

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4932835号
(P4932835)

(45) 発行日 平成24年5月16日 (2012. 5. 16)

(24) 登録日 平成24年2月24日 (2012. 2. 24)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/48 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/48 Z N A Z
G O 1 N 33/48 (2006. 01)	G O 1 N 33/48 Z

請求項の数 21 (全 91 頁)

(21) 出願番号	特願2008-516285 (P2008-516285)	(73) 特許権者	505022105
(86) (22) 出願日	平成18年6月7日 (2006. 6. 7)		セルゾーム・アクチェンゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2008-543296 (P2008-543296A)		C E L L Z O M E A G
(43) 公表日	平成20年12月4日 (2008. 12. 4)		ドイツ、6 9 1 1 7 ハイデルベルク、マ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/062984		イヤーホーフシュトラッセ、1
(87) 国際公開番号	W02006/134056	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成18年12月21日 (2006. 12. 21)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成21年2月18日 (2009. 2. 18)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	05012722. 4		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成17年6月14日 (2005. 6. 14)	(74) 代理人	100080137
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 千葉 昭男
(31) 優先権主張番号	60/711, 399	(74) 代理人	100096013
(32) 優先日	平成17年8月25日 (2005. 8. 25)		弁理士 富田 博行
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128750
			弁理士 廣瀬 しのぶ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素と相互作用する新規化合物の同定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一つの酵素を特徴付けるための方法であって、

- a) 該酵素を含有する少なくとも一つの細胞をそれぞれ含んでなる二つのアリコットを提供し；
- b) 一方のアリコットを、リガンドと異なる所与の化合物とともにインキュベートし；
- c) 細胞を回収し；
- d) 細胞を溶解させ；
- e) 本質的に生理学的な条件下にある細胞溶解物を、該酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下で、一つの固体担体上に固定化した少なくとも二つの異なる広範囲性酵素リガンドと接触させ；
- f) 酵素を溶出させ；そして、
- g) 溶出した酵素を定量的質量分析によって特徴付ける；
- 工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 2】

少なくとも一つの酵素を特徴付けるための方法であって、

- a) 該酵素を含有する二つのアリコットのタンパク質調製物を提供し；
- b) 本質的に生理学的な条件下にある一方のアリコットを、該酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下で、一つの固体担体上に固定化した少なくとも二つの異なる広範囲性酵素リガンドと接触させ；

- c) 本質的に生理学的な条件下にあるもう一方のアリコットを、該酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下で、一つの固体担体上に固定化した少なくとも二つの異なる広範囲性酵素リガンドと、ならびにリガンドと異なる所与の化合物と接触させ；
- d) 該酵素（単数または複数）を溶出させ；そして、
- e) 溶出した酵素（単数または複数）を定量的質量分析によって特徴付ける；
- 工程を含んでなり、

ここで、化合物とともにインキュベートされたアリコットにおける酵素の低下した検出は、該酵素が化合物の直接的な標的であることを示す、
前記方法。

【請求項 3】

10

工程 a) におけるタンパク質調製物の提供が、該酵素を含有する少なくとも一つの細胞を回収し、そして細胞を溶解させる工程を含む、請求項 2に記載の方法。

【請求項 4】

ミディウムもしくはハイスルーブットスクリーニングとして行う、請求項 1～3 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 5】

前記化合物が、合成化合物、有機合成薬物、および天然小分子化合物からなる群より選択される、請求項 1～4 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 6】

酵素が、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、ホスホジエステラーゼ、ヒドロゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ、リガーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、GTPアーゼ、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼおよびヘリカーゼからなる群より選択される、請求項 1～5 のいずれかの項に記載の方法。

20

【請求項 7】

リガンドが、所与の酵素クラスの酵素の 10%～50%と結合する、請求項 1～6 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 8】

リガンドが、所与の酵素クラスの酵素の 30%～50%と結合する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

30

リガンドが阻害剤である、請求項 1～8 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 10】

酵素がキナーゼであって、かつ、リガンドが、ビスインドールマレイミドVIII、プルバラノール B、CZC00007324（連結可能なPD173955）およびCZC00008004からなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

酵素の特徴付けを、共溶出した酵素の結合パートナー、酵素サブユニット、または酵素の翻訳後修飾を特徴付けることによって行う、請求項 1～10 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 12】

40

特徴付けを、酵素または酵素の結合パートナーのプロテオタイピックペプチドの同定によって行う、請求項 1～11 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 13】

特徴付けを、酵素または結合パートナーに対して得られるプロテオタイピックペプチドを、公知のプロテオタイピックペプチドと比較することによって行う、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

固体担体が、アガロース、修飾アガロース、セファロースビーズ（例えば、NH₂活性化セファロース）、ラテックス、セルロース、および強磁性もしくはフェリ磁性粒子からなる群より選択される、請求項 1～13 のいずれかの項に記載の方法。

50

【請求項 15】

広範囲性酵素リガンドを、固体担体に共有的連結させる、請求項 1 ～ 14 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 16】

2 ～ 10 の異なるリガンドを用いる、請求項 1 ～ 15 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 17】

2 ～ 6 の異なるリガンドを用いる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

2 ～ 4 の異なるリガンドを用いる、請求項 16 または 17 のいずれかの項に記載の方法

。

10

【請求項 19】

酵素または化合物－酵素複合体を特徴付けることにより、細胞内の酵素クラスのすべてまたは一部のメンバーの同一性を決定する、請求項 1 ～ 18 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 20】

リガンドと酵素との結合が非共有結合である、請求項 1 ～ 19 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 21】

それぞれの広範囲性酵素リガンドが、細胞中に若しくはタンパク質調製物中に存在する一部の、しかしすべてではない酵素と結合することが可能である、請求項 1 ～ 20 のいずれかの項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、固体担体に結合させた酵素リガンドを用いた、酵素または酵素－化合物複合体を特徴付けるための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ドラッグディスカバリーの目的は、有効かつ安全な薬剤を開発することである。この目的を達成するために、医薬研究は、目的とする疾患の原因であることが公知の薬物標的に対する、好ましくは小分子薬物を同定することを、目指す。

30

【0003】

従来、小分子薬物の大部分は、受容体タンパク質（Gタンパク質共役受容体（GPCR）などの細胞膜受容体または核内ホルモン受容体）、イオンチャネルおよび酵素に対するものである。特に目的とする酵素は、例えば、プロテアーゼ、ホスホジエステラーゼおよびキナーゼである（総説：Drews, 2000, “Drug discovery: a historical perspective”, Science 287, 1960-1964）。

【0004】

プロテアーゼは、HIVプロテアーゼ阻害剤によるAIDSの有効な管理、または高血圧を治療するためのアンギオテンシン変換酵素阻害剤の使用によって実証されるように、扱いやすい薬物標的と考えられている。癌の治療に関しては、マトリックスメタロプロテイナーゼおよびカスパーゼに対するプロテアーゼ阻害剤が、開発中である（Docherty et al., 2003, “Proteases as drug targets”, Biochemical Society Symposia 70, 147-161）。

40

【0005】

ホスホジエステラーゼ（PDE）は、cAMPまたはcGMPの加水分解を触媒する酵素ファミリーを含んでなり、かつ、種々の疾患に関与する。PDE5阻害剤であるシルデナフィル（バイアグラ）は、勃起不全に対して有効な治療を提供する。現在、PDE4阻害剤（例えば、cilomastおよびroflumast）は、抗炎症治療剤として臨床試験中である。この分野における大きな課題は、副作用に関与する交差反応性を避けるための、PDEア

50

イソタイプ特異的阻害剤の開発である (Card et al., 2004, “Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases”, Structure 12, 2233-2247)。

【0006】

キナーゼは、タンパク質、脂質、糖、ヌクレオシドおよび他の細胞代謝物のリン酸化を触媒し、かつ、真核細胞の生理学のすべての側面において重要な役割を果たしている。タンパク質のリン酸化は、よく知られたタンパク質の翻訳後修飾であって、かつ、多くの経路においてタンパク質の構造および機能に影響を及ぼす。

【0007】

ドラッグディスカバリーの最近の焦点となったあるキナーゼクラスは、プロテインキナーゼを含んでなるが、これは、それらが、シグナル伝達経路の調節異常を介して、腫瘍の開始および進行に重要な役割を果たすことが示されたためである (EGF receptor in lung cancer; overexpression of the ErbB2/Her-2 receptor in breast cancer; BCR-ABL fusion protein in leukemia; 総説: Blume-Jensen and Hunter, 2001, “Oncogenic kinase signaling”, Nature 411, 355-365)。

10

【0008】

ヒトゲノム中にコードされるプロテインキナーゼの補完物 (complement) は、配列類似性によっていくつかのサブファミリーに分類されることが可能な 518 のファミリーメンバー (キノーム) を含んでなる (総説: Manning et al., 2002, The Protein Kinase Complement of the Human Genome, Science 298, 1912-1934)。いずれの所与の細胞もしくは組織においても、1 サブセットのみのキノームが発現する。キナーゼは、リン酸基を ATP から基質分子へと移行させることによって、それらの標的の安定性、活性および機能に影響を及ぼす。異なるキナーゼの ATP 結合ポケットは構造的に類似し、そしてしたがって、選択的な ATP 競合的阻害剤を開発することは難しいと考えられる。

20

【0009】

キナーゼファミリーは、(例えばホスホジエステラーゼなどの、薬物標的として関連がある他の酵素クラスと比較して) 非常に大きな酵素ファミリーであって、ドラッグディスカバリーに多くの機会を提供するが、しかしユニークな課題 (大きなサイズのファミリー; ATP 結合ポケットの構造的類似性; 高濃度の細胞内 ATP) もまた提供する (総説: Cohen, P., 2002, Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? Nature Reviews Drug Discovery, 第1巻, 309-315)。

30

【0010】

目的とする別のキナーゼクラスは、脂質キナーゼである。脂質キナーゼは、 γ -リン酸基をヌクレオシド三リン酸から脂質基質へと移行させる。

ホスホイノシチド 3-キナーゼ (PI3K) ファミリーメンバーなどの脂質キナーゼは、成長因子、ホルモンおよび神経伝達物質のモジュレーターであることが公知であり、かつ、癌、糖尿病および他の疾患に関与する (Fruman et al., 1998, Phosphoinositide kinases. Annual Review Biochemistry 67, 481-507; Cantley, L.C., 2002, Science 296, 1655-1657)。

【0011】

40

例えば酵素などのタンパク質と相互作用する化合物を同定するための、ある必須条件は、あるクラスのタンパク質をできる限り多く高純度にて含有するタンパク質調製物の提供である。特に、あるクラスの多くのタンパク質 (例えば、キナーゼ) の提供は、このことがタンパク質ファミリーの多くのメンバーに対して潜在的、医薬的に興味深い化合物のスクリーニングを可能にすることから、重要である (いわゆる、ヒット同定)。このようなタンパク質調製物の他の実行可能な使用には、化学的に最適化された化合物の検査 (リード最適化)、所与の化合物の選択性の決定 (選択性プロファイリング)、ならびに所与の化合物の作用機序の確認が含まれる。

【0012】

当該技術分野において、いくつかのストラテジーが、この場合を評価するために提案さ

50

れている。

キナーゼなどのA T P結合タンパク質、および他のヌクレオチド結合タンパク質を細胞抽出物から濃縮するための一つのアプローチは、アフィニティ試薬として固定化したA T P、すなわち、潜在的にすべてのA T P結合酵素を結合するリガンドの使用に依存する。この場合、A T Pは、 γ -リン酸基をリンカーを介してレジンと連結させることによって、A T Pを共有結合により固定化する(Graves et al., 2002, Molecular Pharmacology 62, No. 6 1364-1372; US 5536822)。このアプローチは、コンビナトリアル化合物ライブラリのうちの一つの化合物を連結させることへと、さらに広げられた(W000/63694)。

【0013】

固定化したA T Pの一つの不利点は、キナーゼに対する親和性がやや低く、キナーゼの不十分な捕捉、または高い解離速度による急速な溶出をもたらすことである。別の不利点は、キナーゼが選択的に捕捉されず、細胞内にかなり高いレベルで発現している可能性のある他のクラスのA T P結合タンパク質もまた捕捉されることである。より豊富なA T P結合タンパク質は、競合による不十分な捕捉をもたらす可能性があり、あるいは、分析の深さが十分でないならば、結合したタンパク質の質量分析解析中に問題をもたらす可能性がある。

【0014】

当該技術分野において記載される別のアプローチは、個々の酵素に特異的なリガンド、すなわち、高親和性かつ高選択性のキナーゼ阻害剤またはそれに近い誘導体(例えば、最適化された薬物)の使用である。これらは、キナーゼを細胞溶解物から濃縮するために用いられ、そして、同じ非修飾化合物は、細胞薬物標的(単数もしくは複数)を同定するための特異的溶出に用いられる(Godl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 15434-15439; WO 2004/013633)。このアプローチは、構造-親和性相関(SAR)が薬物の化学的修飾を介して壊されない場合にのみ成功するが、しかし、SARが損なわれる場合には失敗する。加えて、望ましくない副作用を媒介する標的を同定することは、対応する薬物標的と副作用標的とのSARが異なる可能性があり、かつ後者のSARは通常は公知でないために、難しい。

【0015】

別の戦略は、所与のクラスの酵素、例えばキナーゼの*in vitro*発現である。Fabianら(Fabian et al., 2005, Nature Biotechnology 23(3), 329-336; WO 030 84981)は、細胞溶解物に含有される内因性キナーゼの捕捉に依存せず、バクテリオファージT7上に提示されるキナーゼを使用する、キナーゼプロファイリング方法について記載している。このアッセイに用いられるキナーゼ(またはキナーゼドメイン)は、発現、精製および検出を可能にするためにタグを付けた融合タンパク質である。競合的結合アッセイにおいて、これらのファージタグ付きキナーゼを、固定化したキナーゼ阻害剤に結合させ、固定化していない試験化合物で処理し、そして、結合したタグ付きキナーゼを、ファージDNAを鋳型として用いてリアルタイムPCRにより定量する。この方法の不利点は、キナーゼをクローニングしなければならない、そして、ごく一部のファージタグ付きキナーゼのみが正しい天然状態にて折り畳まれることである。さらに、このようなタンパク質調製物は、細胞内での自然状況を全く反映しない。

【0016】

さらに別のアプローチは、標的酵素と共有結合を形成する、活性部位特異的プローブ(いわゆる活性ベースのプローブ)を用いる。この方法は、セリンヒドロラーゼの発現を高選択性プローブを用いてプロファイリングするために用いられ(Liu et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 14694-14699, WO 01/77668)、そして、ローダミンおよびビオチンタグ付き蛍光スルホン酸エステルの非特異的な活性ベースのプローブライブラリからなるより無差別のプローブを用いることによって、他の酵素ファミリーへとさらに拡充される(Adam et al., 2002, Nature Biotechnology 20, 805-809, WO 01/77684, WO 03/04 7509)。しかしながら、どの構造および/または触媒特性がこれらのスルホン酸を標的とする酵素によって共有されるのかは、はっきりしないままである。このアプローチを限定

10

20

30

40

50

する別のものは、酵素との特異的相互作用と、プローブの固有の反応性によって引き起こされる非特異的相互作用とを、区別することの難しさである。

【0017】

最後に、チロシン特異的抗体によってチロシンがリン酸化されているタンパク質を濃縮することが、試みられた (Blogoev et al., 2004, Nature Biotechnology 9, 1139-1145)。Blogoevらは、上皮成長因子 (EGF) などの化合物がホスホチロシン依存性シグナル伝達経路に及ぼす影響を研究するために用いられることが可能な方法について、記載している。EGFにより刺激された細胞を溶解後、ホスホチロシン含有タンパク質を、ホスホチロシンに対する抗体を用いた免疫沈降によって濃縮する。第二の工程において、これらの濃縮されたタンパク質を、質量分析解析によって分析および同定する。このアプローチを大きく限定する一つのは、チロシンがリン酸化されているタンパク質のみが捕捉可能なことである。

10

【0018】

このことを考慮して、細胞内に発現している所与のクラスのそれらの酵素を特徴付けるための方法を改良する必要がある。さらに、所与の化合物の結合パートナーである酵素を同定するための方法を改良する必要がある。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明は、これらの必要性を満たす。本発明の文脈において、固体担体上に固定化した少なくとも一つの広範囲性酵素リガンド (broad spectrum enzyme ligand) の使用は、タンパク質調製物、好ましくは細胞溶解物からの酵素の効率的な単離を可能にする。この単離後に、有効な方法を、広範囲性酵素リガンドに結合した酵素の特徴付け、あるいは化合物と酵素との相互作用の同定に適用することが可能である。酵素は好ましくは質量分析法によって同定される。したがって、本発明は、酵素の特徴付け、あるいは所与の化合物との結合パートナーの同定のための、有効な方法を提供する。

20

【0020】

第一の側面では、本発明は、少なくとも一つの酵素を特徴付けるための方法であって、
a) 好ましくは、該酵素を含有する少なくとも一つの細胞を回収し、そして細胞を溶解させることによって、該酵素を含有するタンパク質調製物を提供し；
b) 本質的に生理学的な条件下にあるタンパク質調製物を、該酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下で、固体担体上に固定化した少なくとも一つの広範囲性酵素リガンドと接触させ；
c) 該酵素を溶出させ；そして、
d) 溶出した酵素を質量分析によって特徴付ける；
工程を含んでなる前記方法を、提供する。

30

【0021】

第二の側面では、本発明は、少なくとも一つの酵素を特徴付けるための方法であって、
a) 該酵素を含有する少なくとも一つの細胞をそれぞれ含んでなる二つのアリコットを提供し；
b) 一方のアリコットを所与の化合物とともにインキュベートし；
c) 細胞を回収し；
d) 細胞を溶解させ；
e) 本質的に生理学的な条件下にあるタンパク質調製物を、該酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下で、固体担体上に固定化した少なくとも一つの広範囲性酵素リガンドと接触させ；
f) 該酵素 (単数もしくは複数) を溶出させ；そして、
g) 溶出した酵素 (単数もしくは複数) を質量分析によって特徴付ける；
工程を含んでなる前記方法を、提供する。

40

【0022】

50

本発明の第三の側面によると、本発明は、少なくとも一つの酵素を特徴付けるための方法であって、

- a) 好ましくは、該酵素を含有する少なくとも一つの細胞を回収し、そして細胞を溶解させることによって、該酵素を含有する二つのアリコットのタンパク質調製物を提供し；
 - b) 本質的に生理学的な条件下にある一方のアリコットの、酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下で、固体担体上に固定化した少なくとも一つの広範囲性酵素リガンドと接触させ；
 - c) 本質的に生理学的な条件下にあるもう一方のアリコットの、該酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下で、固体担体上に固定化した少なくとも一つの広範囲性酵素リガンドと、ならびに所与の化合物と接触させ；
 - d) 該酵素（単数もしくは複数）を溶出させ；そして、
 - e) 溶出した酵素を質量分析によって特徴付ける；
- 工程を含んでなる前記方法を、提供する。

【0023】

本発明の第四の側面によると、酵素－化合物複合体を特徴付けるための方法であって、

- a) 好ましくは、該酵素を含有する少なくとも一つの細胞を回収し、そして細胞を溶解させることによって、該酵素を含有するタンパク質調製物を提供し；
 - b) 本質的に生理学的な条件下にあるタンパク質調製物を、該酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下で、固体担体上に固定化した少なくとも一つの広範囲性酵素リガンドと接触させ；
 - c) 結合した該酵素を化合物と接触させて、少なくとも一つの結合した該酵素を遊離させ；そして、
 - d) 遊離した該酵素（単数もしくは複数）を質量分析によって特徴付ける；かまたは、
 - e) 該酵素（単数もしくは複数）をリガンドから溶出させ、そして該酵素（単数もしくは複数）を質量分析によって特徴付けることによって、該化合物の1またはそれより多くの結合パートナーを同定する；
- 工程を含んでなる前記方法が、提供される。

【0024】

上記のアプローチ、特に第四の側面による発明の方法は、以下の利点を有する：

- － 酵素の *in vitro* 発現を必要とせず、細胞溶解物由来の内因性酵素を用いる。
- － 意外にも、広域特異性キナーゼリガンドは、非常に効率的にキナーゼを捕捉することが見いだされた。
- － 試験化合物は、連結または固定化される必要がない（非標識アッセイ方法）。

【0025】

競合的結合もしくは溶出は、目的とするいずれの化合物（非修飾、非固定化）を用いても可能である。

- － （生化学的酵素アッセイのように）酵素基質を必要としない。
- － シグナル伝達経路上での化合物の *in vivo* 効果の特徴付けることが可能である（第二の側面を参照されたい）。
- － 直接および間接的な標的の同定が可能である。

