Worth Publishers, New York, ISBN 0-87901-500-4.

73. C. R. Faltynek, et al. 1995. *Biochemistry* **34**, 12404-10.

74. J. Hanke, et al. 1996. *J. Biol. Chem.* **271**, 695-701.

20

75. B. J. Druker, et al. 1996. *Nat. Med.* **5**, 561-6.

76. U. Hanefeld, C. W. Rees, A. J. P. White, D. J. Williams (1996). One-pot synthesis of tetrasubstituted pyrazoles-proof of regiochemistry *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* , 1545-1552.

77. J. Reikofski, B. Y. Tao (1992). Polymerase Chain Reaction(PCR Techniques for Site-directed Mutagenesis *Biotech. Adv.* **10**, 535-554.

30

78. B. Xu, G. V. Bird, T. W. Miller (1995). Substrate Specificities of the Insulin and Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Tyrosine Kinase Catalytic Domains *J. Biol. Chem.* **270**, 29825-29830.

79. K. Shah, Y. Liu, C. Deirmengian, K. M. Shokat (1997). Engineering Unnatural Nucleotide Specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to Uniquely

40

Label its Direct Substrates *Proc. Natl. Acad. Sci* 94, 3565-3570.

80. J. P. Morgenstern, H. Land (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line *Nucleic Acids Res.* 18, 3587-3596.

81. W. S. Pear, G. P. Nolan, M. L. Scott, D. Baltimore (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8392-8396.

10

82. O. Danos, R. C. Mulligan (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6460-4.

20

83. T. R. Lee, J. Niu, D. S. Lawrence (1995). The extraordinary active site substrate specificity of pp60c-src. A multiple specificity protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 5375-5380.

84. P. M. Coussens, J. A. Cooper, T. Hunter, D. Shalloway (1985). Restriction of the In Vitro and In Vivo Tyrosine Kinase Activities of pp60c-src Relative to pp60v-Src *Molecular and Cell. Biol.*, 2753-2763.

30

本発明は、その真意又は実質的な特徴から逸脱することなく他の形に具体化され、他の方法でも行われる。従って、本発明の開示は、全ての点で例示であり限定するものとしてみなされるべきでなく、本発明の範囲は下記の請求の範囲によって示され、等価な意味及び範囲内に入る全ての変更が包含されるものである。

配列表

(2) 配列番号1に関する情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 27アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 関係しない

(D) トポロジー: 関係しない

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: 中間部フラグメント

(vi) 起源:

(A) 生物名: ホモ サピエンス (Homo sapiens)

(xi) 配列の記載: 配列番号1

40

Asn Phe Pro Phe Leu Val Lys Leu Glu Phe Ser Phe Lys Asp Asn Ser

1 5 10 15

Asn Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Val Pro Gly

20 25

(2) 配列番号2に関する情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 27アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

10

(C) 鎖の数: 関係しない

(D) トポロジー: 関係しない

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: 中間部フラグメント

(vi) 起源:

(A) 生物名: ホモ サピエンス (Homo sapiens)

(xi) 配列の記載: 配列番号2

Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Leu Asp Val Ile His Thr Glu Asn

20

1 5 10 15

Lys Leu Tyr Leu Val Phe Glu Phe Leu His Gln

20 25

(2) 配列番号3に関する情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 26アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

30

(C) 鎖の数: 関係しない

(D) トポロジー: 関係しない

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: 中間部フラグメント

(vi) 起源:

(A) 生物名: ラウス肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus)

(xi) 配列の記載: 配列番号3

Arg His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro

40

1 5 10 15

Ile Tyr Ile Val Ile Glu Tyr Met Ser Lys

20 25

(2) 配列番号4に関する情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 30塩基対

(B) 配列の型: 核酸

50

- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (iii) ハイポセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: YES
- (vi) 起源:
- (A) 生物名: ラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus)
- (xi) 配列の記載: 配列番号4