【0026】

発明全体にわたり、「酵素」の語には、トランスポーター、イオンチャネル、およびペプチド相互作用ドメイン（例えば、SH2、SH3およびPDZドメイン）を含有するアダプタータンパク質などの酵素と相互作用するタンパク質などのリガンドと結合することが可能な、細胞内のすべてのタンパク質またはペプチドもまた含まれる。

【0027】

しかしながら、好ましくは、「酵素」の語は、通常は、細胞内の生体触媒であると解釈される。

発明全体にわたり、「広範囲性酵素リガンド」の語は、タンパク質調製物中に存在する一部の、しかしすべてではない酵素と結合することが可能なリガンドを指す。

【0028】

本発明は、好ましくは、酵素の特徴付け、または所与の化合物との結合パートナーの同定のための方法であって、酵素または結合パートナーが細胞溶解物内に含まれる該方法を、提供する。しかしながら、本発明の方法は、タンパク質（単数もしくは複数）が調製物中で可溶化されているならば、出発材料として任意のタンパク質調製物を用いて行うこともまた可能である。その例には、複数のタンパク質の液体混合物、元の細胞内に存在するすべてのタンパク質を含有するわけではない部分的な細胞溶解物、または複数の細胞溶解物の組み合わせが、含まれる。

【0029】

部分的な細胞溶解物を、まず細胞小器官（例えば、核、ミトコンドリア、リボソーム、ゴルジ等）を単離することによって得て、そして次いで、これらの小器官由来のタンパク質調製物を調製することが可能である。細胞小器官を単離するための方法は、当該技術分野において公知である（第4.2章、Purification of Organelles from Mammalian Cells、"Current Protocols in Protein Science" 編者：John.E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8）。

10

【0030】

加えて、タンパク質試料を、細胞抽出物の分画によって調製し、それにより、細胞質タンパク質または膜タンパク質などの特定の型のタンパク質を濃縮することが可能である（第4.3章、Subcellular Fractionation of Tissue Culture Cells、"Current Protocols in Protein Science" 編者：John.E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8）。

20

【0031】

さらに、体液由来のタンパク質調製物を用いることが可能である（例えば、血液、脳脊髄液、腹腔液および尿）。

本発明全体にわたり、「固体担体」の語は、広範囲性酵素リガンドをその表面上に固定化することが可能な、すべての溶解されない担体に関する。

【0032】

第二の側面による本発明の方法は、最初の工程として、酵素を含有する少なくとも一つの細胞をそれぞれ含んでなる二つのアリコットを提供し、そして一方のアリコットを所与の化合物とともにインキュベートすることを、包含する。好ましい実施態様において、少なくとも一つの細胞は、少なくとも二つのアリコットに分割される細胞培養系の一部である。次いで、細胞の一方のアリコットを、所与の化合物とともにインキュベートする。細胞培養系を化合物とともにインキュベートするための方法は、当該技術分野において公知である（Giuliano et al., 2004, "High-content screening with siRNA optimizes a cell biological approach to drug discovery: defining the role of p53 activation in the cellular response to anticancer drugs". Journal of Biomolecular Screening 9(7), 557-568）。

30

【0033】

しかしながら、各アリコットの少なくとも一つの細胞が、例えばマウス系または下等脊椎動物系などの *in vivo* 系の一部であることもまた、本発明内に含まれる。

40

例えば、線虫 (*C. elegans*) などのモデル生物体の規定の発達期または成虫期に由来する全胚溶解物を用いることが可能である。加えて、マウスから解剖された心臓などの全器官は、タンパク質調製物の源であることが可能である。これらの器官を、*in vitro* で灌流し、そして目的とする試験化合物または薬物で処理することもまた可能である。

【0034】

少なくとも好ましい実施態様において、本発明のすべての方法には、酵素を含有する少なくとも一つの細胞を回収し、そして細胞を溶解する工程が、含まれる。

好ましい実施態様において、細胞は、細胞培養系の一部であり、そして、細胞培養系から細胞を回収するための方法は、当該技術分野において公知である（同上文献）。

50

【0035】

細胞の選択は、主に、解析される酵素クラスによるであろうが、これは、その酵素クラスが選択された細胞内に主として存在することが保証されなければならないためである。所与の細胞が、本発明の方法に適した出発系であるかどうかを決定するために、ウェスタンブロット、PCRベースの核酸検出法、ノーザンブロットおよびDNAマイクロアレイ法（「DNAチップ」）のような方法が、所与の酵素クラスが細胞内に存在するかどうかを決定するために適している可能性がある。

【0036】

細胞の選択は、研究目的によっても影響を受けるであろう。所与の薬物に対する *in vivo* 標的を同定する必要があるならば、所望の治療効果が生じる細胞または組織を選択することになる（例えば、抗癌剤に対しては乳癌組織）。対照的に、望ましくない副作用を媒介するタンパク質標的を解明するためには、副作用が認められる細胞または組織を解析することになる（例えば、CNS副作用に対しては脳組織）。

10

【0037】

さらに、酵素を含有する細胞を、例えば生検によって生物体から得てもよいことが、本発明内に想定される。対応する方法は、当該技術分野において公知である。例えば、生検は、少量の組織を得るために用いられる診断手順であって、該組織は、次いで、顕微鏡または生化学的方法により検査可能である。生検は、疾患を診断、分類および病期分類するために重要であり、さらに、薬物治療を評価およびモニターするためにも重要である。乳癌生検は、以前は外科的手順として行われていたが、しかし今日では、針生検が好ましい（Oyama et al., 2004, Breast Cancer 11(4), 339-342）。

20

【0038】

記載された本発明の方法により、酵素クラスの存在について組織試料をプロファイルすることが可能となる。例えば、疾患の原因となる変異酵素を同定することが可能である（例えば、発癌性キナーゼを活性化する点変異）。加えて、治療中に生じ、かつ治療耐性に関与する変異酵素を、明らかにすることが可能である（例えば、抗癌剤に対する耐性を引き起こすEGF受容体変異）。

【0039】

肝生検は、例えば、肝酵素活性の上昇に起因する肥大肝または異常肝との試験結果をもたらす慢性肝疾患の原因を診断するために、用いられる（Rocken et al., 2001, Liver 21(6), 391-396）。

30

【0040】

少なくとも一つの細胞の回収と同時に溶解を行うことが、本発明内に包含される。しかしながら、細胞を、まず回収し、そして次いで別々に溶解することも、同様に好ましい。

細胞の溶解方法は、当該技術分野において公知である（Karwa and Mitra: Sample preparation for the extraction, isolation, and purification of Nuclei Acids; "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry" 第8章、Wiley 2003、編者：Some Nath Mitra、印刷物ISBN: 0471328456；オンラインISBN: 0471457817）。異なる細胞型および組織の溶解を、ホモジナイザー（例えば、ポッターホモジナイザー）、超音波ディスイнтеグレーター、酵素溶解、界面活性剤（例えば、NP-40、Triton X-100、CHAPS、SDS）、浸透圧ショック、冷解凍の繰り返し、またはこれらの方法の組み合わせによって成し遂げることが可能である。

40

【0041】

さらに、本発明のすべての方法は、本質的に生理学的な条件下にある細胞調製物または細胞溶解物を、酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下で、固体担体上に固定化した少なくとも一つの広範囲性酵素リガンドと接触させる工程を、含有する。

【0042】

本質的に生理学的な条件下での接触は、リガンド、細胞調製物（すなわち、特徴付ける酵素）、および所望により化合物の間の相互作用が可能な限り自然条件を反映するという利点を、有する。「本質的に生理学的な条件」は、とりわけ、元の未処理の試料材料にお

50

いて存在するそれらの条件である。それらには、生理学的タンパク質濃度、pH、塩濃度、バッファー容量および関与するタンパク質の翻訳後修飾が含まれる。「本質的に生理学的な条件」の語は、試料が由来する元の生物体におけるものと同じの条件を必要としないが、しかし、基本的には細胞様条件または細胞条件に近い条件を必要とする。当業者は、特定の制限が、最終的にはより細胞様条件でなくなるであろう実験セットアップによって生じる可能性があることを、当然ながら認識するであろう。例えば、生物体から試料を採取し、そして処理するときの細胞壁もしくは細胞膜の最終的に必要な破壊には、生物体に見いだされる生理学的条件と同一でない条件が必要とされる可能性がある。本発明の方法を実行するための生理学的条件の適切なバリエーションは、当業者には明らかであろうし、かつ、本明細書では「本質的に生理学的な条件」の語により包含される。要約すれば、

「本質的に生理学的な条件」の語は、例えば自然細胞に見いだされるような、生理学的条件に近い条件に関連するが、しかし、これらの条件が同一であることを必ずしも必要としないことが、理解されよう。

10

【0043】

好ましくは、「本質的に生理学的な条件」は、50～200mM NaClまたはKCl、pH 6.5～8.5、20～45℃、および0.001～10mM 二価陽イオン（たとえば、Mg⁺⁺、Ca⁺⁺）；より好ましくは、約150mM NaClまたはKCl、pH 7.2～7.6、5mM 二価陽イオンであり、かつ、0.01～1.0% 非特異的タンパク質（例えば、BSA）を含んでいてよい。非イオン性界面活性剤（Tween、NP-40、Triton-X100）は、多くの場合、通常は約0.001～2%、典型的には0.05～0.2%（容積／容積）にて存在することが可能である。一般的なガイダンスとして、以下の緩衝水性条件を適用してもよい：10～250mM NaCl、5～50mM Tris HCl、pH 5～8、所望により、二価陽イオンおよび／または金属キレート剤および／または非イオン性界面活性剤を添加。

20

【0044】

好ましくは、「本質的に生理学的な条件」は、6.5～7.5、好ましくは7.0～7.5のpH、および／または、10～50mM、好ましくは25～50mMのバッファー濃度、および／または、120～170mM、好ましくは150mMの一価塩（例えば、NaまたはK）を意味する。さらに、二価塩（例えば、MgまたはCa）は、1～5mM、好ましくは1～2mMの濃度にて存在してもよく、ここで、より好ましくは、バッファ

30

【0045】

本発明の文脈において、「酵素と広範囲性酵素リガンドとの結合を可能にする条件下」の語には、このような結合が可能であるすべての条件が含まれる。これには、固体担体を固定化された相上に有し、そして溶解物をその上に流し込む可能性が含まれる。別の好ましい実施態様では、固体担体が、粒子状であって、かつ細胞溶解物と混合されることもまた、含まれる。

【0046】

好ましい実施態様において、リガンドと酵素との結合は、非共有性の可逆性結合であって、例えば、塩橋、水素結合、疎水性相互作用またはそれらの組み合わせである。

40

さらに、本発明の方法には、酵素（単数もしくは複数）を固体担体上に固定化したリガンドから溶出させる工程が、含まれる。

【0047】

このような方法は、主として当該技術分野において公知であり、かつ、リガンド酵素相互作用の性質に依存する。主として、イオン強度、pH値、温度の変化または界面活性剤とのインキュベーションは、標的酵素を固定化したリガンドから解離させるのに適した方法である。溶出バッファーの適用により、pH値の極端化（高または低pH；例えば、0.1Mクエン酸、pH 2～3を用いることにより、pHを下げる）、イオン強度の変化（例えば、NaI、KI、MgCl₂またはKClを用いた高塩濃度）、疎水性相互作用を壊す極性低下剤（例えば、ジオキサンまたはエチレングリコール）、あるいは変性剤（例

50

えば、カオトロピック塩、または、硫酸ドデシルナトリウム、S D Sなどの界面活性剤；
総説：Subramanian A., 2002, Immunoaffinity chromatography. Mol. Biotechnol. 20(1), 41-47) によって、結合パートナーを遊離することが可能である。

【0048】

これらのやや非特異的な方法によって、ほとんどまたはすべての結合したタンパク質を遊離することとなり、そして次いで、質量分析によって（あるいは、抗体を用いた検出により、以下を参照されたい）分析される必要がある。

【0049】

本発明の第四の側面による方法には、少なくとも一つの結合した酵素を遊離させるために、結合した酵素を化合物と接触させる工程が、さらに含まれる。この接触は、好ましくは、本質的に生理学的な条件下でも行われる。

10

【0050】

溶出のために、上述の非特異的試薬ではなく目的とする化合物を用いることの一つの利点は、すべての結合したタンパク質が遊離するわけではなく、副画分、好ましくは目的とする酵素クラスのみが遊離することである。結論として、質量分析による同定に必要なタンパク質がより少なく、目的とする酵素クラスに対して、より迅速な分析およびより深い分析（感度）が得られる。

【0051】

当業者は、本発明の方法の個々の工程間で、洗浄工程が必要である可能性があることを、理解するであろう。このような洗浄は、当業者の知識の一部である。洗浄は、細胞溶解物の結合していないコンポーネントを固体担体から除去する働きをする。非特異的（例えば、単純イオン）結合相互作用を、低レベルの界面活性剤を加えるか、または洗浄バッファ中の塩濃度を中程度に調整することによって、最小限にすることが可能である。

20

【0052】

一部の場合においては、溶出または接触後に、固体担体を、好ましくは、遊離した材料から分離しなければならない。これに関する個々の方法は、固体担体の性質に依存し、かつ、当該技術分野において公知である。担体材料がカラム内に含有されるならば、遊離材料を、カラムのフロースルーとして収集することが可能である。担体材料が、溶解物コンポーネントと混合されている場合（いわゆる、バッチ手順）、穏やかな遠心分離などのさらなる分離工程が必要な可能性があり、そして、遊離した材料を上清として収集する。あるいは、磁気装置を用いることによってビーズを試料から除去できるよう、電磁ビーズを固体担体として用いることが可能である。

30

【0053】

本発明によると、溶出した酵素（単数もしくは複数）、または共溶出した結合パートナー（以下を参照されたい）、ならびに、本発明の第四の側面の方法による遊離した酵素を、好ましくは、質量分析によって特徴付ける。あるいは、各々の酵素または共溶出した結合パートナーに対する特異抗体を用いてこの特徴付けを行うこともまた、本発明全体にわたり可能である。

【0054】

質量分析解析（質量分析）は、当該技術分野において公知であり（Shevchenko et al., 1996, Analytical Chemistry 68: 850-858, Mann et al., 2001, Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry, Annual Review of Biochemistry 70, 437-473）、そして、これを実施例の区分でさらに例示する。

40

【0055】

質量分析解析に代わるものとして、溶出した酵素（単数もしくは複数）（例えば、酵素サブユニットまたは足場タンパク質などの、共溶出した結合パートナーを含む）を、目的とするタンパク質に対する特異抗体を用いることによって、検出することが可能である。

【0056】

さらに、別の好ましい実施態様では、溶出した酵素（単数もしくは複数）の同定が質量分析解析によって確立されているならば、目的とするそれぞれの酵素を、その酵素に対す

50

る特異抗体を用いて検出することが可能である。

【0057】

適切な抗体ベースのアッセイには、これに限定されないが、ウエスタンブロット、ELISAアッセイ、サンドイッチELISAアッセイおよび抗体アレイ、またはそれらの組み合わせが含まれる。このようなアッセイの確立は、当該技術分野において公知である（Chapter 11, Immunology, "Short Protocols in Molecular Biology 第4版" 11-1~11-30頁、F.M. Ausubel et al.による編集、Wiley、ニューヨーク州、1999）。

【0058】

複数のアッセイを、例えば酵素ファミリーの多くのメンバーに対する、いくつかの抗体を並行して用いて行うことが可能である（Pelch et al., Kinetworks Protein Kinase Mu
ltiblot analysis. "Cancer Cell Signalling" 第8章、99~112頁、Methods and Protoco
ls. 編者：David M. Terrian. Humana Press, Totowa、米国、2002）。

10

【0059】

これらのアッセイを、目的とする酵素を検出および定量するためのみならず、リン酸化などの翻訳後修飾のパターンを分析するための方法においても、設定することが可能である。例えば、キナーゼの活性化状態を、そのリン酸化状態を抗ホスホチロシン、抗ホスホセリンまたは抗ホスホスレオニン特異抗体でプローブすることによって決定することが可能である。このような抗ホスホ抗体をどのように選択し、そして用いるかは、当該技術分野において公知である（Zhang et al., 2002. Journal of Biological Chemistry 277, 4
3648-43658）。

20

【0060】

第二の側面による本発明の方法の好ましい実施態様によると、酵素を特徴付けることによって、化合物の投与が酵素の差次的発現または活性化状態をもたらすかどうか決定される。したがって、化合物の投与により、酵素の発現が変化する可能性があり、あるいは、酵素の活性化状態が変化する可能性がある。

【0061】

この文脈において、酵素の発現の変化とは、好ましくは、より多いかまたはより少ない酵素が細胞内で産生されることを、意味してもよい。

活性化状態の変化とは、化合物の投与後に酵素がより活性となるか、または化合物の投与後により活性でなくなるかのいずれかを、好ましくは意味する。これはまた、固定化したリガンドに対する酵素の親和性が増加または減少することも、意味する（例えば、上流のキナーゼによるリン酸化を介したキナーゼの活性化状態の変化；または、酵素のアロステリック調節面に化合物が結合することによる、ATP結合酵素のATP結合ポケットのコンフォメーション変化）。

30

【0062】

第一の側面による本発明の方法の好ましい実施態様によると、タンパク質調製物を、好ましくは本質的に生理学的な条件下で、以下に定義する化合物とともにインキュベートする。結論としては、化合物に結合していない酵素のみが、続いて、リガンドと結合し、溶出され、そして特徴付けられる。

【0063】

本発明の第三の側面による方法の好ましい実施態様によると、工程c)において、アリコットを、好ましくは本質的に生理学的な条件下で、リガンドとともにインキュベートする前に、化合物と接触させる。結論としては、化合物に結合していない酵素のみが、続いて、リガンドと結合し、溶出され、そして特徴付けられる。

40

【0064】

第三の側面による本発明の方法の好ましい実施態様において、化合物とともにインキュベートされたアリコットにおける酵素の検出低下は、該酵素が化合物の直接的な標的であることを示唆する。このことは、本発明の本方法の工程c)において、化合物が、酵素の結合に関してリガンドと競合することに起因する。化合物とともにインキュベートされたアリコットにおいて酵素がより少なく検出される可能性があるならば、このことは、該化

50

化合物が該酵素との相互作用に関して阻害剤と競合しており、そしてしたがって、該酵素の直接的な標的であり、かつ、逆の場合もまた同様であることを、好ましくは意味する。

【0065】

第四の側面による本発明の方法の好ましい実施態様によると、本方法を、ミディウムもしくはハイスループットスクリーニングとして行う。このようなアッセイは、当業者に公知である (Mallari et al., 2003, A generic high-throughput screening assay for kinases: protein kinase A as an example, Journal of Biomolecular Screening 8, 198-204; Rodems et al., 2002, A FRET-based assay platform for ultra-high density screening of protein kinases and phosphatases, Assay and Drug Development Technologies 1 (1PT1), 9-19)。

10

【0066】

本発明の第二、第三および第四の側面による方法に必要な不可欠なのは、酵素と相互作用すると考えられる化合物の提供である。主として、本発明によると、このような化合物は、酵素と相互作用することが可能なすべての分子であることが可能である。好ましくは、化合物は、例えば刺激もしくは阻害効果などの、酵素に対する効果を有する。

【0067】

好ましくは、前記化合物は、合成もしくは天然化合物または有機合成薬物、より好ましくは、小分子、有機薬物または天然小分子化合物からなる群より選択される。好ましくは、前記化合物を、このような化合物を含有するライブラリから出発して、同定する。次いで、本発明の過程において、このようなライブラリをスクリーニングする。

20

【0068】

このような小分子は、好ましくは、タンパク質または核酸ではない。好ましくは、小分子は、分子量 5000 Da 未満、より好ましくは 2000 Da 未満、よりいっそう好ましくは 1000 Da 未満、そして最も好ましくは 500 Da 未満を示す。

【0069】

本発明による「ライブラリ」は、異なる個々の物質の迅速な機能解析 (スクリーニング) を可能し、そして同時に、ライブラリを形成する個々の物質の迅速な同定を提供する分類された様式にて提供される、(多数の) 異なる化学物質の (たいていは大きな) コレクションに関する。その例としては、相互作用する可能性のある 1 またはそれより多くの定義されたパートナーとの反応にハイスループット様式にて加えることが可能な化合物を含有する、チューブもしくはウェルもしくは表面上のスポットのコレクションである。双方のパートナーの所望の「正の」相互作用の同定後に、各々の化合物を、ライブラリ構築によって迅速に同定することが可能である。合成および天然起源のライブラリを、当業者が購入あるいは設計することが可能である。

30

【0070】

ライブラリ構築の例は、例えば、Breinbauer R, Manger M, Scheck M, Waldmann H. Natural product guided compound library development. Curr Med Chem. 2002 Dec;9(23):2129-45 に提供され、該文献では、証明された生物学的関連性の記録を有することから、コンビナトリアルライブラリの設計に関して生物学的にバリデートされた出発点である、天然産物について、記載されている。医薬化学および生物化学における天然産物のこの特別な役割を、構造生物学およびバイオフィーマティクスによって得られるタンパク質のドメイン構造についての新たな洞察の観点から解釈することが可能である。ドメインファミリー内の個々の結合ポケットの特定要件を満たすためには、化学的バリエーションによって、天然産物の構造を最適化することが必要な可能性がある。固相化学は、この最適化の方法に効率的なツールとなると言われており、そして、この分野における最近の進歩は、この総説論文において強調されている。他の関連参考文献には、Edwards PJ, Morrell AI. Solid-phase compound library synthesis in drug design and development. Curr Opin Drug Discov Devel. 2002 Jul;5(4):594-605.; Merlot C, Domine D, Church DJ. Fragment analysis in small molecule discovery. Curr Opin Drug Discov Devel. 2002 May;5(3):391-9. 総説: Goodnow RA Jr. Current practices in generation of small mo

40

50

olecule new leads. J Cell Biochem Suppl. 2001;Suppl 37:13-21が含まれ；後者文献は、多くの製薬会社における現在のドラッグディスカバリーの方法が、ハイスループットスクリーニングアッセイにおける使用のための高品質のリード構造の大きく、かつ増え続けるコレクションを必要とすることを、記載している。多様な構造および「薬物様」特性を伴う小分子のコレクションは、過去においては、いくつかの手段：以前の内部でのリード最適化への努力の達成、化合物供給元からの購入、および会社合併に続く別々のコレクションの統合によって、獲得されてきた。ハイスループット／コンビナトリアル化学が、新たなリード創出の方法において重要なコンポーネントであると記載されるにもかかわらず、合成のためのライブラリ設計の選択およびそれに続くライブラリメンバーの設計は、新たなレベルの課題および重要性へと発展している。複数の生物学的標的に対する複数の小分子化合物ライブラリ設計をスクリーニングすることの潜在的な利点は、新たなリード構造を発見する実質的な機会を提供する。

10

【0071】

固定化したリガンドから標的酵素を溶出させることが可能な試験化合物（本発明の第四の側面）を、慣用の酵素アッセイにて試験してもよい。以下に、これらの化合物をさらに特徴付けるために用いることが可能な典型的なアッセイを、記載することとする。これらのアッセイについての記載が本発明の範囲を限定することは、意図されない。

【0072】

プロテアーゼアッセイ

典型的なプロテアーゼアッセイは、プロテアーゼを、fluor（例えば、EDANS）と消光剤発色団（例えば、DABCYL）とで二重標識したペプチド基質と適切な条件下で接触させ、そして、開裂後の蛍光の増加を検出することによって、行うことが可能である。

20

【0073】

該基質は、ペプチドの一方の端近くに蛍光ドナー、そして、もう一方の端近くにアクセプター基を含有する。この型の基質の蛍光は、最初は、ドナーとアクセプターの間の分子内蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）を介して消光される。プロテアーゼが基質を開裂するとき、該産物は、消光を解除され、そして、ドナーの蛍光が明瞭になる。蛍光シグナルの増加は、加水分解される基質の量に正比例する（Taliani, M. et al, 1996, Methods 240: 60-7）。

30

【0074】

ホスホジエステラーゼアッセイ

ヒト白血球（U937）細胞の細胞溶解物を、適切なバッファー中に調製し、PDE酵素の源としてもよい。25℃にてインキュベーションバッファー（50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂）中で、基質としての[3H]cAMPとともに20分間インキュベートした後、[3H]アデノシンを定量する（Cortijo et al., 1993, British Journal of Pharmacology 108, 562-568）。

【0075】

プロテインキナーゼのin vitro酵素活性アッセイ

簡潔に言えば、蛍光標識したペプチド基質を、チロシンキナーゼ（例えば、Lck）、ATPおよび抗ホスホチロシン抗体とともにインキュベートしてもよい。反応が進行するにつれて、リン酸化されたペプチドは抗ホスホチロシン抗体に結合して、極性化シグナルの増加を生じる。キナーゼを阻害する化合物は、低い極性化シグナルを生じる。

40

【0076】

あるいは、該アッセイを、修飾された間接的な形式にて設定することが可能である。蛍光ホスホペプチドを、高い極性化シグナルをもたらす抗ホスホチロシン抗体との複合体形成に対するトレーサーとして用いる。非標識の基質がキナーゼによってリン酸化されると、該産物は、該抗体について蛍光リン酸化ペプチドと競合する。次いで、蛍光ペプチドは、抗体から溶液へと遊離して、極性化シグナルの消失を生じる。直接的アッセイと間接的アッセイの双方とも、プロテインチロシンキナーゼ活性の阻害剤を同定するために用いる

50

ことが可能である (Seethala, 2000, Methods 22, 61-70; Seethala and Menzel, 1997, Anal. Biochem. 253, 210-218; Seethala and Menzel, 1998, Anal. Biochem. 255, 257-262)。

【0077】

この蛍光極性化アッセイを、抗ホスホチロシン抗体を抗ホスホセリンもしくは抗ホスホスレオニン抗体に置き換えることによって、プロテインセリン／スレオニンキナーゼを用いた使用に適用することが可能である (Turek et al., 2001, Anal. Biochem. 299, 45-53, PMID 11726183; Wu et al., 2000, J. Biomol. Screen. 5, 23-30, PMID 10841597)。

【0078】

本発明の第四の側面による方法にて同定された化合物を、さらに最適化してもよい (リード最適化)。このような化合物の、この続いての最適化は、これらのリード創出ライブラリにコードされる構造-活性相関 (SAR) 情報のために拍車がかかる場合が多い。リード最適化は、フォローアップ合成に対するハイスループット化学 (HTC) 法の即時の適用性によって容易となる場合が多い。

【0079】

好ましくは、リード最適化は、本発明の第二、第三および第四の側面による方法によって、より好ましくは第四の側面による方法によって、支持される。これらの方法の結果は、医薬化学者または別の当業者に対して、例えば選択性に関して、どのように化合物をさらに最適化するのか、ガイダンスを提供してもよい。

【0080】

このようなライブラリのある使用については、例えば、Wakeling AE, Barker AJ, Davies DH, Brown DS, Green LR, Cartledge SA, Woodburn JR. Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines. Breast Cancer Res Treat. 1996;38(1):67-73に、最終的に記載されている。

【0081】

本発明にしたがって特徴付けられてもよい酵素は、好ましくは、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、ホスホジエステラーゼ、ヒドロゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ、リガーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、GTPアーゼ、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼおよびヘリカーゼからなる群より選択される。

【0082】

好ましくは、タンパク質は、キナーゼであり、そしてより好ましくは、プロテインキナーゼである。同様に好ましくは、タンパク質は、脂質キナーゼである。

すでに上記に示したように、リガンドが、所与の酵素クラスの種々の、しかしすべてではない酵素と結合することが可能な、広範囲性リガンドであることが、本発明に必要不可欠である。好ましくは、リガンドは、所与の酵素クラスの酵素の10～50%、より好ましくは30～50%と結合する。

【0083】

好ましくは、リガンドは、酵素の阻害剤である。

より好ましい実施態様において、酵素はキナーゼであり、かつ、リガンドはキナーゼ阻害剤である。

好ましくは、このキナーゼ阻害剤は、ビスインドリルマレイミドVII I、プルバラノールB、CZC00007324 (連結可能なPD173955)、CZC00008004からなる群より選択される。

【0084】

さらなるリガンドには、インドールリガンド91、キナゾリンリガンド32および修飾スタウロスポリンが含まれる (実施例5～7を参照されたい)。

インドールリガンド91 (5-[5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロインドール-(3Z)-イリデンメチル]-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸 (3-アミノ-プロピル)-アミド) の構造を、図3に供する。この化合物は、キナーゼ阻害剤スーテント (SU11248; Sun et al., 2003. J. Med. Chem. 46, 1116-1119)

10

20

30

40

50

と構造的に類似する分子である。インドールリガンド 91 は、第 1 級アミノ基を介して適切な固体担体材料と共有的連結することが可能であり、そして、結合しているタンパク質を単離するために用いられることが可能である。インドールリガンド 91 の合成については、実施例 1 に記載する。本発明によると、「インドールリガンド 91」との表現には、同一の中心を含んでなるが、しかし、環状構造の一部ではない NH 基に好ましくは連結した別のリンカーを、固体担体に連結させるために有する化合物も、含まれる。典型的には、リンカーは、8、9 または 10 原子の骨格を有する。該リンカーは、カルボキシもしくはアミノ活性基を含有する。

【0085】

さらなる好ましい実施態様によると、酵素の特徴付けを、共溶出した酵素の結合パートナー、酵素サブユニット、または酵素の翻訳後修飾を特徴付けることによって行う。

10

この好ましい実施態様の基本は、リガンドと酵素の結合中における本質的に生理学的な条件の使用によって、結合パートナー、酵素サブユニットまたは翻訳後修飾の存在を含む、酵素の自然条件を保つことが、好ましくは可能であるということである。質量分析 (MS) を活用して、酵素のみならず、共溶出した結合パートナー、酵素サブユニットまたは前記翻訳後修飾も同定することが可能である。

【0086】

本発明のさらなる好ましい実施態様によると、質量分析 (MS) による特徴付けを、酵素または酵素の結合パートナーのプロテオタイピックペプチドの同定によって行う。プロテオタイピックペプチドの概念を、実施例の区分において詳細に記載する。この概念は、溶出した酵素または結合パートナーをプロテアーゼで消化し、そして生じたペプチドを、MS によって測定することである。結果として、同じ源のタンパク質から得たペプチドに対するペプチド頻度が、非常に異なるが、ここで、このタンパク質の同定に「典型的に」貢献する、最も頻度が高く認められるペプチドは、「プロテオタイピックペプチド」と称される。したがって、本発明において用いられるプロテオタイピックペプチドは、特定のタンパク質またはタンパク質アイソフォームを一意的に同定する、実験により多く認められるペプチドである。

20

【0087】

好ましい実施態様によると、特徴付けを、酵素または結合パートナーに対して得られるプロテオタイピックペプチドを、公知のプロテオタイピックペプチドと比較することによって行う。MS にてタンパク質を同定するためにプロテアーゼ消化によって調製されたフラグメントを用いる場合、通常は、同じプロテオタイピックペプチドが、所与の酵素に対して認められることから、所与の試料に対して得られたプロテオタイピックペプチドを、所与の酵素クラスの酵素に対してすでに公知のプロテオタイピックペプチドと比較することによって、試料中に存在している酵素を同定することが可能である。

30

【0088】

好ましくは、質量分析解析を、例えば iTRAQ テクノロジー (相対的および絶対的定量的のための同重体タグ) または cICAT (開裂可能な同位体でコードされたアフィニティタグ) を用いることによって、定量的に行う (Wu et al., 2006. J. Proteome Res. 5, 651-658)。

40

【0089】

さらなる好ましい実施態様によると、固体担体は、アガロース、修飾アガロース、セファロースビーズ (例えば、NH₂ 活性化セファロース)、ラテックス、セルロース、およびフェリ磁性もしくは強磁性粒子からなる群より選択される。

【0090】

広範囲性酵素リガンドを、固体担体に共有的または非共有的に連結させてもよい。非共有結合には、ストレプトアビジンマトリクスと結合するビオチンアフィニティリガンドを介した結合が、含まれる。

【0091】

好ましくは、広範囲性リガンドを、固体担体に共有的連結させる。

50

連結前に、マトリックスは、化合物との連結反応を可能にするため、NH S、カルボジイミド等などの活性基を含有することが可能である。該化合物は、（例えば、アミノ基、スルフヒドリル基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、アルデヒド基およびケトン基などの官能基を用いた）直接的連結および（例えば、ビオチン、化合物と共有的連結しているビオチン、および、固体担体に直接結合しているストレプトアビジンへのビオチンの非共有結合を介した）間接的連結によって、固体担体に連結可能である。

【0092】

固体担体材料との連結は、開裂可能なリンカーおよび開裂可能でないリンカーを伴ってもよい。開裂は、酵素的開裂または適切な化学的方法を用いた処理によって成し遂げてもよい。

10

【0093】

目的とする化合物と固体担体材料との結合に対する好ましい結合界面は、C原子骨格を伴うリンカーである。典型的には、リンカーは、8、9または10原子の骨格を有する。リンカーは、連結する化合物に応じて、カルボキシまたはアミノ活性基のいずれかを含有する。

【0094】

酵素クラスのより完全な網羅を、広範囲性リガンドの組み合わせを用いて達成することが可能である。

好ましくは1～10、より好ましくは1～6、よりいっそう好ましくは1～4の異なるリガンドを、用いる。最も好ましくは、3または4の異なるリガンドを用いる。

20

1より多くのリガンドを用いる場合、各リガンドは、好ましくは、異なる担体上にある。

【0095】

しかしながら、1より多くのリガンドを用いる場合、少なくとも2またはすべての異なるリガンドが一つの固体担体上に存在することも、同様に好ましい。

1より多くのリガンドを用いる場合、各個々のリガンドが結合可能である範囲（spectrum）スペクトルは、酵素クラスの最大限の網羅を達成することが可能なよう、異なることが好ましい。

【0096】

好ましくは、各リガンドは、所与の酵素クラスの酵素の10～50%、より好ましくは30～50%と結合する。

30

さらなる好ましい実施態様によると、酵素または化合物酵素複合体を特徴付けることにより、細胞内の酵素クラスのすべてまたは複数のメンバーの同一性を決定する。これは、リガンドを細胞溶解物とともにインキュベートすることによって、リガンドと結合可能である潜在的にすべての酵素を単離し、そして後に特徴付けるという事実による。酵素の発現プロファイルに応じて、リガンドは、酵素クラスのメンバーのすべてまたは一部に結合可能であり、したがって、同定されることが可能である。キナーゼの場合、本発明の方法は、当業者が、所与の細胞内に発現したキノームを同定し、そして特徴付けることを可能にする。

【0097】

40

本発明全体にわたり、化合物はリガンドと異なることが好ましいが、同一であることは除外されない。

さらに、本発明は、医薬組成物を作成するための方法であって、

- a) 本発明の第四の側面の方法にしたがって、酵素化合物複合体を同定し；そして、
 - b) 該化合物を、医薬組成物へと処方物化する；
- 工程を含んでなる前記方法に関する。

【0098】

したがって、本発明は、対象に有効量を投与されてもよい医薬組成物を調製するための方法を、提供する。好ましい側面において、治療剤は、実質的に精製される。治療される対象は、好ましくは、これに限定されないが、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ

50

等などの動物を含む動物であり、より好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトである。特定の実施態様では、非ヒト哺乳動物が対象である。

【0099】

一般に、本発明の医薬組成物は、治療有効量の治療剤、および医薬的に許容可能なキャリアーを含んでなる。特定の実施態様において、「医薬的に許容可能な」の語は、連邦もしくはは州政府の規制当局に認可されているか、あるいは、米国薬局方、または、動物および、より具体的にはヒトにおける使用のための他の一般に認められた薬局方に掲載されていることを、意味する。「キャリアー」の語は、治療剤とともに投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。このような医薬キャリアーは、水、および、石油、動物、植物または合成が源のものを含む油、などの無菌の液体であることが可能であり、これに限定されないが、ピーナツ油、大豆油、鉱油、胡麻油等が含まれる。水は、医薬組成物を経口投与する場合の、好ましいキャリアーである。生理食塩液およびデキストロース水溶液は、該医薬組成物が静脈内投与される場合の、好ましいキャリアーである。生理食塩液およびデキストロース水溶液およびグリセロール溶液は、好ましくは、注射溶液用の液体キャリアーとして使用される。適切な医薬賦形剤には、スターチ、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽 (malt)、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が含まれる。所望の場合、組成物は、少量の湿潤剤または乳化剤、あるいは pH 緩衝剤も含有することが可能である。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳液、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、徐放性処方物等の形態を取ることが可能である。該組成物は、慣用の結合剤、およびトリグリセリドなどのキャリアーとともに、坐剤として処方物化されることが可能である。経口処方物は、医薬グレードのマニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等などの標準的なキャリアーを含むことが可能である。適切な医薬キャリアーの例は、E.W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。このような組成物は、好ましくは精製された形状の、治療有効量の治療剤を、患者への適切な投与のための形状を提供するような適切な量のキャリアーとともに、含有するであろう。処方物は、投与方法に適合すべきである。

【0100】

好ましい実施態様において、組成物は、所定の手順にしたがって、ヒトへの静脈内投与に適した医薬組成物として処方物化される。典型的には、静脈内投与用の組成物は、無菌等張水溶性バッファーに溶解した溶液である。必要な場合に、組成物は、可溶化剤、および、注射部位における疼痛を緩和するためのリドカインなどの局所麻酔剤もまた含んでよい。一般には、成分は、別々に、あるいは単位剤形中に併せて混合されて、例えば、活性剤の量が表示されるアンプルまたはサシェなどの密封された容器内に乾燥凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、供給される。組成物を点滴により投与する場合、無菌の医薬グレードの水または生理食塩液を含有する点滴ボトルを用いて投薬することが可能である。組成物を注射により投与する場合、注射用の無菌の水または生理食塩液のアンプルを、成分が投与前に混合されてもよいように提供することが可能である。

【0101】

本発明の治療剤を、中性もしくは塩の形態にて処方物化することが可能である。医薬的に許容可能な塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等由来のものなどの遊離カルボキシル基と形成されるもの、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等由来のものなどの遊離アミン基と形成されるもの、ならびに、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムおよび第二鉄の水酸化物等由来のものなどが、含まれる。

【0102】

特定の障害または状態の治療において有効であろう本発明の治療剤の量は、該障害または状態の性質によって決まるであろうし、かつ、標準的な臨床技術により決定されること

が可能である。加えて、所望により、*in vitro*アッセイを、最適な投与量範囲の同定を助けるために用いてもよい。処方物において用いられる正確な用量は、投与経路、および疾患もしくは障害の重症度によっても決まるであろうし、かつ、専門家の判断および各患者の環境にしたがって決定されるべきである。しかしながら、静脈内投与に対する適切な投与量範囲は、一般には、活性化化合物約 $20 \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重である。経鼻投与に対する適切な投与量範囲は、一般には、約 $0.01 \text{ pg}/\text{kg}$ 体重 $\sim 1 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重である。有効用量を、*in vitro*または動物モデルの試験系に由来する用量－反応曲線から外挿してもよい。一般には、坐剤は、 0.5 重量% ~ 10 重量%の範囲で活性成分を含有してもよく；経口処方物は、好ましくは、活性成分を $10\% \sim 95\%$ 含有する。

10

【0103】

種々の送達システムが、公知であり、かつ、本発明の治療剤を投与するために用いられることが可能であって、これらは、例えば、リポソーム、微粒子およびマイクロカプセルへの封入；治療剤を発現可能な組換え細胞の使用、受容体を介したエンドサイトーシスの使用（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432）；レトロウイルスもしくはその他のベクターの一部としての治療用核酸の構築等である。導入方法には、これに限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外および経口経路が含まれる。化合物を、例えば、点滴、ボラス注射、表皮もしくは粘膜層（例えば、口腔、直腸、小腸粘膜等）を介した吸収によるなどの任意の好都合な経路によって投与してもよく、そして、他の生物学的活性剤と併せて投与してもよい。投与は、全身性または局所性であることが可能である。加えて、本発明の医薬組成物を、脳室内および髄腔内注射を含む任意の適切な経路によって、中枢神経系に導入することが望ましい場合もあり；脳室内注射は、例えばOmmayaリザーバーなどのリザーバーを取り付けた、脳室内カテーテルによって、容易となってもよい。肺内投与を、例えば、吸入器または噴霧器、およびエアロゾル化剤を用いた処方物の使用によっても、用いることが可能である。

20

【0104】

特定の実施態様において、本発明の医薬組成物を、治療の必要な部分に局所的に投与することが望ましい場合もある。これは、例えば、そしてこれに限定されないが、外科手術中の局所点滴によって、例えば外科手術後の創傷包帯と併せた、局所適用によって、注射によって、カテーテルを用いて、坐剤を用いて、または移植物を用いて達成されてもよく、ここで、前記移植物は、サイラスティック膜などの膜または繊維を含む、多孔質、非多孔質またはゼラチン質の材料からなる。一実施態様において、投与を、悪性腫瘍または新生物もしくは前新生物組織の部位（または元の部位）に、直接注射により行うことが可能である。

30

【0105】

別の実施態様において、治療剤を、ベジクル、具体的にはリポソーム内に入れて送達することが可能である（Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., 1989, "Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer", Lopez-Berestein and Fidler編集、Liss、ニューヨーク州、353～365頁；Lopez-Berestein、同書、317～327頁；概して同書を参照されたい）。

40

【0106】

さらに別の実施態様において、治療剤を、放出制御システムを介して送達することが可能である。一実施態様においては、ポンプを用いてもよい（Langer、同上；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-240；Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507-516；Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574-579）。別の実施態様においては、ポリマー材料を用いることが可能である（Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise編集、CRC Press, Boca Raton、フロリダ州、1974；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball編集、Wiley、ニューヨーク州、1984；Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61；Levy et al., 1985, Science 228:190-192；During et al., 1989, Ann.