TTTGGATCCA TGGGGAGTAG CAAGAGCAAG

30

- (2) 配列番号5に関する情報:

10

- (i) 配列の特徴:
- (A) 配列の長さ: 30塩基対
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (iii) ハイポセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: YES
- (vi) 起源:
- (A) 生物名: ラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus)
- (xi) 配列の記載: 配列番号5

TTTGAATTCC TACTCAGCGA CCTCCAACAC

30

- (2) 配列番号6の情報:

- (i) 配列の特徴:
- (A) 配列の長さ: 26塩基対
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (iii) ハイポセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: YES
- (vi) 起源:
- (A) 生物名: ラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus)
- (xi) 配列の記載: 配列番号6

TGAGAAGCTG GCTCAACTGT ACGCAG

26

- (2) 配列番号7に関する情報:

- (i) 配列の特徴:
- (A) 配列の長さ: 26塩基対
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (iii) ハイポセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: YES
- (vi) 起源:
- (A) 生物名: ラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus)
- (xi) 配列の記載: 配列番号7

CTGCGTACAG TTGAGCCAGC TTCTCA

26

- (2) 配列番号8に関する情報:

- (i) 配列の特徴:

50

- (A) 配列の長さ: 24塩基対
 (B) 配列の型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: 他の核酸
 (iii) ハイポセティカル: NO
 (iv) アンチセンス: YES
 (vi) 起源:

(A) 生物名: ラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus)

(xi) 配列の記載: 配列番号8

CTACATCGTC GCTGAGTACA TGAG

24

10

(2) 配列番号9に関する情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 配列の長さ: 24塩基対
 (B) 配列の型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: 他の核酸
 (iii) ハイポセティカル: NO
 (iv) アンチセンス: YES

20

(vi) 起源:

(A) 生物名: ラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus)