50

Neurol. 25:351-356; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:858-863)。さらに別の実施態様においては、放出制御システムを、治療標的、すなわち脳の近位に設置することが可能であり、したがって、ごく少量の全身用量のみが必要とされる（例えば、Goodson, 1984, "Medical Applications of Controlled Release", 同上、第2巻、115～138頁）。他の放出制御システムについては、Langerによる総説（1990, Science 249:1527-1533）において論じられている。

【0107】

好ましい実施態様において、方法は、酵素に対する化合物の結合親和性を調節する工程を、さらに含んでなる。これは、例えば、化合物の種々の残基の化学的修飾、およびそれに続く化合物と酵素との結合親和性の解析によるなどの、当業者に公知の方法によって、遂行可能である。

10

【0108】

本発明は、固体担体上に固定化した少なくとも一つの広範囲性酵素リガンドの使用であって、少なくとも一つの酵素または酵素－化合物複合体を特徴付けるための前記使用に関する。本発明のこの使用に関して、本発明の方法について上述のすべての実施態様もまた、適用される。

【0109】

本発明を、以下の図および実施例によりさらに例示するが、これは、本出願の特許請求の範囲によって授与される保護の範囲を限定するものとみなされない。

【実施例】

20

【0110】

実施例

実施例1：キノビーズの調製

本実施例は、4つの異なるリガンドを伴うキノビーズの調製を示す。これらのキノビーズは、後に実施例2および実施例3で用いた。

広範囲性捕捉リガンド（Broad spectrum capturing ligands）を、適切な官能基（例えばアミノまたはカルボキシルまたは官能基）を用いて共有結合を介して、固体支持体上に共有結合的に固定した。適切な官能基を含有しない化合物は、そのような基を導入するために修飾した。必要な化学的方法は、製薬化学の文献において公知であり、そして下記に示される。

30

【0111】

1. リガンドの選択および合成

以下の4つの広い特異性のリガンド（キノビーズリガンド1ないし4；図1）を、以下に記載するように別個の反応でビーズに共有結合的にカップリングし、そして次いで、4つのタイプのビーズを混合して薬剤選抜実験（drug pulldown experiments）に用いた。

【0112】

キノビーズリガンド1：ビスインドリルマレイミド VIII－アセテート（化学式 $C_{24}H_{22}N_4O_2 \cdot CH_3COOH$ ；MW 398.5；CAS 番号138516-31-1；Alexis Biochemicals, AXXORA Deutschland GmbH, グリュンベルク；Cat- ALX-270-056）。

【0113】

キノビーズリガンド2：プルバラノールB（化学組成： $C_{20}H_{25}ClN_6O_3$ ；MW 441.92；CAS 番号212844-54-7；Tocris Biochemicals Cat- 1581, BIOTREND Chemikalien GmbH ケルン、ドイツ）。

40

【0114】

キノビーズリガンド3：CZC00007324；（7－（4－アミノメチル－フェニルアミノ）－3－（2，6－ジクロロ－フェニル）－1－メチル－1H－[1，6]ナフチリジン－2－オン）。

【0115】

キノビーズリガンド1の合成：7－（4－アミノメチル－フェニルアミノ）－3－（2，6－ジクロロ－フェニル）－1－メチル－1H－[1，6]ナフチリジン－2－オン

50

CZC00007324の合成の最初の7工程は、Klutchko, S. R.ら、1998, Journal of Medicinal Chemistry 41, 3276-3292に記載されているように行った。残りの工程は以下に記載するように行った。

【0116】

工程1-7: 6-(2,6-ジクロロフェニル)-2-メタンスルホニル-8-メチル-8H-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-オンを、4-クロロ-2-メチルスルファニル-5-ピリミジンカルボキシレートエチルエステルから、J. Med. Chem. 1998, 41, 3276-3292の方法に従って合成した。

【0117】

工程8: {4-[3-(2,6-ジクロロフェニル)-1-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-[1,6]ナフチリジン-7-イルアミノ]ベンジル}-カルバミン酸 tert-ブチルエステル

6-(2,6-ジクロロフェニル)-2-メタンスルホニル-8-メチル-8H-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-オン(0.100g, 0.2mmol)および3-(N-Boc-メチルアミノ)アニリン(0.421g, 2.0mmol)を固体として混合し、そして140℃に30分間加熱した。当該粗反応混合物をジクロロメタンに溶解し、そして2N HCl(水溶液)で2回洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過し、そして濃縮した。当該粗生成物を熱酢酸エチルから再結晶して{4-[3-(2,6-ジクロロフェニル)-1-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-[1,6]ナフチリジン-7-イルアミノ]ベンジル}-カルバミン酸 tert-ブチルエステルを黄色固体として得た(0.031g-25%)。

【0118】

【化1】

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.18 (s, 1H); 8.83 (s, 1H); 7.76 (d, 2H); 7.58 (d, 2H); 7.46 (dd, 1H); 7.32 (brt, 1H); 7.23 (d, 2H); 4.10 (d, 2H); 3.66 (s, 3H); 1.40 (s, 9H). LCMS: 方法A, RT=5.60分。

【0119】

工程9: 7-(4-アミノメチルフェニルアミノ)-3-(2,6-ジクロロフェニル)-1-メチル-1H-[1,6]ナフチリジン-2-オン

{4-[3-(2,6-ジクロロフェニル)-1-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-[1,6]ナフチリジン-7-イルアミノ]ベンジル}-カルバミン酸 tert-ブチルエステル(0.026g, 0.05mmol)をメタノール(3ml)に溶解し、そして塩酸(ジオキサン中4N、1.2ml)を加えた。反応物を室温で1.5時間攪拌し、そのときHPLCは出発物質が残っていないことを示した。溶媒を真空中で除いた。残渣を水に溶解し、そして溶液を炭酸ナトリウム(飽和、水溶液)で塩基性化した。得られた沈殿を集めて乾燥し、7-(4-アミノメチルフェニルアミノ)-3-(2,6-ジクロロフェニル)-1-メチル-1H-[1,6]ナフチリジン-2-オン(0.021g-100%)を黄色固体として得た。

【0120】

【化2】

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.20 (brd, 1H); 8.83 (d, 1H); 7.90 (d, 1H); 7.76 (d, 1H); 7.72 (d, 1H); 7.60 (dd, 2H); 7.47 (ddd, 1H); 7.33 (d, 1H); 7.24 (d, 1H); 4.07 (d, 2H); 3.66 (s, 3H). LCMS: 方法A, RT=4.44分, [MH⁺=426].

【0121】

キノビーズリガンド4: CZC00008004. 2-(4'-アミノメチルフェニルアミノ)-5-フルオロ-ピリミジン-4-イル)-フェニルアミン。化学式C₁₇H₁₆N₅F。MW 309.34。これはCZC00004919の類似体である。

【0122】

CZC00008004の合成 — (2-(4'-アミノメチルフェニルアミン)-5-フルオロピリミジン-4-イル)-フェニルアミン

工程1: 2, 4-ジクロロ-5-フルオロピリミジン

オキシ塩化リン (2 ml) を5-フルオロウラシル (1 g, 7.688 mmol) に加え、次いで、五塩化リン (3.28 g, 15.76 mmol) に加え、当該混合物を110℃で5時間加熱攪拌し、そして冷ました。過剰のオキシ塩化リンを、氷/水混合物 (10 ml) の浴中でゆっくりと加水分解した。水性混合物をジエチルエーテルで抽出した (3×10 ml)。有機層を合わせ、飽和重炭酸ナトリウム (10 ml) で洗浄し、次いで飽和塩化ナトリウム (10 ml) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、そしてろ過した。溶媒を350 mmHgでの蒸発により除去して、粘性のある油状物を残し、これをゆっくりと結晶化して表題化合物を得た (1.22 g-95%)。当該化合物は更なる解析をせずに次の工程に用いた。

10

【0123】

工程2: (2-クロロ-5-フルオロピリミジン-4-イル)-フェニルアミン

ジメチルホルムアミド (13 ml) 中の2, 4-ジクロロ-5-フルオロピリミジン (0.550 g, 3.30 mmol) の溶液に、アニリン (0.301 ml, 3.30 mmol) およびN-エチルジイソプロピルアミン (0.602 ml, 3.63 mmol) を加え、そして当該混合物を室温で18時間攪拌した。当該混合物を酢酸エチル (20 ml) でクエンチし、そして飽和塩化アンモニウム (20 ml) で洗浄し、そして有機層を除去した。水層を酢酸エチル (20 ml) で洗浄し、そして合わせた有機層を水 (20 ml)、飽和塩化ナトリウム (10 ml) で洗浄し、そして無水硫酸マグネシウムで乾燥した。蒸発により溶媒を除去し、そして結果として生じた固体をカラムクロマトグラフィーにかけて (シリカ、酢酸エチル (0 から 20%) / 石油エーテル)、表題化合物を得た (0.532 g-72%)。LCMS: 方法A、RT=4.67分、[MH⁺=224]。

20

【0124】

工程3: [4-(5-フルオロ-4-フェニルアミノピリミジン-2-イルアミノ)-ベンジル]-カルバミン酸 tert-ブチルエステル

(2-クロロ-5-フルオロピリミジン-4-イル)-フェニルアミン (0.087 g, 0.39 mmol) および4-[N-Bocアミノメチル]アニリン (0.087 g, 0.39 mmol) を一緒に混合した。スターラーバーを加え、そしてフラスコを湯浴中に110℃で20分間おいた。混合物を冷まし、残渣を3 mlのジクロロメタン/メタノール (99:5) 中に溶解し、そしてフラッシュクロマトグラフィーカートリッジにロードし、そして石油エーテル中の酢酸エチル (20 から 60%) を用いて精製し、目的の化合物を黄色固体として与えた (0.051 g-32%)。

30

【0125】

【化3】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₆) δ 7.85 (d, 1H); 7.50 (dd, 2H); 7.39 (d, 2H); 7.27 (t, 2H); 7.12-7.00 (m, 3H); 6.81 (s, 1H); 6.66 (s, 1H); 4.67 (s, 1H), 4.17 (d, 2H), 1.36 (s, 9H).
LCMS: 方法B, RT=9.20分, [MH⁺=410].

40

【0126】

工程4: (2-(4'-アミノメチルフェニルアミン)-5-フルオロピリミジン-4-イル)-フェニルアミン

メタノール (5 ml) 中の [4-(5-フルオロ-4-フェニルアミノピリミジン-2-イルアミノ)-ベンジル]-カルバミン酸 tert-ブチルエステル (0.055 g, 0.134 mmol) の溶液にHCl (ジオキサン中4N) (2 ml)、そして当該反応物を室温で1時間攪拌した。溶媒を蒸発により除去した。水 (5 ml) を加え、重炭

50

酸ナトリウムの添加により溶液のpHを8に上げた。結果として生じた沈殿物をろ過し、そして乾燥させて表題化合物を得た(0.035g-84%)。

【0127】

【化4】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.90 (d, 1H); 7.70 (dd, 2H); 7.55 (dd, 2H); 7.35 (t, 2H); 7.20 (d, 2H); 7.10 (t, 1H); 3.80 (s, 2H). LCMS: 方法 B, RT=5.022 分, [MH⁺=310].

【0128】

すべての反応は不活性な雰囲気下で行った。NMRスペクトルはBruker dpx400で得られた。LCMSはアジレント1100上でゾルボックスSBC-18, 4.6mm×150mm-5μカラムを用いて行った。カラム流量は1ml/分で、用いた溶媒は水およびアセトニトリル(0.1% TFA)で、インジェクション体積は10μlであった。波長は254および210nmであった。方法は以下に示す。

【0129】

表1: 分析方法

【0130】

【表1】

方法	イーザーアクセス 方法名	ChemStation 方法名	流速	溶媒	ランタイム
A	分析ポジティブ 7mn	ANL_POS7.M	1ml/分	0-2.5 分 5-95% MeCN 2.5-6 分 95% MeCN	7 分
B	分析ポジティブ イオン	ANAL_POS.M	1ml/分	0-11 分 5-95% MeCN 11-13 分 95% MeCN	15 分

【0131】

表2: 化学プロトコルにおいて用いた略語

【0132】

10

20

30

【表 2】

aq	水溶液
d	二重線
DMSO	ジメチルスルホキシド
g	グラム
HCl	塩酸
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
LCMS	液体クロマトグラフィー - 質量分析法
m	多重線
mins	分
mmol	ミリモル
N	ノーマル
NMR	核磁気共鳴
q	四重線
RT	保持時間
s	一重線
sat	飽和
t	三重線

【0133】

2. アミン基を含有するリガンドの固定

NH S 活性化セファロース 4 ファストフロー (Amersham Biosciences, 17-0906-01) を無水 DMSO (ジメチルスルホキシド, Fluka, 41648, H₂O <= 0.005%) で平衡化した。1 ml の確立したビーズ (settled beads) を 15 ml ファルコンチューブ中におき、化合物ストック溶液 (通常、DMF または DMSO 中に 100 mM) を加え (最終濃度 0.2 - 2 μmol/ml ビーズ)、ならびに 15 μl のトリエチルアミン (SIGMA, T-0886, 純度 99%) を加えた。ビーズをエンドーオーバーーエンドシェーカー (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) 上で室温、暗所で 16 - 20 時間インキュベートした。カップリング効率は HPLC で決定した。反応していない NH S 基は、アミノエタノールとの室温でのエンドーオーバーーエンドシェーカー上での一晚のインキュベーションによりブロッキングした。洗浄したビーズは、イソプロパノール中で保存するか、または結合反応にすぐに使用した。

【0134】

3. カルボキシル基を含有するリガンドの固定

化合物は、以下に概略を示すように、塩基性条件下で反転 (reversed) NH S - セファロースビーズへとカップリングした (PyBroP 化学)。

【0135】

ビーズの洗浄

工程 1: 標準的なカップリング反応のために 1 ml (確立した容積 (settled volume)) の NH S - セファロース/ビーズを用いる (イソプロパノール中で提供される NH S 活性化セファロース 4 ファストフロー、Amersham Biosciences, 17-0906-01)。

工程 2: ビーズを 10 ml DMSO で 3 回、無水 DMSO (ジメチルスルホキシド,

Fluka, 41648, $H_2O \leq 0.005\%$) で 1 回洗浄する；遠心分離工程：1 分、1 2 0 0 r p m、室温；上清を非ハロゲン性溶媒廃棄物へと捨てる。

工程 3：最後の洗浄工程の後、一体積の無水 D M S O 中にビーズを再懸濁する。

【0136】

N H S ビーズの反転

この工程は 1 m L ビーズについてデザインされており、他のいずれのビーズ体積については適宜調整する。N H S ビーズは 2 0 $\mu m o l / m L$ の容量 (capacity) がある。したがって、2 0 % 逆転ビーズは 4 $\mu m o l / m L$ の容量を有するべきである。

アミノエタノールとエチレンジアミンの 4 : 1 の比率の混合物を作成し、次いで当該混合物ヘトリエチルアミンを加える。

(全体で 2 0 0 $\mu m o l$) (1 m L の N H S ビーズの 1 0 倍の容量)

1 : 9 . 6 6 μL の 1 6 . 5 6 M アミノエタノール (2-アミノエタノール、Aldrich, 11.016-7) (全体で 1 6 0 $\mu m o l$)

2 : 2 . 6 8 μL の 1 4 . 9 2 M エチレンジアミン (Fluka, 03350) (全体で 4 0 $\mu m o l$) .

3 : 1 5 μL の 7 . 2 M トリエチルアミン (TEA) (SIGMA, T-0886, 純度 9 9 %) 混合物は 2 つの相に分かれるが、それでよい。

混合物を洗浄／再懸濁 N H S ビーズへと加え、そして室温で 1 6 時間 (一晚)、エンドーオーバーエンドシェーカー上でインキュベートする。

【0137】

P y P r o B カップリング. この方法は活性化前工程を必要とせず、活性化およびカップリングが *i n - s i t u* でおこる。

1 . P y B r o P (プロモートリス-ピロリジノーホスホニウム ヘキサフルオロフォスフェート；供給元：NOVABIOCHEM) を水不含ジメチルホルムアミド (D M F) に最終濃度 1 0 0 m M (4 6 . 6 2 m g / m L) に溶解する。当該溶液は 1 日まで使用することができる。

2 . 1 m L の水不含 D M F 中に 3 5 μL のジイソプロピルエチルアミン (D I E A) を溶解する、最終濃度 2 0 0 m M .

3 . 1 m L の反転ビーズを 1 5 m L の D M S O で 3 回洗浄する。遠心分離工程：1 2 0 0 r p m で 1 分間、室温。上清を捨てる。

4 . 反転ビーズを 1 5 m L の水不含 D M F で 3 回洗浄する。遠心分離工程：1 分間、1 2 0 0 r p m、室温。上清を捨てる。

5 . 反転セファロースビーズを 1 m L の水不含 D M F 中に懸濁する。

6 . 1 0 0 μL のジイソプロピルエチルアミン (D I E A) 溶液を加える。

7 . D M F 溶液から化合物 (1 $\mu m o l / m L$ 反転セファロースビーズ；1 0 μL 1 0 0 m M 化合物 / m L 反転セファロースビーズに相当) を、必要量ビーズに加える。

8 . 均一な懸濁液が得られるまで混合する。

9 . 室温で 1 2 0 0 r p m で 1 分間遠心分離し、2 0 μL の上清を除去して、H P L C 解析の開始値のために 3 0 μL メタノール (M e O H) に希釈する。

1 0 . 1 0 0 μL の P y B r o P 溶液を懸濁液に加え、そして再度混合する。

1 1 . 室温でエンドーオーバーエンドミキサー上で一晚インキュベートする。

1 2 . 室温で 1 2 0 0 r p m で 1 分間遠心分離し、2 0 μL の上清を除去して H P L C 解析のカップリング値のために 3 0 μL メタノール (M e O H) に希釈する。

【0138】

ビーズのブロッキング

1 . 1 0 0 μL の 1 0 0 m M N H S - アセテートを加えることによりビーズをブロッキングする (ブロッキングリガンドの作り方は下記を参照)。

2 . エンドーオーバーエンドシェーカー上で、室温で一晩インキュベートする。

ブロッキング試薬 (N H S 活性化酢酸) :

1 . アセトニトリル中の D C C D および N H S の 2 0 0 m M 溶液を調製する (それぞれ

10

20

30

40

50

- 、～5 mL)。
- 20 mL 透明ガラスバイアル中で、等しい容積の 200 mM NHS および DCCD を混合する。
 - NHS / DCCD 混合物の全量 1 mL あたり、11.4 μ L の 17.49 M 酢酸 (2 倍モル過剰) (Merck, 1.00063.1000) を加える。
 - 徹底的に混合する。およそ 2 分後に沈殿が形成されるであろう (尿素誘導体の結晶)。
 - 反応物を、さらなる使用の前に、少なくとも一晩室温におく。

【0139】

ビーズの洗浄

- ビーズを、14 mL の DMSO (例えば FLUKA, 34869 または同等物) で 2 回洗浄し、次いで 14 mL のイソプロパノール (Merck, 1.00983.1000, pro analysis) で 2 回洗浄する。遠心分離工程: 1 分間、1200 rpm、室温。洗浄の間、上清を除去する。
- ビーズを、1 mL のイソプロパノールに再懸濁し、-20 °C での保管または細胞溶解物との結合実験にただちに使用するために、50 % スラリーを作成する。

【0140】

表 3: カップリングプロトコルに使用した略語

【0141】

【表 3】

DCCD	ジシクロヘキシルカルボジイミド
DIEA	ジイソプロピルエチルアミン
DMSO	ジメチルスルホキシド
DMF	ジメチルホルムアミド
NHS	N-ヒドロキシスクシンイミド
PyBroP	プロモートリス-ピロリジノーホスホニウム ヘキサフルオロ ホスフェート
TEA	トリエチルアミン

【0142】

実施例 2: シグナロキノーム (Signalokinome)

本実施例は、化合物での細胞の処理を説明する (特に本発明の第二の側面を参照)。HeLa 細胞を上皮増殖因子 (EGF) で処理し、細胞溶解物を調製し、そしてキノビーズ (セクション 2.1 の実験プロトコル) および質量分析法を用いて解析した。キノビーズの調製は実施例 1 に記載する。

並行して、細胞溶解物を抗ホスホチロシン (phosphotyrosine) 抗体で免疫沈降し (セクション 2.2 の実験プロトコル)、そして質量分析法により解析した。

結果 (図 2) は、免疫沈降の手法 (表 6) と比較して、キノビーズは有意により多くのキナーゼを同定した (表 8) ことを示す。

【0143】

1. 生物学的試料 (細胞溶解物) の調製1.1 細胞培養および細胞の処理

細胞培養. HeLa 細胞 (American Type Culture Collection - No CCL-2) を MEM 培地 (L-アルギニンを含まず、L-グルタミンを含まない; Promocell C-75280)、10 % 透析仔ウシ血清 (Gibco, 26400-044)、1 % の 100 $\times$ 非必須アミノ酸 (Cambrex, BE13-114E)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Gibco, 11360-039)、2 mM L-グルタミン (Gibco, 25030-032)、40 mg/mL 12C または 13C L-アルギニン (

1 2 C アルギニン—Sigma, A6969) (1 3 C アルギニン—Cambridge Isotope Laboratories Inc., CLM-2265) 中で、3 7 °C、5 % C O₂ で増殖させた。

【0 1 4 4】

細胞拡張 (propagation). 細胞が1 5 c mディッシュ中でコンフルエントに達した後、細胞をさらなる増殖のために1 ないし1 0に分けた。最初に上清培地を除去し、次いで細胞を1 5 m L P B S バッファー (Gibco, 14190-094) で軽く洗浄することにより、細胞を分けた。P B S を除去した後、1 5 c mプレートあたり2 m Lのトリプシン—E D T A 溶液 (Gibco, 25300-054) を加えることにより細胞をプレートから剥がし、そしてプレートを3 7 °Cで1 0分間インキュベートした。細胞を剥がした後、1 5 c mプレートあたり8 m LのM E M増殖培地 (上記参照) を加えた。この溶液の1 m Lを、新しい1 5 c mプレートにおき、そして2 4 m LのM E M培地 (上記参照) を加えた。プレートは再び3 7 °C、5 % C O₂ で、細胞がコンフルエントになるまでインキュベートした (〜3—4日間)。

10

【0 1 4 5】

細胞のE G F処理. 上皮増殖因子 (E G F) での細胞の処理の1日前に、細胞増殖培地を吸引により除去し、そして2 0 m Lの新しいM E M培地 (上記参照) を加えた。ただし当該培地は1 0 % 仔ウシ血清 (F B S) の代わりに0. 1 % F B Sを補ってある。細胞はこの飢餓培地中で一晩、3 7 °C、5 % C O₂ でインキュベートした。細胞飢餓の後、3 μ Lの1 m g / m L組換えヒトE G F (Biomol, 50349-1) を各1 5 c mプレートに加えた (最終E G F濃度=1 5 0 n g / m L培地)。回収の前に、プレートを3 7 °C、5 % C O₂ で1 0分間インキュベートした。

20

【0 1 4 6】

細胞の回収. E G F含有培地を捨て、各1 5 c mプレートを1 0 m Lの氷冷P B S バッファーで一度洗浄し、そして細胞を剥がすためにラバーポリスマンでプレートを擦り取ることにより、細胞を回収した。細胞を5 0 m Lファルコンチューブ (Becton Dickinson, 352070) に移し、そしてHeraeus Multifuge 3SR中で1 5 0 0 r p mで1 0分間遠心分離した。遠心分離および上清の吸引後、細胞ペレットは液体窒素中ですばやく凍結し、−8 0 °Cで保管した。

【0 1 4 7】

1. 2 細胞溶解物の調製

30

H e L a細胞溶解物は、タンパク質の構造および機能を維持する温和な条件下で、溶解バッファー溶液中、機械的破壊により調製した。

以下の工程を行った：

- ・組織を室温または3 7 °Cですばやく解凍し、次いで組織を1 ×溶解バッファーを含有するガラス瓶 (Polytron PT 3100ホモジナイザーとともに使用するのに十分な大きさのバイアルを使用する) に移す
- ・低温室で4 °Cで5 0 0 0—7 0 0 0 r p mで1 0秒パルス を4回かけて、器官／組織を溶解する
- ・ホモジネートを予め冷やした5 0 m l ファルコンチューブに移す
- ・ホモジネートを氷上で3 0分間インキュベートする
- ・細胞を6 0 0 0 gで1 0分間、4 °Cで遠心する (予め冷やしたSorvall SLA600中で6 0 0 0 r p m)
- ・上清をU Z—ポリカーボネートチューブ (Beckmann, 355654) へ移す
- ・上清を1 4 5 0 0 0 gで1時間、4 °Cで遠心する (予め冷やしたTi50.2中で4 0 0 0 0 r p m)
- ・上清を保存し (可能であれば脂質層のほとんどを除去し捨てる)、上清をガラス瓶に移して氷上で保管する
- ・Bradfordアッセイ (BioRad) によりタンパク質濃度を決定する。典型的なタンパク質濃度は、5—1 0 m g / m l の範囲内である。
- ・1 5 から5 0 m l ファルコンチューブ中にアリコットを調製する

40

50

・アリコットを液体窒素中で凍結し、それらを -80°C で保管する

【0148】

0. 8% NP40を伴う100mlの1×溶解バッファの調製

以下の溶液または試薬を合わせ、そして蒸留水を加えて100mlの最終容積にする：
20mlの5×溶解バッファ（下記参照）、100 μl の1M DTT、5mlの0.5M NaF、4mlの20% NP40、4つの完全EDTA不含タブレット（プロテアーゼ阻害剤カクテル、Roche Diagnostics, 1873 580）、蒸留水を100mlまで加える。

【0149】

表4：5×溶解バッファの調製

10

【0150】

【表4】

基質：	ストック溶液	1x 溶解バッファ 中の最終濃度	115x 溶解 バッファに添加
Tris/HCl pH 7.5	1 M	50 mM	250 ml
グリセロール	87 %	5 %	288 ml
MgCl ₂	1 M	1.5 mM	7.5 ml
NaCl	5 M	150 mM	150 ml
Na ₃ VO ₄	100 mM	1 mM	50 ml

20

【0151】

これらの溶液は以下の供給元から得た：

1M Tris/HCl pH 7.5：Sigma, T-2663；87%グリセロール：Merck, cat. no. 04091.2500；1M MgCl₂：Sigma, M-1028；5M NaCl：Sigma, S-5150.

5×濃縮溶解バッファは0.22 μm フィルターを通してろ過し、そして40mlアリコットで -80°C で保管した。

30

【0152】

このプロトコルで使用されるストック溶液の調製：

100mM Na₃VO₄ストック溶液の調製：

9. 2gのNa₃VO₄を400mlの蒸留水に溶解する。

1) 1N NaOHまたは1N HClのいずれかを用いてpHを10.0に調整する。オルトバナジウム酸ナトリウム溶液の初期pHはバッチごとに多様でありうる。pH10.0において、溶液は黄色となるであろう。

2) 溶液を、無色に変わるまで煮沸する（約10分間）。

3) 室温まで冷ます。

40

4) pHを10.0に再度調整し、そして、工程2および3を、溶液が無色を維持しおよびpHが10.0で安定するまで繰り返す。

5) 蒸留水で体積を500mlに調整する。

6) アリコットを -20°C で凍結する。アリコットは数ヶ月間保管できる。

【0153】

500mM NaFストック溶液の調製：

21.0gのNaF（Sigma, S7920）を500mlの蒸留水に溶解する。溶液を0.22 μm フィルターでろ過し、そして4 $^{\circ}\text{C}$ で保管する。

【0154】

20% NP40－溶液の調製：

50

40.0 gのNP40 (Sigma, Igepal-CA630, カタログ番号13021) を量る。蒸留水を加えて200 gとする。完全に混合し、そして溶液を室温で保管する。

【0155】

1 M DTT溶液の調製：

7.7 gのDTT (Biomol, カタログ番号04010) を50 mlの蒸留水に溶解する。溶液を0.22 μ mフィルターでろ過し、そして-20℃で400 μ lのアリコットを凍結する。アリコットは数ヶ月間保管することができる。

【0156】

2. 結合反応

2.1 「キノビーズ」(固定化捕捉リガンド)の細胞溶解物との接触

キノビーズ(固定化捕捉リガンド)を、HeLa細胞から調製した細胞溶解物と、溶解物中のタンパク質のリガンドへの結合を可能にする条件下で、接触させた。結合条件は、タンパク質の機能を保存する適切なバッファー条件を選ぶことにより生理学的条件に近かった。穏やかな洗浄手順により非捕捉タンパク質を除去した後、結合したタンパク質を、タンパク質の溶出に導く試験化合物と接触させた。

【0157】

2.1.1 DP-バッファーの調製

表5： 5×DP-バッファーの調製

【0158】

【表5】

基質：	ストック溶液	1×溶解バッファー 中の最終濃度	115×溶解 バッファーに添加
Tris/HCl pH 7.5	1 M	50 mM	250 ml
グリセロール	87 %	5 %	288 ml
MgCl ₂	1 M	1.5 mM	7.5 ml
NaCl	5 M	150 mM	150 ml
Na ₃ VO ₄	100 mM	1 mM	50 ml

【0159】

5×DP-バッファーは0.22 μ mフィルターを通してろ過し、そして40 ml-アリコット中で-80℃で保管した。これらの溶液は以下の供給元から得た。1.0 M Tris/HCl pH 7.5 (Sigma, T-2663)、87%グリセロール (Merck, カタログ番号04091.2500)；1.0 M MgCl₂ (Sigma, M-1028)；5.0 M NaCl (Sigma, S-5150)。

【0160】

以下の1×DP-バッファーを調製した：

- ・1×DP-バッファー(ビーズ平衡化のための)
- ・1×DP-バッファー/0.4% NP40(ビーズ平衡化およびビーズの第一洗浄工程のための)
- ・1×DP-バッファー/0.2% NP40(ビーズの第二洗浄工程のため、および化合物溶出のための)
- ・1×DP-バッファー/プロテアーゼ阻害剤(第一溶解物希釈工程のための)；25 mlの溶解バッファーあたりプロテアーゼ阻害剤タブレットを1つ加える(EDTA不含タブレット、プロテアーゼ阻害剤カクテル、Roche Diagnostics, 1873580)
- ・1×DP-バッファー/0.4% NP40/プロテアーゼ阻害剤(第二溶解物希釈工程のための)

【0161】

1×DPバッファー／0.4% NP40 (100ml) の調製のための例：

以下の溶液および試薬を合わせ、そして蒸留水を100mlの終体積になるように加える：20mlの5×DPバッファー、5mlの0.5M NaF、2mlの20% NP40、100μlの1M DTT、そして、蒸留水を100mlまで加える。すべてのバッファーは終濃度1mM DTTを含有する。

【0162】

2. 1. 2 ビーズの洗浄および平衡化

キノビーズ（実施例1）を、適切なバッファーによる洗浄および当該バッファーでの平衡化により、結合反応のために調製した。

10

以下の工程を行った：

1. すべての洗浄工程のために15mlファルコンチューブを使用する。
2. 1実験あたり100μlのキノビーズを使用する（確立したビーズ体積）：以下の4つのリガンドとカップリングした（1μmol/mlのカップリング密度）それぞれのビーズの種類の等量（25μl）を混合する：Bis VIII (CZC00001056)、プルバラノールB (CZC00007097)、PD173955誘導体 (CZC00007324)、およびCZC00008004。
3. 3mlの1×DPバッファーで2回、3mlの1×DPバッファー／0.4% NP40で1回、ビーズを洗浄する。各洗浄工程の間、チューブを3-5回ひっくり返し、Heraeus遠心分離機で1200rpmで2分間、4℃で遠心分離した。上清を吸引し、上清を捨てる。最後の洗浄工程の後、1×DPバッファー／0.4% NP40で1：1スラリー（体積／体積）を調製する。

20

【0163】

2. 1. 3 希釈した細胞溶解物の調製

セクション（1. 2）で記載した細胞溶解物を、適切なバッファーによる希釈および遠心分離工程を通じた清澄化により、結合反応のために調製した。以下の工程を行った：

1. 1実験あたり50mgのタンパク質に対応する細胞溶解物の容積を使用する。
2. 37℃の水浴中で溶解物をすばやく解凍し、次いで試料を氷上に保持する。
3. 以下の方法で溶解物を希釈する：
 - 1) 1×DPバッファー／プロテアーゼ阻害剤で溶解物を希釈して、界面活性剤濃度を0.8%から0.4% NP40に減少させる。
 - 2) 1×DPバッファー／0.4% NP40／プロテアーゼ阻害剤で溶解物をさらに希釈して、5mg/mlの最終タンパク質濃度にする。
4. 希釈した溶解物をUZ-ポリカーボネートチューブ（Beckmann, 355654）へと移す。
5. 超遠心を通して希釈した溶解物を清澄にする（20分、4℃、100,000g、TI50.2ローター、予め冷やした超遠心機）。
6. 上清を保存し、そして氷上で保持する。

30

【0164】

2. 1. 4 結合反応および洗浄

タンパク質のリガンドへの結合をさせるために、セクション（2. 1. 2）の洗浄し平衡化したビーズを、ステップ（2. 1. 3）からの希釈した細胞溶解物と接触させた。非特異的に結合したタンパク質は、バックグラウンド結合を減少させるために穏やかな洗浄によって除去した。

40

1. 希釈し清澄にした溶解物と100μlの洗浄したキノビーズを15mlまたは50mlファルコンチューブ中で合わせる。
2. 4℃で2時間インキュベートし、低温室内のROTO SHAKE GENIE (Scientific Industries, Inc.) 上で回転させる。
3. インキュベーション後、4℃でHeraeus遠心分離機または同等物上で、1200rpmで3分間遠心分離する。
4. 上清をビーズを失うことのないよう注意深く除去する。

50

5. ビーズを、90 μ m フィルターを伴うMobicolカラムに移す (MoBiTec, ゲッティンゲン、カタログ番号:M1002-90)。
6. ビーズを10 mlの1×DPバッファー/0.4% NP-40および5 mlの1×DPバッファー/0.2% NP-40で洗浄する。
7. 次の工程に進む前に、洗浄バッファーがカラムを完全に流れ通るようにする。
8. カラムをエッペンドルフチューブ中に置き、そしてそれらを800 rpm、4℃で1分間遠心分離する。カラムを底面リッドで閉じる。

【0165】

2. 1. 5 タンパク質の溶出

1. 60 μ lの2×NuPAGE SDSサンプルバッファーを加える (Invitrogen, NP0007; 使用前に4×バッファーを蒸留水で1:1に希釈する)。 10
2. 試料を50℃で30分間インキュベートする。
3. カラムの底面リッドを開放し、MobiTecカラムを2000 rpmで1分間遠心分離してビーズから溶出物を分離する。
4. 1/10体積の200 mg/mlヨードアセトアミドを加え、室温で30分間インキュベートし、光から保護する。この反応は、質量分析解析のためのシステインのアルキル化を導く。
5. ゲル上に試料をロードする前に、沈殿物を除去するために試料を15000 rpmで5分間遠心分離する。
6. タンパク質分離のために、60 μ lの試料をNuPAGE 4-12%ビス-Trisゲル (Invitrogen, NP0335) へアプライする。 20

【0166】

2. 1. 6 このプロトコルで使用されるストック溶液の調製100 mM Na₃VO₄ストック溶液の調製:

- 1) 9.2 gのNa₃VO₄を400 mlの蒸留水に溶解する。
- 2) 1N NaOHまたは1N HClのいずれかをを用いてpHを10.0に調整する。オルトバナジウム酸ナトリウム溶液の初期pHはバッチごとに多様でありうる。pH10.0において、溶液は黄色となるであろう。
- 3) 溶液を、無色に変わるまで煮沸する (約10分間)。
- 4) 室温まで冷ます。 30
- 5) pHを10.0に再度調整し、そして、工程2および3を、溶液が無色を維持しおよびpHが10.0で安定するまで繰り返す。
- 6) 蒸留水で体積を500 mlに調整する。
- 7) アリコットを-20℃で凍結する。アリコットは数ヶ月間保管できる。

【0167】

500 mM NaFストック溶液の調製:

- 21.0 gのNaF (Sigma, S7920)を500 mlの蒸留水に溶解する。溶液を0.2 μ mフィルターでろ過し、そして4℃で保管する。

【0168】

20% NP40-溶液の調製:

- 40.0 gのNP40 (Sigma, Igepal-CA630, カタログ番号13021)を量る。蒸留水を加えて200 gとする。完全に混合し、そして溶液を室温で保管する。 40

【0169】

1 M DTT溶液の調製:

- 7.7 gのDTT (Biomol, カタログ番号04010)を50 mlの蒸留水に溶解する。溶液を0.22 μ mフィルターでろ過し、そして-20℃で400 μ lのアリコットを凍結する。アリコットは数ヶ月間保管することができる。

【0170】

ヨードアセトアミドストック溶液 (200 mg/ml) の調製:

- 2.0 gのヨードアセトアミド (Sigma, I-6125)を10 mlの蒸留水に溶解する。溶 50

液を0.22 μm フィルターでろ過し、そして -20°C で400 μl のアリコットを凍結する。アリコットは数ヶ月間保管することができる。

【0171】

2.2 抗ホスホチロシン抗体ビーズを用いる免疫沈降

2.2.1 バッファーおよび抗ホスホチロシン抗体ビーズ

固定化抗ホスホチロシン抗体を伴う免疫沈降実験に使用するすべてのバッファーは、キノビーズ実験（上記参照）に使用したものと、DTTを加えないこと、および50 μL の1 mM オカダ酸（Biomol, E1-181；ホスファターゼ阻害剤）を加えてオカダ酸の終濃度を500 nMにすること、を除いて同一である。抗ホスホチロシン抗体ビーズ（共有結合的にカップリングした組換え4G10抗ホスホチロシン抗体を伴うアガロースビーズ）はBiomol（カタログ番号16-199）から得た。

10

【0172】

2.2.2 抗ホスホチロシン抗体の洗浄および平衡化

抗ホスホチロシン抗体ビーズを、適切なバッファーによる洗浄および当該バッファー中の平衡化により結合反応のために調製した。

1. すべての洗浄工程で15 mlのファルコンチューブを使用する。
2. 1実験あたり100 μl 抗ホスホチロシンビーズを使用する。
3. ビーズを3 mlの1×DPバッファー（−DTT）で2回、3 mlの1×DPバッファー／0.4% NP40（−DTT）で1回洗浄する。各洗浄工程の間にチューブを3−5回ひっくり返し、Heraeus遠心分離機中で、 4°C で、1200 rpmで2分間遠心分離する。上清を吸引し、捨てた。

20

最後の洗浄工程の後、1×DPバッファー／0.4% NP40（−DTT）で1：1スラリー（体積／体積）を調製する。

【0173】

2.2.3 希釈した細胞溶解物の調製

細胞溶解物を、適切なバッファーによる希釈および遠心分離工程を通じた清澄化により、結合反応のために調製した。

1. 1実験あたり50 mgのタンパク質に対応する細胞溶解物の容積を使用する。
2. 37°C の水浴中で溶解物をすばやく解凍し、次いで試料を氷上に保持する。
3. 以下の方法で溶解物を希釈する：

30

第一希釈工程：1×DPバッファー／プロテアーゼ阻害剤／オカダ酸／DTT不含、で溶解物を希釈して、界面活性剤濃度を0.8%から0.4% NP-40に減少させる。

第二希釈工程：1×DPバッファー／0.4% NP40／プロテアーゼ阻害剤／オカダ酸／DTT不含、で溶解物をさらに希釈して、5 mg/mlの最終タンパク質濃度にする。

（注：第二希釈工程は、第一希釈工程後の溶解物のタンパク質濃度が5 mg/mlよりも高いときにのみ必要である）。

4. 希釈した溶解物をUZ-ポリカーボネートチューブ（Beckmann, 355654）へと移す。

5. 超遠心を通して希釈した溶解物を清澄にする（20分、 4°C 、100,000 g、TI50.2ローター、予め冷やした超遠心機）。

40

6. 上清を保存し、そして氷上で保持する。

【0174】

2.2.4 結合反応および洗浄工程

タンパク質を抗ホスホチロシンビーズへ結合させるために、洗浄し平衡化した抗ホスホチロシンビーズを、セクション（2.2.3）からの希釈した細胞溶解物と接触させた。非特異的に結合したタンパク質は、バッググラウンド結合を減少させるために穏やかな洗浄によって除去した。