(xi) 配列の記載: 配列番号9

CTCATGTACT CAGCGACGAT GTAG

24

【図1】

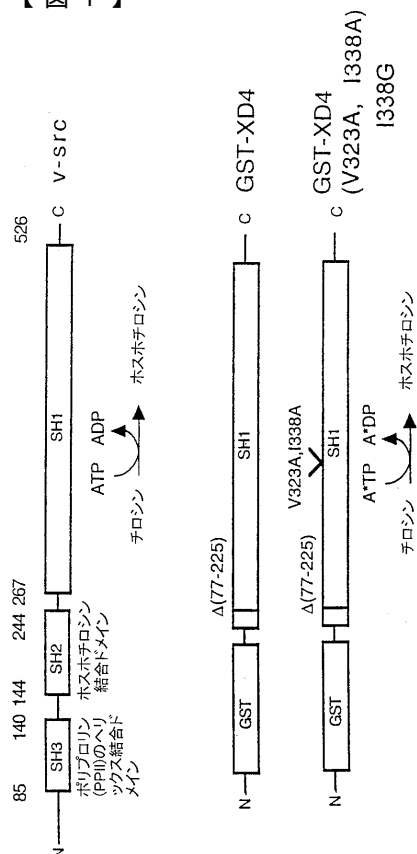


Figure 1

【図2】

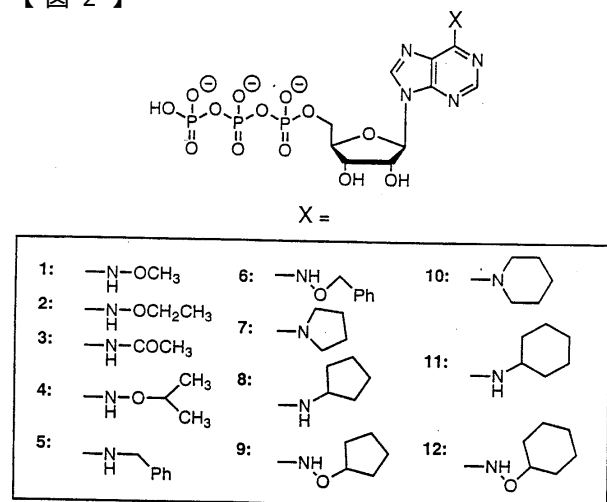
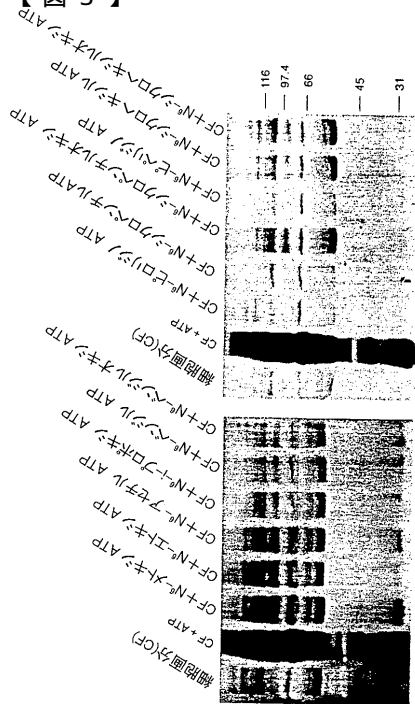


Figure 2

【図 3】



【図 4】

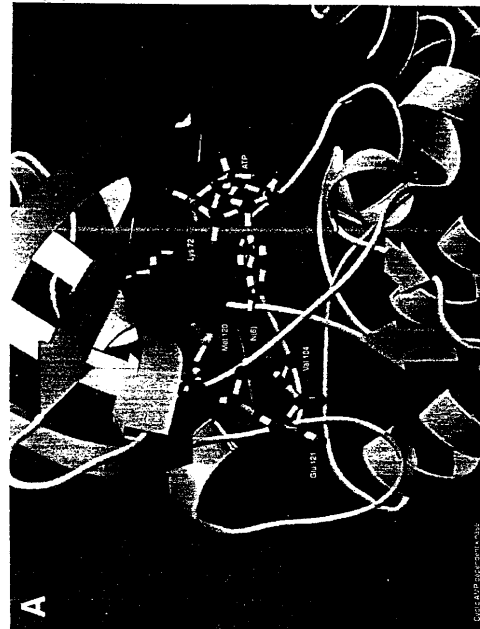


Figure 3

Figure 4

【図 5】

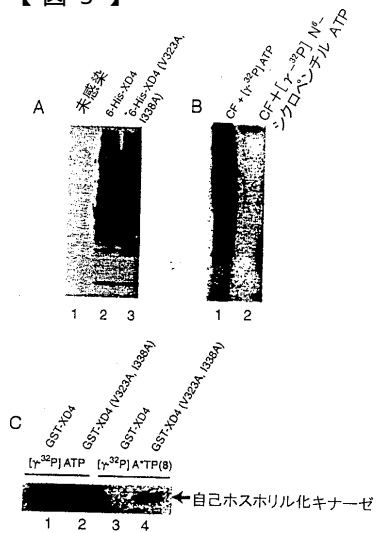


Figure 5

【図 6】

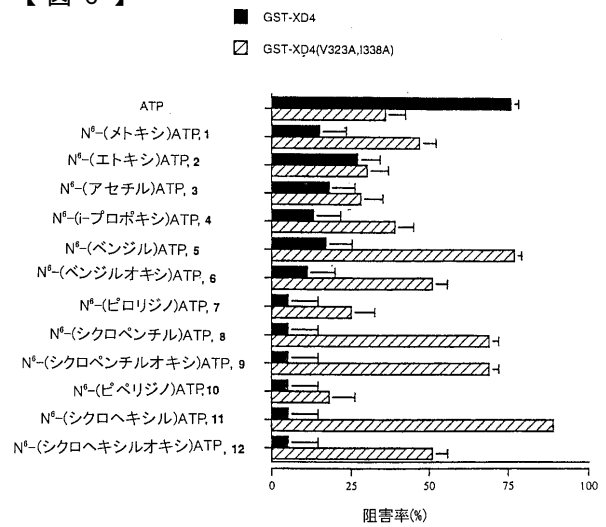
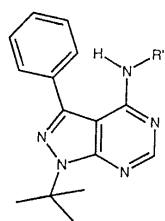