1. 希釈し清澄にした溶解物と100 μl の洗浄したキノビーズを15 mlまたは50 mlファルコンチューブ中で合わせる。

50

2. 4℃で4時間インキュベートし、低温室内のROTO SHAKE GENIE (Scientific Industries, Inc.) 上で回転させる。
3. インキュベーション後、4℃でHeraeus遠心分離機または同等物上で、1200 rpmで3分間遠心分離する。
4. 上清をビーズを失うことのないよう注意深く除去する。
5. ビーズを、90 µmフィルターを伴うMobicolカラムに移す (MoBiTec, ゲッティンゲン、カタログ番号:M1002-90)。
6. ビーズを10 mlの1×DPバッファー/0.4% NP/DTT不含、および5 mlの1×DPバッファー/0.2% NP-40/DTT不含、で洗浄する。
7. 次の工程に進む前に、洗浄バッファーがカラムを完全に流れ通るようにする。
8. カラムをエッペンドルフチューブ中に置き、そしてそれらを800 rpm、4℃で1分間遠心分離する。カラムを底面リッドで閉じる。

10

【0175】

2. 2. 5 結合したタンパク質の溶出

1. 60 µlの2×NuPAGE SDSサンプルバッファーを加える (Invitrogen, NP0007; 使用前に4×バッファーを蒸留水で1:1に希釈する)。
2. 試料を50℃で30分間インキュベートする。
3. カラムの底面リッドを開放し、MobiTecカラムを2000 rpmで1分間遠心分離してビーズから溶出物を分離する。
4. 1/10体積の200 mg/mlヨードアセトアミドを加え、室温で30分間インキュベートし、光から保護する。この反応は、質量分析解析のためのシステインのアルキル化を導く。
5. ゲル上に試料をロードする前に、沈殿物を除去するために試料を15000 rpmで5分間遠心分離する。
6. タンパク質分離のために、60 µlの試料をNuPAGE 4-12%ビス-Trisゲル (Invitrogen, NP0335) へアプライする。

20

【0176】

3. 溶出した酵素 (例えば、キナーゼ) の質量分析解析

プロテオタイピック (proteotypic) ペプチドの説明

SDS-PAGEで分離したタンパク質混合物のトリプシン消化は、各タンパク質について異なる物理化学的性質の多数の別個のペプチド断片を生じる。これらのペプチドは、タンパク質同定 (ID) のために使用される質量分析法に基づく解析プラットフォーム、これはナノキャピラリー逆相液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法 (RP-LC-MS/MS) である、についての適合性が異なる。結果として、同じ源のタンパク質由来のペプチドについてのペプチド頻度が大きな度合いで異なり、もっとも頻繁に観察されるペプチドであってこのタンパク質の同定に「典型的に」寄与するものは、「プロテオタイピック (proteotypic)」ペプチドと名づけられる。よって、「プロテオタイピックペプチド」は実験的によく観察されるペプチドであって、特定のタンパク質やタンパク質アイソフォームを一意的に同定するものである。

30

【0177】

プロテオタイピックペプチドの利点

タンパク質同定のためのプロテオタイピックペプチドの使用は、情報の豊富なシグニチャーペプチドの存在についてのスクリーニングにおけるタンパク質同定工程に焦点をあてることによって、多数の公知の標的タンパク質の迅速で焦点を絞った同定および定量を可能にする。

40

【0178】

プロテオタイピックペプチドの実験的同定

プロテオタイピックペプチドのリストを生じる一つの戦略は、タンパク質同定データを実験的に集め、そしてタンパク質を一意的に同定する共通して観察されるペプチドのデータセットを調べることである。

50

【0179】

CZデータセット（多重ペプチドIDまたは手動で立証した単一ペプチドID）における少なくとも10の絶対的な同定を伴うIPIデータベースタンパク質エントリーのそれぞれについて、寄与ペプチドについてのペプチド頻度を計算する。データベースサーチエンジンMascoTM (Matrix Science) による特異的で最もよいペプチド対スペクトル適合のみが考慮される。

【0180】

特定のタンパク質についてのプロテオタイピックペプチドの定義づけのために、ペプチドをペプチド頻度が下がっていく方に並べ、そして累積ペプチドの存在が計算される：この値は各ペプチドについて、このペプチドまたはより高いペプチド頻度を伴ういずれかのペプチドが存在する、同定の比率を与える。プロテオタイピックペプチドは、95%の累積存在のカットオフ、すなわち、このタンパク質についての少なくとも95%の同定事象は少なくとも1のプロテオタイピックペプチドに基づく、を用いて定義される。

【0181】

3. 1 質量分析解析前のタンパク質消化および試料調製

タンパク質は濃縮し、4-12% NuPAGE（登録商標） Novex ゲル (Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド) 上で分離し、そしてコロイド状のクーマシーブルーで染色した。ゲルのレーンは体系的に全分離範囲を横方向に ≤ 48 スライス (バンドおよびバンド間領域) に切断し、そして、本質的にShevchenkoら、1996, Analytical Chemistry 68: 850-858に記載されるようにゲル内トリプシン消化を行った。簡単には、ゲルプラグを50% EtOH中の5mM NH_4HCO_3 中で一晩脱染色し、5mM NH_4HCO_3 中の12.5 ng/ μl のトリプシンで4時間消化した。ペプチドを、1%ギ酸で抽出し、第二の96ウェルプレートへと移して、そして真空下で乾燥させた。乾燥したペプチドを、10 μl の水中の0.1%ギ酸に再懸濁し、そしてタンパク質同定のために5 μl をLC-MS/MSシステムにインジェクトした。

【0182】

3. 2 質量分析データ収集

ペプチド試料をナノLCシステム (CapLC, WatersまたはUltimate, Dionex)、これは四重極飛行時間質量分析器 (QTOF2, QTOR Ultima, QTOF Micro MicromassまたはQSTAR Pulsar, Sciex) またはイオントラップ質量分析器 (LCQ Deca XP, LTQ, Thermo-Finnigan) に直接接続された、へとインジェクトした。ペプチドはLCシステム上で、15分および45分の間の典型的なグラジエント時間を伴う水性溶媒および有機溶媒のグラジエントを用いて分離した。溶媒Aは0.1%ギ酸中の5%アセトニトリルであり、そして溶媒Bは0.1%ギ酸中の70%アセトニトリルであった。

【0183】

3. 3 タンパク質同定

LC-MS/MS実験で得られたペプチド質量および断片化データは、企業内 (in-house) で監督したバージョンのInternational Protein Index (IPI) タンパク質配列データベース (EBI) のクエリーに用いた。タンパク質は、測定されたペプチド質量および断片化データと、データベース内のエントリーから計算した同じデータとを、ソフトウェアツールMasco (Matrix Science; Perkinsら、1991, Electrophoresis 20: 3551-3567) を用いて関連付けることにより同定した。サーチ基準は、分析にどの質量分析器を使用したかによって変化した。

【0184】

4. 結果

シグナロキノーム実験の結果を図2に示す。この図は、キノビーズを使用した薬剤選抜 (drug pulldown) (左の丸) および抗ホスホチロシン抗体ビーズでの伝統的な免疫沈降 (右の丸) の比較を示す。キノビーズ実験においては全体で626のタンパク質が同定され、それらのうち100がキナーゼであった。免疫沈降 (IP) 実験においては全体で503のタンパク質が同定され、そのうちの12がキナーゼであった。両方の実験で同定さ

れたキナーゼ（共通のキナーゼ）は重なり合うエリアに並べた。この結果は、抗ホスホチロシン抗体ビーズ（12キナーゼ）と比較して、キノビーズは有意により多くのキナーゼを同定した（100キナーゼ）ことを示す。

【0185】

両方の実験手法で同定されたキナーゼを以下の表に列挙する。加えて、当該キナーゼのプロテオタイピックペプチドの配列を、別の表に列挙する。

【0186】

表6：免疫沈降（IP）後に同定されたキナーゼ。キナーゼ名はヒトキナーゼ命名法（<http://kinase.com>）およびManningら、2002, Science 298, 1912-1934 補足的な資料に特定されているように）による。

【0187】

【表6-1】

キナーゼ 同定	キナーゼ名	スコア	同定された ペプチドの数	入手可能および同定 された 実験的プロテオタイ ピックペプチド
1	DNAPK	606	20	X
2	TIF1b	202	6	X
3	p38a	343	11	X
4	CDK2	196	4	X
5	TYK2	77	3	X
6	LYN	67	2	X

【0188】

【表6-2】

キナーゼ 同定	キナーゼ名	スコア	同定された ペプチドの数	入手可能および同定 された 実験的プロテオタイ ピックペプチド
7	EGFR	2463	162	X
8	FAK	1203	51	X
9	ACK	160	6	
10	KHS2	65	2	

【0189】

表7：免疫沈降（IP、図6参照）後に同定されたキナーゼについてのプロテオタイピックペプチドの配列。キナーゼ名はヒトキナーゼ命名法（<http://kinase.com>）およびManningら、2002, Science 298, 1912-1934 補足的な資料に特定されているように）による。

【0190】

【表 7 - 1】

実験	キナーゼ	同定された プロテオタイピックペプチド
IP	CDK2	ALFPGDSEIDQLFR
IP	CDK2	IGEGTYGVVYK
IP	CDK2	FMDASALTGIPLPLIK
IP	DNAPK	HGDLPDIIQIK
IP	DNAPK	LACDVDQVTR
IP	DNAPK	AALSALESFLK
IP	DNAPK	DQNILLGTTYR
IP	DNAPK	FMNAVFFLLPK
IP	DNAPK	VTELALTASDR

【 0 1 9 1 】

【表 7 - 2】

実験	キナーゼ	同定された プロテオタイピックペプチド
IP	DNAPK	LGASLAFNNIYR
IP	DNAPK	LNESTFDTQITK
IP	DNAPK	QLFSSLFSGILK
IP	DNAPK	NILEESLCELVAK
IP	DNAPK	TVSLLDENNVSSYLSK
IP	DNAPK	TVGALQVLGTEAQSSLLK
IP	EGFR	VLGSGAFGTVYK
IP	EGFR	IPLNLQHIR
IP	EGFR	GDSFTHTPPLDPQELDILK
IP	FAK	LGDFGLSR
IP	FAK	FLQEALTMR
IP	FAK	FFEILSPVYR
IP	FAK	LLNSDLGELINK
IP	FAK	TLLATVDETIPLLPASTHR
IP	HER2/ErbB2	VLGSGAFGTVYK
IP	LYN	EEPIYIITEYMAK
IP	p38a	LTDDHVQFLIYQILR
IP	p38a	NYIQSLTQMPK
IP	p38a	LTGTPPAYLINR
IP	TIF1b	IVAERPGTNSTGPAPMAPPR
IP	TYK2	HGIPLEEVAK
IP	TYK2	LSDPGVGLGALSR

【 0 1 9 2 】

表 8：キノビーズでの薬物選抜後に同定されたキナーゼ。キナーゼ名はヒトキナーゼ命名法 (<http://kinase.com>) およびManningら、2002, Science 298, 1912-1934 補足的な資料に特定されているように) による。

【 0 1 9 3 】

10

20

30

40

【表 8 - 1】

キナーゼ 同定	キナーゼ名	スコア	同定された ペプチドの数	入手可能および 同定された 実験的プロテオ タイプックペプ チド	I Pにおいても同 定された (表 1 を参照)
1	DNAPK	6592	263	X	IP
2	FRAP	356	9	X	
3	ATM	113	3	X	
4	ATR	91	2	X	
5	CDC2	309	11	X	
6	YES	1747	100	X	
7	CaMK2d	1003	41	X	
8	JNK1	1011	45	X	
9	JNK2	317	11	X	
10	CaMK2g	811	21	X	
11	p38a	1145	90	X	IP
12	TNK1	81	4	X	
13	GSK3B	1408	81	X	
14	FYN	1845	115	X	
15	SRC	1780	91	X	
16	Erk2	1677	200	X	
17	CaMK2b	122	3	X	

【 0 1 9 4 】

【表 8 - 2】

キナーゼ同定	キナーゼ名	スコア	同定されたペプチドの数	入手可能および同定された実験的プロテオタイピックペプチド	I Pにおいても同定された (表 1 を参照)
18	JNK3	590	26	X	
19	CK2a1	316	11	X	
20	GSK3A	1390	117	X	
21	AurA	198	8	X	
22	RIPK2	634	19	X	
23	CDK2	1172	50	X	IP
24	ADCK1	88	4		
25	CK1a	566	21	X	
26	GAK	1995	61	X	
27	AAK1	123	3	X	
28	CDK9	379	13	X	
29	CK1d	206	7	X	
30	Erk1	566	26	X	
31	NEK9	1947	102	X	
32	TYK2	222	6	X	IP
33	AMPKa1	93	3	X	
34	LYN	1783	67	X	IP
35	AurB	287	10	X	
36	CK1e	314	10	X	
37	EGFR	165	3	X	IP
38	EphB2	1165	43	X	
39	ALK2	299	11	X	

【 0 1 9 5 】

【表 8 - 3】

キナーゼ 同定	キナーゼ名	スコア	同定された ペプチドの 数	入手可能および 同定された 実験的プロテオ タイピックペプ チド	I Pにおいても同 定された (表 1 を参照)
40	DDR1	759	28	X	
41	TBK1	2042	72	X	
42	CSK	1584	102	X	
43	TEC	50	2		
44	ZAK	499	16	X	
45	ALK4	472	9	X	
46	ADCK3	309	8	X	
47	MAP2K5	795	32		
48	EphB4	2237	165	X	
49	ARG	2128	69	X	
50	FER	2762	130	X	
51	RSK2	2100	99	X	
52	CK2a2	930	32	X	
53	BMPR1A	676	19	X	
54	TGFbR1	478	15	X	
55	EphA5	114	4	X	
56	BRK	107	3		
57	FAK	1933	95	X	IP
58	ILK	209	6	X	
59	CDK5	699	27	X	
60	DDR2	1073	44	X	
61	JAK1	1083	31		

【 0 1 9 6 】

【表 8 - 4】

キナーゼ 同定	キナーゼ名	スコア	同定された ペプチドの 数	入手可能および 同定された 実験的プロテオ タイプックペプ チド	I Pにおいても同 定された (表 1 を参照)
62	MYT1	152	5		
63	PKCd	53	4		
64	RSK3	2227	117	X	
65	Wee1	550	18	X	
66	ACTR2	193	5		
67	MAP3K2	383	15		
68	ACTR2B	82	2		
69	Wee1B	550	18	X	
70	ABL	1133	35	X	
71	MET	503	12	X	
72	BRAF	361	7		
73	INSR	1807	64	X	
74	KHS1	393	12		
75	PAK4	448	15	X	
76	PKD1	58	2		
77	PKD2	58	2	X	
78	IGF1R	935	28	X	
79	PHKg2	519	16	X	
80	CaMKK2	199	5	X	
81	MAP2K2	294	6	X	
82	TGFbR2	49	2		
83	Fused	42	2		

【 0 1 9 7 】

【表 8 - 5】

キナーゼ 同定	キナーゼ名	スコア	同定された ペプチドの 数	入手可能および 同定された 実験的プロテオ タイプックペプ チド	I Pにおいても同 定された (表 1 を参照)
84	EphA2	2099	90	X	
85	ACK	169	4		IP
86	NLK	46	2		
87	CDK7	623	20	X	
88	CHK2	58	2	X	
89	KHS2	60	4		IP
90	MLK3	59	1	X	
91	PKCe	53	4	X	
92	PKCh	53	4	X	
93	PYK2	106	3	X	
94	TAO2	120	3		
95	CK1g1	45	2	X	
96	LIMK1	271	6		
97	MAP2K1	480	14		
98	HRI	52	1		
99	SIK	36	1		
100	Erk7	67	1		
101	NEK2	145	4		
102	NEK7	175	5		
103	BMPR1B	179	5	X	
104	MAP2K3	133	5		
105	FGFR2	514	17		

【 0 1 9 8 】

表 9：キノビーズでの薬物選抜後に同定されたキナーゼについてのプロテオタイプックペプチドの配列。

【 0 1 9 9 】

【表 9 - 1】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	AAK1	ADIWALGCLLYK
キノビーズ DP	ABL	GQGESDPLDHEPAVSPLLPR
キノビーズ DP	ABL	WTAPESLAYNK
キノビーズ DP	ABL	VADFGLSR
キノビーズ DP	ABL	NGQGWVPSNYITPVNSLEK
キノビーズ DP	ADCK3	DKLEYFEERPFAAASIGQVHLAR
キノビーズ DP	ADCK3	SFTDLYIQIR
キノビーズ DP	ADCK3	VALLDFGATR
キノビーズ DP	ADCK3	AVLGSSPFLSEANAER
キノビーズ DP	ALK2	WFSDPTLTSLAK
キノビーズ DP	ALK4	TIVLQEIIIGK
キノビーズ DP	ALK4	EAEIYQTVMLR
キノビーズ DP	AMPK α 1	IGHYILGDTLGVGTFGK
キノビーズ DP	ARG	AASSSSVVPYLPR
キノビーズ DP	ARG	ESESSPGQLSISLR
キノビーズ DP	ARG	GAQASSGSPALPR
キノビーズ DP	ARG	VLGYNQNGEWSEVR
キノビーズ DP	ARG	VPVLISPTLK
キノビーズ DP	ARG	WTAPESLAYNTFSIK
キノビーズ DP	ARG	VADFGLSR
キノビーズ DP	ARG	NGQGWVPSNYITPVNSLEK

【 0 2 0 0 】

【表 9 - 2】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	ATM	LVVNLLQLSK
キノビーズ DP	ATR	APLNETGEVVNEK
キノビーズ DP	AurA	SKQPLPSAPENNPEEELASK
キノビーズ DP	AurA	VEFTFPDFVTEGAR
キノビーズ DP	AurB	IYLILEYAPR
キノビーズ DP	AurB	SNVQPTAAPGQK
キノビーズ DP	BMPR1A	FNSDTNEVDVPLNTR
キノビーズ DP	BMPR1A	WNSDECLR
キノビーズ DP	BMPR1A	YEGSDFQCK
キノビーズ DP	BMPR1A	YMAPEVLDESLNK
キノビーズ DP	BMPR1A	ETEIQTVLMR
キノビーズ DP	BMPR1A	HENILGFIAADIK
キノビーズ DP	BMPR1A	VFFTTEEASWFR
キノビーズ DP	BMPR1A	YGEVWMGK
キノビーズ DP	BMPR1B	ETEIQTVLMR
キノビーズ DP	BMPR1B	HENILGFIAADIK
キノビーズ DP	BMPR1B	VFFTTEEASWFR
キノビーズ DP	BMPR1B	YGEVWMGK
キノビーズ DP	CaMK2b	LTQYIDGQGRPR
キノビーズ DP	CaMK2b	NLINQMLTINPAK
キノビーズ DP	CaMK2b	AGAYDFPSPEWDTVTPEAK
キノビーズ DP	CaMK2b	DLKPENLLLASK
キノビーズ DP	CaMK2d	FYFENALSK
キノビーズ DP	CaMK2d	AGAYDFPSPEWDTVTPEAK

【 0 2 0 1】

【表 9 - 3】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	CaMK2d	DLKPENLLLASK
キノビーズ DP	CaMK2g	FYFENLLSK
キノビーズ DP	CaMK2g	LTQYIDGQGRPR
キノビーズ DP	CaMK2g	NLINQMLTINPAK
キノビーズ DP	CaMK2g	AGAYDFPSPEWDTVTPEAK
キノビーズ DP	CaMK2g	DLKPENLLLASK
キノビーズ DP	CaMKK2	GPIEQVYQEIAILK
キノビーズ DP	CaMKK2	LAYNENDNTYYAMK
キノビーズ DP	CDC2	DLKPQNLLIDDKGTIK
キノビーズ DP	CDC2	NLDENGLDLLSK
キノビーズ DP	CDC2	SPEVLLGSAR
キノビーズ DP	CDC2	IGEGTYGVVYK
キノビーズ DP	CDK2	APELLLGCK
キノビーズ DP	CDK2	FMDASALTGIPLPLIK
キノビーズ DP	CDK2	ALFPGDSEIDQLFR
キノビーズ DP	CDK2	IGEGTYGVVYK
キノビーズ DP	CDK5	IGEGTYGTVFK
キノビーズ DP	CDK5	SFLFQLLK
キノビーズ DP	CDK7	APELLFGAR
キノビーズ DP	CDK7	VPFLPGDSDLQLTR
キノビーズ DP	CDK9	GSQITQQSTNQSR
キノビーズ DP	CDK9	IGQGTFGEVFK
キノビーズ DP	CK1a	HPQLLYESK
キノビーズ DP	CK1a	LFLIDFGLAK

【 0 2 0 2 】

【表 9 - 4】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	CK1d	FDDKPDYSYLR
キノビーズ DP	CK1d	GNLVYIIDFGLAK
キノビーズ DP	CK1d	TVLLLLADQMISR
キノビーズ DP	CK1e	FDDKPDYSYLR
キノビーズ DP	CK1e	GNLVYIIDFGLAK
キノビーズ DP	CK1e	TVLLLLADQMISR
キノビーズ DP	CK1g1	TLFTDLFEK
キノビーズ DP	CK2a1	GGPNIITLADIVKDPVSR
キノビーズ DP	CK2a1	QLYQTLTDYDIR
キノビーズ DP	CK2a1	TPALVFEHVNNTDFK
キノビーズ DP	CK2a2	HLVSPEALDLLDKLLR
キノビーズ DP	CK2a2	LIDWGLAEFYHPAQEYNVR
キノビーズ DP	CK2a2	QLYQILTDFDIR
キノビーズ DP	CK2a2	TPALVFEYINNTDFK
キノビーズ DP	CK2a2	VLGTEELYGYLK
キノビーズ DP	CSK	HSNLVQLLGVIVEEK
キノビーズ DP	CSK	LLYPPETGLFLVR
キノビーズ DP	CSK	VMEGTVAAQDEFYR
キノビーズ DP	DDR1	AQPFGQLTDEQVIENAGEFFR
キノビーズ DP	DDR1	NCLVGENFTIK
キノビーズ DP	DDR1	NLYAGDYR
キノビーズ DP	DDR1	QVYLSRPPACPQGLYELMLR
キノビーズ DP	DDR1	WMAWECILMGK
キノビーズ DP	DDR1	YLATLNFVHR

【 0 2 0 3 】

【表 9 - 5】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	DDR2	DVAVEEFPR
キノビーズ DP	DDR2	FMATQIASGMK
キノビーズ DP	DDR2	HEPPNSSSSDVR
キノビーズ DP	DDR2	IFPLRPDYQEPR
キノビーズ DP	DDR2	NLYSGDYR
キノビーズ DP	DDR2	QTYLPQPAICPDSVYK
キノビーズ DP	DDR2	WMSWESILLGK
キノビーズ DP	DDR2	YLSSLNFBVHR
キノビーズ DP	DNAPK	AALSALESFLK
キノビーズ DP	DNAPK	DQNILLGTTYR
キノビーズ DP	DNAPK	FMNAVFFLLPK
キノビーズ DP	DNAPK	FVPLLPGNR
キノビーズ DP	DNAPK	GLSSLLCNFTK
キノビーズ DP	DNAPK	HGDLDPDIQIK
キノビーズ DP	DNAPK	INQVFHFGSCITEGNETLK
キノビーズ DP	DNAPK	IPALDLLIK
キノビーズ DP	DNAPK	LACDVDQVTR
キノビーズ DP	DNAPK	LAGANPAVITCDELLLGHEK
キノビーズ DP	DNAPK	LGASLAFNNIYR
キノビーズ DP	DNAPK	LGNPIVPLNIR
キノビーズ DP	DNAPK	LLEEALLR
キノビーズ DP	DNAPK	LNESTFDTQITK
キノビーズ DP	DNAPK	LPLISGFYK
キノビーズ DP	DNAPK	LPSNTLDR

【 0 2 0 4 】

【表 9 - 6】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	DNAPK	LQETLSAADR
キノビーズ DP	DNAPK	MSTSPEAFLALR
キノビーズ DP	DNAPK	NILEESLCELVAK
キノビーズ DP	DNAPK	NLLIFENLIDLK
キノビーズ DP	DNAPK	NLSSNEAISLEEIR
キノビーズ DP	DNAPK	QITQSALLAEAR
キノビーズ DP	DNAPK	QLFSSSLFSGILK
キノビーズ DP	DNAPK	SLGPPQGEEDSVPR
キノビーズ DP	DNAPK	SQGCSEQVLTVLK
キノビーズ DP	DNAPK	TVGALQVLGTEAQSSLLK
キノビーズ DP	DNAPK	TVSLLDENNVSSYLSK
キノビーズ DP	DNAPK	VCLDIYK
キノビーズ DP	DNAPK	VTELALTASDR
キノビーズ DP	DNAPK	VVQMLGSLGGQINK
キノビーズ DP	EGFR	GDSFTHTPPLDPQELDILK
キノビーズ DP	EphA2	DGEFSVLQLVGMLR
キノビーズ DP	EphA2	FADIVSILDK
キノビーズ DP	EphA2	LPSTSGSEGVPFR
キノビーズ DP	EphA2	NILVNSNLVCK
キノビーズ DP	EphA2	VSDFGLSR
キノビーズ DP	EphA5	WTAPEAIAFR
キノビーズ DP	EphA5	VSDFGLSR
キノビーズ DP	EphB2	AGAIYVFQVR
キノビーズ DP	EphB2	FGQIVNTLDK

【 0 2 0 5】

【表 9 - 7】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	EphB2	TFPNWMENPWVK
キノビーズ DP	EphB2	VDTIAADESFSQVDLGGR
キノビーズ DP	EphB2	NILVNSNLVCK
キノビーズ DP	EphB2	VSDFGLSR
キノビーズ DP	EphB4	APSGAVLDYEVK
キノビーズ DP	EphB4	FPQVVSALDK
キノビーズ DP	EphB4	LNDGQFTVIQLVGMLR
キノビーズ DP	EphB4	WTAPEAIAFR
キノビーズ DP	EphB4	NILVNSNLVCK
キノビーズ DP	EphB4	VSDFGLSR
キノビーズ DP	Erk1	NYLQSLPSK
キノビーズ DP	Erk1	APEIMLNSK
キノビーズ DP	Erk1	YIHSANVLHR
キノビーズ DP	Erk1	ICDFGLAR
キノビーズ DP	Erk2	FRHENIIGINDIIR
キノビーズ DP	Erk2	GQVFDVGPR
キノビーズ DP	Erk2	LKELIFEETAR
キノビーズ DP	Erk2	NYLLSLPHK
キノビーズ DP	Erk2	VADPDHDHTGFLTEYVATR
キノビーズ DP	Erk2	APEIMLNSK
キノビーズ DP	Erk2	YIHSANVLHR
キノビーズ DP	Erk2	ICDFGLAR
キノビーズ DP	FAK	FFEILSPVYR
キノビーズ DP	FAK	FLQEALTMR

【 0 2 0 6 】

【表 9 - 8】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	FAK	LLNSDLGELINK
キノビーズ DP	FAK	TLLATVDETIPLLPASTHR
キノビーズ DP	FAK	LGDFGLSR
キノビーズ DP	FER	LQDWELR
キノビーズ DP	FER	QEDGGVYSSSGLK
キノビーズ DP	FER	SGVVLLNPIPK
キノビーズ DP	FER	WTAPEALNYGR
キノビーズ DP	FRAP	GPTPAILESILISINNK
キノビーズ DP	FRAP	VLGLLGALDPYK
キノビーズ DP	FYN	EVLEQVER
キノビーズ DP	FYN	WTAPEAAALYGR
キノビーズ DP	FYN	LIEDNEYTAR
キノビーズ DP	FYN	GSLDLFLK
キノビーズ DP	FYN	IADFGLAR
キノビーズ DP	GAK	ALVEEEITR
キノビーズ DP	GAK	AMLQVNPEER
キノビーズ DP	GAK	AVVMTPVPLFSK
キノビーズ DP	GAK	IAVMSFPAEGVESALK
キノビーズ DP	GAK	TPEIIDLYSNFPIGEYK
キノビーズ DP	GSK3A	VIGNGSFGVVYQAR
キノビーズ DP	GSK3A	VTTVVATLGQGPER
キノビーズ DP	GSK3A	YFFYSSGEK
キノビーズ DP	GSK3B	LLEYTPTAR
キノビーズ DP	GSK3B	LYMYQLFR

【 0 2 0 7 】

【表 9 - 9】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	GSK3B	VIGNGSFGVVYQAK
キノビーズ DP	GSK3B	YFFYSSGEK
キノビーズ DP	IGF1R	AENGP GPGVLVLR
キノビーズ DP	IGF1R	HSHALVSLSFLK
キノビーズ DP	IGF1R	MYFAFNPK
キノビーズ DP	IGF1R	TTINNEYNYR
キノビーズ DP	IGF1R	VAGLESLGDLFPNLT VIR
キノビーズ DP	IGF1R	DIYETDYYR
キノビーズ DP	IGF1R	IEFLNEASVMK
キノビーズ DP	IGF1R	IGDFGMTR
キノビーズ DP	ILK	MYAPAWVAPEALQK
キノビーズ DP	INSR	DLLGFMLFYK
キノビーズ DP	INSR	ELGQGSFGMVYEGNAR
キノビーズ DP	INSR	ESLVISGLR
キノビーズ DP	INSR	TIDSVTSAQELR
キノビーズ DP	INSR	TVNESASLR
キノビーズ DP	INSR	WEPYWPPDFR
キノビーズ DP	INSR	DIYETDYYR
キノビーズ DP	INSR	IEFLNEASVMK
キノビーズ DP	INSR	WMAPESLK
キノビーズ DP	INSR	IGDFGMTR
キノビーズ DP	JNK1	NIIGLLNVFTPQK
キノビーズ DP	JNK1	APEVILGMGYK
キノビーズ DP	JNK1	ILDFGLAR

【 0 2 0 8】

【表 9 - 1 0】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	JNK2	NIISLLNVFTPQK
キノビーズ DP	JNK2	APEVILGMGYK
キノビーズ DP	JNK2	ILDFGLAR
キノビーズ DP	JNK3	NIISLLNVFTPQK
キノビーズ DP	JNK3	APEVILGMGYK
キノビーズ DP	JNK3	ILDFGLAR
キノビーズ DP	LYN	EEPIYIITEYMAK
キノビーズ DP	LYN	GSLLDLFLK
キノビーズ DP	LYN	IADFGLAR
キノビーズ DP	MAP2K2	ISELGAGNGGVVTK
キノビーズ DP	MAP2K2	YPIPPDAK
キノビーズ DP	MET	AFFMLDGILSK
キノビーズ DP	MET	DLIGFGLQVAK
キノビーズ DP	MLK3	ITVQASPGLDR
キノビーズ DP	NEK9	AGGGAAEQEELHYIPR
キノビーズ DP	NEK9	LGINLLGGPLGGK
キノビーズ DP	NEK9	LQQENLQIFTQLQK
キノビーズ DP	NEK9	SSTVTEAPIAVVTSR
キノビーズ DP	NEK9	TSEVYVWGGGK
キノビーズ DP	p38a	LTGTPPAYLINR
キノビーズ DP	p38a	NYIQSLTQMPK
キノビーズ DP	p38a	SLEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVK
キノビーズ DP	p38a	LTDDHVQFLIYQILR
キノビーズ DP	p38a	ILDFGLAR

【 0 2 0 9】

【表 9 - 1 1】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	PAK4	AALQLVVDPGDPR
キノビーズ DP	PHKg2	LTAEQALQHPFFER
キノビーズ DP	PHKg2	SLLEAVSFLHANNIVHR
キノビーズ DP	PHKg2	VAVWTVLAAGR
キノビーズ DP	PHKg2	LSPEQLEEVN
キノビーズ DP	PYK2	EIITSILLSGR
キノビーズ DP	PYK2	EVGLDLFFPK
キノビーズ DP	PYK2	VLANLAHPPAE
キノビーズ DP	PYK2	LGDFGLSR
キノビーズ DP	RIPK2	CLIELEPVLR
キノビーズ DP	RIPK2	SLPAPQDNDFLSR
キノビーズ DP	RIPK2	SPSLNLLQNK
キノビーズ DP	RIPK2	TQNILLDNEFHVK
キノビーズ DP	RSK2	EASAVLFTITK
キノビーズ DP	RSK2	LGMPQFLSPEAQSLR
キノビーズ DP	RSK2	NQSPVLEPVGR
キノビーズ DP	RSK2	LYLILDFLR
キノビーズ DP	RSK3	APQAPLHSVQQLHGK
キノビーズ DP	RSK3	EASFVLHTIGK
キノビーズ DP	RSK3	LGMPQFLSTEAQSLR
キノビーズ DP	RSK3	LYLILDFLR
キノビーズ DP	SRC	AANILVGENLVCK
キノビーズ DP	SRC	WTAPEAAALYGR
キノビーズ DP	SRC	LIEDNEYTAR

【 0 2 1 0 】

【表 9 - 1 2】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	SRC	GSLLDFLK
キノビーズ DP	TBK1	EPLNTIGLIYEK
キノビーズ DP	TBK1	FGSLTMDGGLR
キノビーズ DP	TBK1	IISNQELIYEGR
キノビーズ DP	TBK1	LFAIEEETTR
キノビーズ DP	TBK1	TTEENPIFVVS
キノビーズ DP	TBK1	VIGEDGQSVYK
キノビーズ DP	TGFbR1	HDSATDTIDIAPNHR
キノビーズ DP	TGFbR1	TIVLQESIGK
キノビーズ DP	TGFbR1	TLSQLSQEGIK
キノビーズ DP	TGFbR1	VPNEEDPSLDRPFISEGTTLK
キノビーズ DP	TGFbR1	EAEIYQTVMLR
キノビーズ DP	TNK1	MLPEAGSLWLLK
キノビーズ DP	TYK2	LGLAEGTSPFIK
キノビーズ DP	Wee1B	IPQVLSQEFTELLK
キノビーズ DP	Wee1B	ISSPQVEEGDSR
キノビーズ DP	YES	LLLNPNGNQR
キノビーズ DP	YES	LPQLVDMAAQLADGMAYIER
キノビーズ DP	YES	SDVWSFGILQTELVTK
キノビーズ DP	YES	AANILVGENLVCK
キノビーズ DP	YES	EVLEQVER
キノビーズ DP	YES	FQIINNTGDDWEAR
キノビーズ DP	YES	WTAPEAAALYGR
キノビーズ DP	YES	LIEDNEYTAR

【 0 2 1 1 】

【表 9 - 1 3】

実験	キナーゼ名	同定された プロテオタイピックペプチド
キノビーズ DP	YES	GSLDFLK
キノビーズ DP	YES	IADFGLAR
キノビーズ DP	ZAK	CEIEATLER
キノビーズ DP	ZAK	GLEGLQVAWLVEK
キノビーズ DP	ZAK	LTIPSSCPR
キノビーズ DP	ZAK	NVIAADGVLK

10

【 0 2 1 2】

実施例 3：タンパク質溶出のための試験化合物を用いたスクリーニングアッセイ

この実施例は、キノビーズに結合したタンパク質と非修飾試験化合物の競合溶出を説明する（特に本発明の第四の側面を参照）。キノビーズ（実施例 1 に記載）をマウス脳溶解物と接触させ、結合したタンパク質を種々の試験化合物で溶出し、そして放出されたタンパク質を質量分析法で解析した。

20

【 0 2 1 3】

1. 生物学的試料（組織溶解物）の調製1. 1 溶解物の調製

マウス脳溶解物を、タンパク質の構造および機能を保持する穏やかな条件下で、溶解バッファー（マウス脳あたり 5 m l のバッファー）中での機械的破壊により調製した。以下の工程を行った：

- ・組織を室温または 3 7 °C ですばやく解凍し、次いで組織を 1 × 溶解バッファーを含有するガラス瓶に移す（Polytron PT 3100 ホモジナイザーを使用するのに十分な大きさのバイアルを使用する）
- ・器官／組織を、低温室中で 4 °C、5 0 0 0 - 7 0 0 0 r p m で 1 0 秒パルスで 4 回で溶解する
- ・ホモジネートを予め冷やした 5 0 m l ファルコンチューブに移す
- ・ホモジネートを氷上で 3 0 分間インキュベートする
- ・6 0 0 0 g で 1 0 分間、4 °C で細胞を遠心する（予め冷やした S orvall SLA600 で 6 0 0 0 r p m）
- ・上清を U Z - ポリカーボネートチューブ（Beckmann, 355654）へ移す
- ・1 4 5, 0 0 0 g で 1 時間、4 °C で上清を遠心する（予め冷やした Ti50.2 で 4 0, 0 0 0 r p m）
- ・上清を保存し（可能であれば脂質層のほとんどを除去し捨てる）、上清をガラス瓶に移し、そして氷上で保管する
- ・Bradford アッセイ（BioRad）によりタンパク質濃度を決定する。典型的なタンパク質濃度は、5 - 1 0 m g / m l の範囲内である。
- ・1 5 ないし 5 0 m l ファルコンチューブにアリコットを調製する
- ・液体窒素中でアリコットを凍結し、そして - 8 0 °C でそれらを保管する

30

40

【 0 2 1 4】

1. 2 溶解バッファーおよびストック溶液の調製0. 8 % N P 4 0 を伴う 1 0 0 m l 1 × 溶解バッファーの調製

以下の溶液または試薬を合わせ、そして蒸留水を 1 0 0 m l の終体積まで加える：2 0 m l の 5 × 溶解バッファー（下記参照）、1 0 0 μ l の 1 M D T T、5 m l の 0. 5 M N a F、4 m l の 2 0 % N P 4 0、4 つのコンプリート E D T A 不含タブレット（ブ

50

ロテアーゼ阻害剤カクテル、Roche Diagnostics、1 873 580)、蒸留水を100 mlまで加える。

【0215】

表10: 5×溶解バッファの調製

【0216】

【表10】

基質:	ストック溶液	1x 溶解バッファ 中の最終濃度	115x 溶解バッファ について添加
Tris/HCl pH 7.5	1 M	50 mM	250 ml
グリセロール	87 %	5 %	288 ml
MgCl ₂	1 M	1.5 mM	7.5 ml
NaCl	5 M	150 mM	150 ml
Na ₃ VO ₄	100 mM	1 mM	50 ml

10

【0217】

これらの溶液は以下の供給元から得た:

20

1 M Tris/HCl pH 7.5: Sigma, T-2663; 87 %グリセロール: Merck, カタログ番号04091.2500; 1 M MgCl₂: Sigma, M-1028; 5 M NaCl: Sigma, S-5150。

5倍濃縮溶解バッファは0.22 µmフィルターでろ過し、そして40 mlアリコットで-80℃で保管した。

【0218】

ストック溶液の調製

100 mM Na₃VO₄ストック溶液の調製:

9.2 gのNa₃VO₄を400 mlの蒸留水に溶解する。

1) 1 N NaOHまたは1 N HClのいずれかをを用いてpHを10.0に調整する。オルトバナジウム酸ナトリウム溶液の初期pHはバッチごとに多様でありうる。pH 10.0において、溶液は黄色となるであろう。

30

2) 溶液を、無色に変わるまで煮沸する(約10分間)。

3) 室温まで冷ます。

4) pHを10.0に再度調整し、そして、工程2および3を、溶液が無色を維持しおよびpHが10.0で安定するまで繰り返す。

5) 蒸留水で体積を500 mlに調整する。

6) アリコットを-20℃で凍結する。アリコットは数ヶ月間保管できる。

500 mM NaFストック溶液の調製:

21.0 gのNaF (Sigma, S7920)を500 mlの蒸留水に溶解する。溶液を0.22 µmフィルターでろ過し、そして4℃で保管する。

40

20 % NP40-溶液の調製:

40.0 gのNP40 (Sigma, Igepal-CA630, カタログ番号13021)を量る。蒸留水を加えて200 gとする。完全に混合し、そして溶液を室温で保管する。

1 M DTT溶液の調製:

7.7 gのDTT (Biomol, カタログ番号04010)を50 mlの蒸留水に溶解する。溶液を0.22 µmフィルターでろ過し、そして-20℃で400 µlのアリコットを凍結する。アリコットは数ヶ月間保管することができる。

【0219】

2. キノビーズの細胞溶解物との接触、および試験化合物による結合したタンパク質の

50

溶出

キノビーズを、溶解物中のタンパク質のリガンドへの結合を可能にする条件下で、マウス脳溶解物と接触させた。結合条件は、タンパク質の機能を保存する適切なバッファー条件を選ぶことによって、生理学的条件に近かった。穏やかな洗浄工程を通して非捕捉タンパク質を除去した後、結合したタンパク質をタンパク質溶出のための試験化合物と接触させた。

【0220】

2. 1 DPバッファーの調製表11: 5×DPバッファーの調製

【0221】

【表11】

基質:	ストック溶液	1x 溶解バッファー 中の最終濃度	115x 溶解バッファー について添加
Tris/HCl pH 7.5	1 M	50 mM	250 ml
グリセロール	87 %	5 %	288 ml
MgCl ₂	1 M	1.5 mM	7.5 ml
NaCl	5 M	150 mM	150 ml
Na ₃ VO ₄	100 mM	1 mM	50 ml

【0222】

5×DPバッファーは0.22 μmフィルターを通してろ過し、そして40ml-アリコット中で-80℃で保管した。

(注: 同じバッファーを全細胞溶解物の調製のためにも用いる)