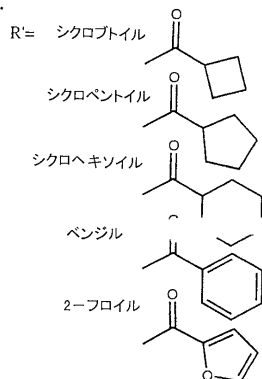
Figure 6

【図 11】

A. N-4 アクリル類似体



B.



C. インビトロ阻害データ

| R' = | IC ₅₀ (μM) | | |
|---------|-----------------------|--------|-----------|
| | WT fyn | WT src | I338G src |
| H | 0.08 | 35 | <1 |
| シクロブチル | | >>400 | 12 |
| シクロペンチル | 400 | >>400 | 5 |
| シクロヘキシル | 50 | >>400 | 20 |
| ベンジル | >400 | >>400 | 50 |
| 2-フロイル | | >>400 | 150 |

Figure 11

【図 12】

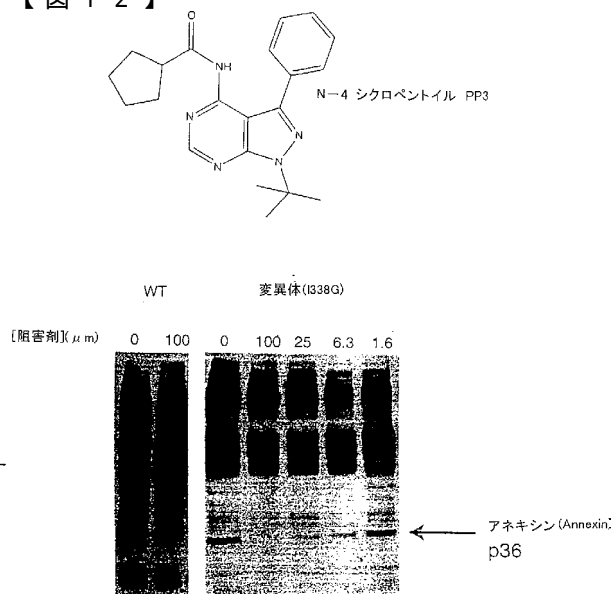


Figure 12

【図 13 A】

IC₅₀ (μM)

| Molecule | WT XD4 | I338G XD4 | WT Fyn | T339G Fyn | WT Abl | T120A Abl |
|----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| | 35 | 0.13 | 0.05 | | | <<10 |
| | | 200 | >300 | | | |
| | | 300 | >300 | | | |
| | | >300 | >300 | | | |
| | >300 | 75 | >300 | 100 | | >10 |
| | >300 | 250 | >300 | 26 | | >10 |
| | >300 | 85 | >300 | 63 | | >10 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

Figure 13A

【図 13 B】

| | | | | | | |
|--|------|---------|-----|------|-----|------|
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | >300 | 12 | 6.5 | 5 | | |
| | >300 | 19 | 80 | 9 | | |
| | >300 | 20 | 50 | 5 | | |
| | >300 | 150 | 15 | 19 | | |
| | >300 | 10 | 300 | 11 | | (10) |
| | >300 | 10 | 300 | 6 | | (10) |
| | | 1.2 | | | | <10 |
| | | 0.63 | | | | |
| | | (0.411) | | | | 1.8 |
| | >300 | 0.43 | 300 | 0.83 | 300 | (10) |

Figure 13B

【 図 1 3 C 】












| | | | | | | |
|---|-----|-------|------|--|--|-----|
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | >10 |
|  | | | | | | |
|  | 100 | (0.05 | 0.1 | | | |
|  | | >100 | >300 | | | |
|  | | | 2 | | | |
|  | | | 7 | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |

Figure 13C

【 図 1 3 D 】













| | | | | | | |
|---|-------|-------|------|--|-------|--|
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | | | | | | |
|  | >1000 | 0.510 | 0.4 | | <<6.5 | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |

Figure 13D

【 図 1 3 E 】











| | | | | | | |
|---|------|-----|------|--|--|--|
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |

Figure 13E

【 図 1 3 F 】











| | | | | | | |
|---|------|-----|------|--|--|--|
|  | | | | | | |
|  | <10 | 2.5 | <<10 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |
|  | >300 | >10 | >300 | | | |

Figure 13F

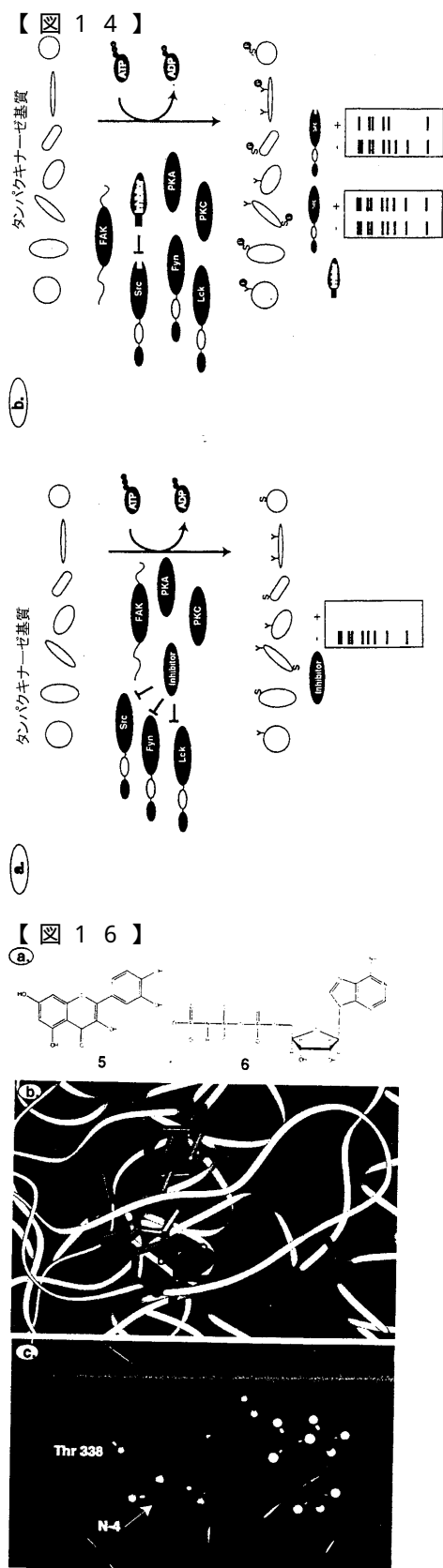


Figure 16

Figure 14

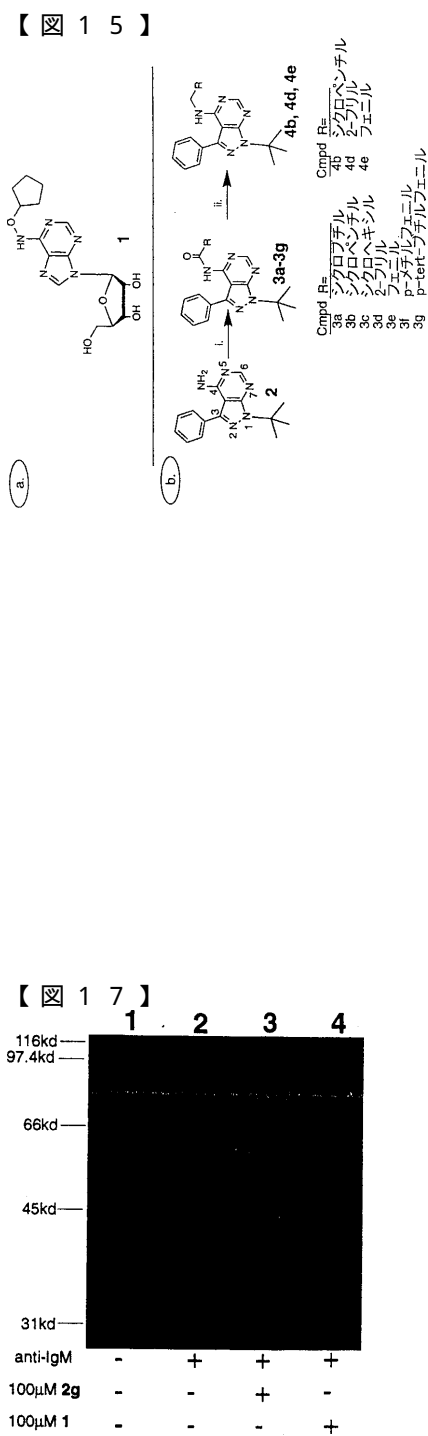


Figure 17

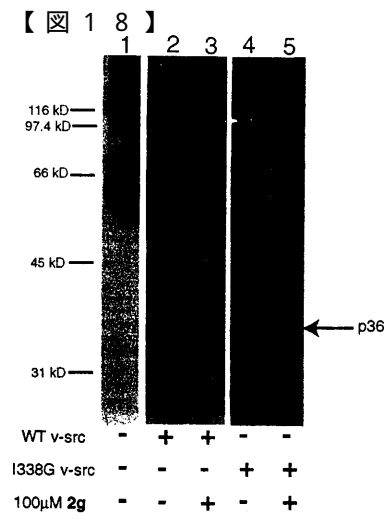


Figure 18