これらの溶液は以下の供給元から得た。1.0 M Tris/HCl pH 7.5 (Sigma, T-2663)、87%グリセロール (Merck, カタログ番号04091.2500); 1.0 M MgCl₂ (Sigma, M-1028); 5.0 M NaCl (Sigma, S-5150)。

【0223】

以下の1×DPバッファーを調製した:

- ・1×DPバッファー (ビーズ平衡化のための)
- ・1×DPバッファー/0.4% NP40 (ビーズ平衡化およびビーズの第一洗浄工程のための)
- ・1×DPバッファー/0.2% NP40 (ビーズの第二洗浄工程のため、および化合物溶出のための)
- ・1×DPバッファー/プロテアーゼ阻害剤 (第一溶解物希釈工程のための); 25mlの溶解バッファーあたりプロテアーゼ阻害剤タブレットを1つ加える (EDTA不含タブレット、プロテアーゼ阻害剤カクテル、Roche Diagnostics, 1873580)
- ・1×DPバッファー/0.4% NP40/プロテアーゼ阻害剤 (第二溶解物希釈工程のための)

【0224】

1×DPバッファー/0.4% NP40 (100ml)の調製のための例:

以下の溶液および試薬を合わせ、そして蒸留水を100mlの終体積になるように加える: 20mlの5×DPバッファー、5mlの0.5 M NaF、2mlの20% NP40、100 μlの1 M DTT、そして、蒸留水を100mlまで加える。すべてのバッファーは終濃度1 mM DTTを含有する。

【0225】

2. 2 ビーズの洗浄および平衡化

キノビーズ (実施例1) を、適切なバッファーによる洗浄および当該バッファーでの平

10

20

30

40

50

衡化により、結合反応のために調製した。

1. すべての洗浄工程のために15mlファルコンチューブを使用する。
2. 1実験あたり100μlのキノビーズを使用する（確定したビーズ体積）：以下の4つのリガンドとカップリングした（1μmol/mlのカップリング密度）それぞれのビーズの種類の等量（25μl）を混合する：Bis VIII (CZC00001056)、プルバラノールB (CZC00007097)、PD173955誘導体 (CZC00007324)、およびCZC00008004。
3. 3mlの1×DPバッファーで2回、3mlの1×DPバッファー／0.4% NP40で1回、ビーズを洗浄する。各洗浄工程の間、チューブを3-5回ひっくり返し、Heraeus遠心分離機で1200rpmで2分間、4℃で遠心分離した。上清を吸引し、上清を捨てる。

10

最後の洗浄工程の後、1×DPバッファー／0.4% NP40で1:1スラリー（体積／体積）を調製する。

【0226】

2.3 希釈した細胞溶解物の調製

マウス脳溶解物を、適切なバッファーによる希釈および遠心分離工程を通じた清澄化により、結合反応のために調製した。

1. 1実験あたり50mgのタンパク質に対応する細胞溶解物の容積を使用する。
2. 37℃の水浴中で溶解物をすばやく解凍し、次いで試料を氷上に保持する。
3. 以下の方法で溶解物を希釈する：
 - 3) 1×DPバッファー／プロテアーゼ阻害剤で溶解物を希釈して、界面活性剤濃度を0.8%から0.4% NP-40に減少させる。
 - 4) 1×DPバッファー／0.4% NP40／プロテアーゼ阻害剤で溶解物をさらに希釈して、5mg/mlの最終タンパク質濃度にする。
- （注：第二希釈工程は、溶解物のタンパク質濃度が第一希釈工程後に5mg/mlより高い場合にのみ必要である）
4. 希釈した溶解物をUZ-ポリカーボネートチューブ（Beckmann, 355654）へと移す。
5. 超遠心を通して希釈した溶解物を清澄にする（20分、4℃、100,000g、TI50.2ローター、予め冷やした超遠心機）。
6. 上清を保存し、そして氷上で保持する。

20

30

【0227】

2.4 結合反応および洗浄

タンパク質をリガンドへ結合させるために、洗浄し平衡化したビーズ（セクション2.2）を、希釈した細胞溶解物（セクション2.3）と接触させた。非特異的に結合したタンパク質は、バックグラウンド結合を減少させるために穏やかな洗浄によって除去した。

1. 希釈し清澄にした溶解物と100μlの洗浄したキノビーズを15mlまたは50mlファルコンチューブ中で合わせる。
2. 4℃で2時間インキュベートし、低温室内のROTO SHAKE GENIE (Scientific Industries, Inc.) 上で回転させる。
3. インキュベーション後、4℃でHeraeus遠心分離機または同等物上で、1200rpmで3分間遠心分離する。
4. 上清をビーズを失うことのないよう注意深く除去する。
5. ビーズを、90μmフィルターを伴うMobicolカラムに移す（MoBiTec, ゲッティンゲン、カタログ番号：M1002-90）。
6. ビーズを10mlの1×DPバッファー／0.4% NP-40および5mlの1×DPバッファー／0.2% NP-40で洗浄する。
7. 次の工程に進む前に、洗浄バッファーがカラムを完全に流れ通るようにする。
8. カラムをエッペンドルフチューブ中に置き、そしてそれらを800rpm、4℃で1分間遠心分離する。カラムを底面リッドで閉じる。

40

【0228】

50

2. 5 結合したタンパク質の試験化合物での溶出

種々の試験化合物（セクション2. 7を参照）を、これらの工程に従って結合したタンパク質を放出するのに用いた：

1. 結合したタンパク質を伴うビーズ（セクション2. 4）を1×DPバッファー／0. 2% NP-40中で1：3のスラリー（体積／体積）として再懸濁する。
2. 当該1：3のスラリーの20 μlをMoBiTechカラムに移す（5 μlのビーズに等しい）。
3. 当該カラムをエッペンドルフチューブ中に設置し、800 rpmで15秒間、4℃で遠心分離する。底部リッドでカラムを閉じる。
4. 1. 0 mMの試験化合物（0. 1から1. 0 mMの濃度範囲が適切である）を含有する10 μlの溶出バッファーを加える。対照として、試験化合物を溶解するのに用いた溶媒に依存して、2% DMSOまたは2% DMFを含有する溶出バッファーを用いる。

上部リッドでカラムを閉じる。

5. エッペンドルフインキュベーター中、700 rpmで、4℃で30分間インキュベートする。
6. カラムを開け（最初に上部を、次いで底部を）、シリコン処理をしたチューブ（SafeSealマイクロ遠心分離チューブ、カタログ番号11270、Sorenson BioScience, Inc）へとカラムを戻す。溶出物を回収するために、2000 rpmで2分間、卓上遠心分離機で室温で遠心分離する。溶出物の典型的な体積は約15 μlである。
7. 100 mM DTTを含有する、5 μlの4×NuPAGE SDS試料バッファー（Invitrogen, NP0007）を加える（DTTは使用する直前に加えなければならない）。
8. 50℃で30分間インキュベートする。
9. 1／10体積の200 mg／mlヨードアセトアミドを加え、室温で30分間、遮光してインキュベートする。この反応は、質量分析法のためのシステインのアルキル化へと導く。
10. ゲル上に試料をロードする前に、沈殿物を除去するために15000 rpmで5分間、試料を遠心分離する。
11. タンパク質分離のために、10 μlの試料をNuPAGE 4-12% Bis-Trisゲル（Invitrogen, NP0335）にアプライする。

【0229】

2. 6 このプロトコルに使用するストック溶液の調製

100 mM Na₃VO₄ストック溶液の調製：

- 1) 9. 2 gのNa₃VO₄を400 mlの蒸留水に溶解する。
- 2) 1 N NaOHまたは1 N HClのいずれかをを用いてpHを10. 0に調整する。オルトバナジウム酸ナトリウム溶液の初期pHはバッチごとに多様でありうる。pH10. 0において、溶液は黄色となるであろう。
- 3) 溶液を、無色に変わるまで煮沸する（約10分間）。
- 4) 室温まで冷ます。
- 5) pHを10. 0に再度調整し、そして、工程2および3を、溶液が無色を維持しおよびpHが10. 0で安定するまで繰り返す。
- 6) 蒸留水で体積を500 mlに調整する。
- 7) アリコットを-20℃で凍結する。アリコットは数ヶ月間保管できる。

【0230】

500 mM NaFストック溶液の調製：

21. 0 gのNaF（Sigma, S7920）を500 mlの蒸留水に溶解する。溶液を0. 2 μmフィルターでろ過し、そして4℃で保管する。

【0231】

20% NP40-溶液の調製：

40. 0 gのNP40（Sigma, Igepal-CA630, カatalog番号13021）を量る。蒸留水を加えて200 gとする。完全に混合し、そして溶液を室温で保管する。

【0232】

1 M D T T 溶液の調製：

7. 7 g の D T T (Biomol, カタログ番号04010) を 50 ml の蒸留水に溶解する。溶液を 0.22 μm フィルターでろ過し、そして -20 °C で 400 μl のアリコットを凍結する。アリコットは数ヶ月間保管することができる。

【0233】

ヨードアセトアミドストック溶液 (200 mg/ml) の調製：

2. 0 g のヨードアセトアミド (Sigma, I-6125) を 10 ml の蒸留水に溶解する。溶液を 0.22 μm フィルターでろ過し、そして -20 °C で 400 μl のアリコットを凍結する。アリコットは数ヶ月間保管することができる。

10

【0234】

2. 7 溶出のための試験化合物

下記に列挙する試験化合物を、下記に示すように希釈後の溶出実験に用いた。

【0235】

試験化合物ストックの調製：

典型的には、すべての化合物は 100 mM の濃度で、100 % DMSO (Fluka, カタログ番号41647) に溶解する。あるいは、DMSO に溶解させることができない化合物については、100 % DMF (Fluka, カタログ番号40228) を用いることができる。化合物は -20 °C で保管する。

【0236】

溶出実験のための試験化合物の希釈：

100 mM ストックを 100 % DMSO で 1 : 1 に希釈することにより、50 mM ストックを調製する。溶出実験のために、当該化合物を溶出バッファー (= 1 × DP-バッファー / 0.2 % NP40) で 1 : 50 にさらに希釈する。

20

【0237】

CZC1038：ビスインドリルマレイミドIII (供給元：Alexis Biochemicals；カタログ番号270-051-M005；化学式 $C_{23}H_{20}N_4O_2$ ；MW 384.4)。

CZC7097：プルバラノール B (供給元：Tocris Biochemicals、カタログ番号1581；化学組成 $C_{20}H_{25}ClN_6O_3$ ；MW 441.92；CAS番号212844-54-7)。

CZC00007324 (PD173955誘導体；合成は実施例1に記載される)。

30

CZC00008004：これは CZC00004919 の類似体である (合成は実施例1に記載される)。

CZC00007098：SB202190 (供給元：TOCRIS 1264 1A/46297；化学式 $C_{20}H_{14}N_3OF$ ；MW 331.34)。

CZC00009280：スタウロスポリン (供給元：SIGMA-ALDRICH：S4400；広範囲性キナーゼ阻害剤；化学式 $C_{28}H_{26}N_4O_3$ ；MW 466.53)。

CZC00007449：SP600125 (供給元：Merck Biosciences #420119, JNK1/2阻害剤；化学式 $C_{14}H_8N_2O$ ；MW 220.2)。

【0238】

3. 溶出された酵素 (例えば、キナーゼ) の質量分析解析プロテオタイピックペプチドの説明

40

SDS-PAGE によって分離されたタンパク質混合物のトリプシン消化は、各々のタンパク質について、異なる物理化学的性質をもつ多数の別個のペプチド断片を生ずる。これらのペプチドは、タンパク質同定 (ID) のために用いられる質量分析に基づく分析プラットフォーム、例えばナノキャピラリー逆相液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (RP-LC-MS/MS)、における適合性が異なる。結果として、同じタンパク質源からのペプチド (複数) についてのペプチド頻度が、大きな度合いで異なり、このタンパク質の同定に「典型的に」寄与する最も高頻度で観察されたペプチドは、「プロテオタイピック」ペプチドと呼ばれる。よって、「プロテオタイピックペプチド」は、特定のタンパク質またはタンパク質アイソフォームを一意的に同定する、実験的によく観察されるペプチドである。

50

【0239】

プロテオタイピックペプチドの利点

タンパク質同定のためにプロテオタイピックペプチドを使用することは、情報に富んだシグネチャーペプチドの存在についてスクリーニングすることにタンパク質同定工程の焦点を当てることにより、複数の公知の標的タンパク質の迅速で焦点を合わせた同定および定量を可能にする。

【0240】

プロテオタイピックペプチドの実験的同定

プロテオタイピックペプチドのリストをつくる一つの戦略は、ペプチド同定データを実験的に収集し、そしてタンパク質を一意的に同定する共通して観察されるペプチドについて

10

【0241】

CZデータセット（マルチペプチドIDまたは手動で検証した単一ペプチドID）における少なくとも10の明解な識別を伴うIPIデータベースタンパク質エントリーの各々について、寄与ペプチドのペプチド頻度を計算する。データベースサーチエンジンであるMasco^TM（Matrix Science）による、特異的で、最も良いペプチド対スペクトル適合（peptide-to-spectrum matches）のみを考慮する。

【0242】

特定のタンパク質についてのプロテオタイピックペプチドの定義のために、ペプチドをペプチド頻度が下がっていく順序で並べ、そして累積的なペプチド存在を計算する：この値はそれぞれのペプチドに、このペプチドまたはより高いペプチド頻度を伴ういずれかのペプチドが存在する、同定の比率を与える。プロテオタイピックペプチドは、95%の累積存在でのカットオフを用いて定義される、すなわち、このタンパク質についての少なくとも95%の同定事象が、少なくとも1つのプロテオタイピックペプチドに基づいている。

20

【0243】

3. 1 質量分析解析の前のタンパク質消化および試料調製

タンパク質を濃縮し、4-12% NuPAGE（登録商標）Novexゲル（Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド）上で分離し、そしてコロイド状のクーマシーブルーで染色した。ゲルのレーンは、全分離範囲にわたって ≤ 48 スライスに体系的に切断し（バンドおよびバンド間領域）、そして、Shevchenkoら、1996, Analytical Chemistry 68: 850-858に本質的に記載されるようにゲル内トリプシン消化を行った。簡単には、ゲルプラグを50% EtOH中の5mM NH_4HCO_3 中で一晩脱染色し、5mM NH_4HCO_3 中の12.5ng/ μl のトリプシンで4時間消化した。ペプチドを1%ギ酸で抽出し、第二の96ウェルプレート中に移し、そして真空下で乾燥させた。乾燥ペプチドを10 μl の水中の0.1%ギ酸で再懸濁し、そして5 μl をタンパク質同定のためにLC-MS/MSシステムへとインジェクトした。

30

【0244】

3. 2 質量分析データ収集

ペプチド試料を、四重極飛行時間型質量分析器（QTOF2, QTOF Ultima, QTOF Micro, MicromassまたはQSTAR Pulsar, Sciex）またはイオントラップ質量分析器（LCQ Deca XP, LTQ, Thermo-Finnigan）のいずれかに直接連結された、ナノLCシステム（CapLC, WatersまたはUltimate, Dionex）へとインジェクトした。ペプチドは、15ないし45分の間の典型的なグラジエント時間を伴う水性溶媒および有機溶媒のグラジエントを用いて、LCシステム上で分離された。溶媒Aは0.1%ギ酸中の5%アセトニトリルであり、溶媒Bは0.1%ギ酸中の70%アセトニトリルであった。

40

【0245】

3. 3 タンパク質同定

LC-MS/MS実験で得られたペプチド質量およびフラグメンテーションデータは、International Protein Index（IPI）タンパク質配列データベースの社内監督バージ

50

ョンでクエリーを行うために用いた。タンパク質は、測定されたペプチド質量およびフラグメンテーションデータを、データベースのエントリーからソフトウェアツールであるMascot (Matrix Science; Perkinsら、1999, Electrophoresis 20:3551-3567) を用いて計算した同じデータと関連付けることにより同定した。分析のためにどの質量分析器が用いられたかにより、検索基準は変化した。

【0246】

4. 結果

当該方法は、与えられたいずれかの試験化合物について溶出したキナーゼのプロファイルを確立することを可能にし、それにより試験化合物の選択性を評価することが可能になる。一つの制限は、細胞溶解物において含有されるすべてのキナーゼの細画分 (subfraction) を代表するかもしれない、第一工程の間にキノビーズ上に捕捉されたキナーゼについてのみ評価できるということである。

10

【0247】

表12：試験化合物による特異的溶出後に質量分析により同定された放出されたキナーゼ (数字は、質量分析スコア/同定されたペプチドの数を表す)。キナーゼ名は、ヒトキナーゼ命名法 (<http://kinase.com>) および、補足の材料の項で特定されるようにManningら、2002, Science 298, 1912-1934による。表12の最初の4つの化合物は、キノビーズリガンド1-4の非固定化バージョンである。

【0248】

【表12-1】

20

キナーゼ	2% DMSO	CZC1038	CZC7097	CZC7324	CZC8004	CZC1355	CZC7098	CZC7479	CZC9280	SDS
AAK1	130/5	562/38	1036/51	582/35	718/35	638/27	198/4	593/32	777/44	240/32
ALK2										65/2
AMPKα1					64/2					
ARG				59/2						452/28
BRAF _{ps}				70/4						

30

【0249】

【表 1 2 - 2】

キナーゼ	2% DMSO	CZC1038	CZC7097	CZC7324	CZC8004	CZC1355	CZC7098	CZC7479	CZC9280	SDS
CaMK2a		911/53	978/27	513/11	966/43	288/9		509/11	1027/69	786/74
CaMK2b		834/52	679/16	499/14	685/30	572/19		143/5	1182/72	615/75
CaMK2d		702/17	473/12	328/7	444/11	260/8			822/40	434/36
CaMK2g		550/18			527/27				809/25	379/42
CaMKK2		314/6	465/9	101/3	522/12	93/2			282/10	338/10
CDK5	303/7	831/19	1086/41	462/11	794/27	855/28	166/4	504/11	861/43	604/21
CDKL5			48/1							
CK1e										
CRIK		90/5								
CSK			492/12	809/19					307/8	365/15
EphA4			1702/37	1233/32	138/3				332/11	727/33
EphA5			330/14	144/3						246/9
EphA7										
EphB1			366/10							180/10
EphB2			1334/30	1004/22	149/5				114/4	437/19
Erk1ps5		418/14	749/48	557/77	386/26	270/13			71/2	239/8
Erk2	751/25	754/50	1437/115	1179/235	810/46	1036/82	506/20	641/24	955/50	1023/102
FAK			269/6	322/10	257/8				379/19	160/6
FER		237/6	322/8	388/11	100/2				818/21	275/11
FYN			268/6	279/6					314/6	407/17
GAK				278/7	733/16			90/3	255/6	166/8
GSK3Aps	166/6	1232/60	357/6	154/3	635/27	393/21	406/8	132/4	868/47	585/77
GSK3B		1176/54	1037/30	789/19	881/26	536/14	743/34	345/8	824/59	763/72
JNK1			311/10	448/17	590/48	559/18	540/19	678/28	457/16	389/47

【 0 2 5 0 】

【表 1 2 - 3】

キナーゼ	2% DMSO	CZC1038	CZC7097	CZC7324	CZC8004	CZC1355	CZC7098	CZC7479	CZC9280	SDS
JNK2		287/11	277/7	702/21	662/18	405/12	170/5	429/30		369/20
JNK3			284/7	782/49	642/23	620/37	542/30	578/39	363/10	447/27
LIMK1ps					186/4					
LYN										134/6
MAP2K1		208/6	78/2					74/2	49/2	90/4
MARK2		49/1								
NEK9					61/2					
p38a				127/6			295/10			104/7
p38b				60/1			80/2			95/3
PAK5									64/1	
PKCa									64/1	
PKCg		107/2							53/1	
PYK2	159/4	291/7	1909/48	1401/42	1228/58	88/2		422/10	1978/82	809/39
QSK										153/7
RSK1		292/7	1177/32	626/19	312/9	435/11			1634/47	825/45
RSK3			401/11	312/12					721/21	107/6
SRC			544/13	351/9					546/13	419/25
TBK1									48/1	
TRKB			207/4						165/4	
TRKC										
YESps			304/7		110/3				480/12	236/13

【 0 2 5 1】

表 1 3：試験化合物による特異的溶出後に質量分析により同定された放出されたキナーゼ（質量分析スコア／同定されたペプチドの数）。試験化合物は有機小分子（キナーゼ骨格化合物）のライブラリーから選択された。キナーゼ名は、ヒトキナーゼ命名法 (<http://kinase.com>) および、補足の材料の項で特定されるようにManningら、2002, Science 298, 1912-1934による。

【 0 2 5 2】

【表 1 3 - 1】

キナーゼ	CZC9413	CZC9