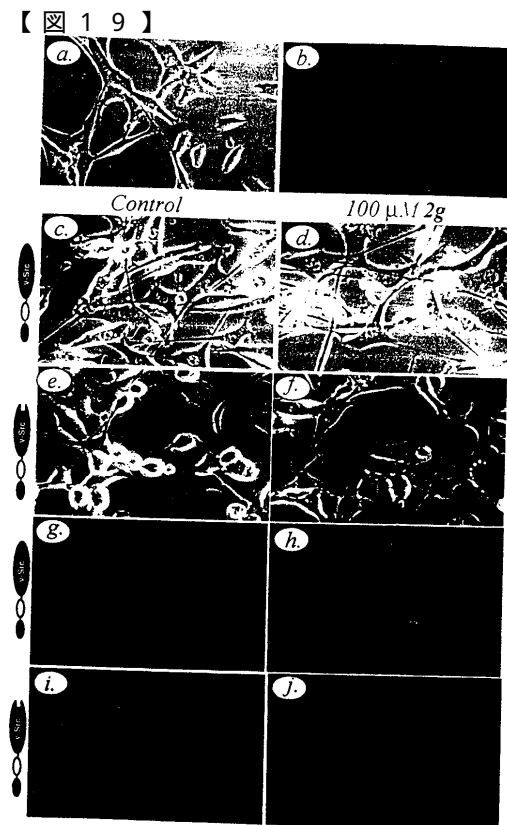


Figure 19

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 竹内 英人

(74)代理人

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人

弁理士 小川 信夫

(74)代理人

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 ショカト ケヴィン エム

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08544 プリンストン レイク レーン 40

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res., 1996, Vol.37, page 467

Science, 1993, Vol.259, No.5099, pages 1311-4

FASEB J., 1996, Vol.10, No.6, page A1261, 1514

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1995, Vol.34, No.19, pages 2129-32

J. Biol. Chem., 1996, Vol.271, No.37, pages 22619-23

Structure, 1995, Vol.2, No.5, pages 345-55

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09 ZNA

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed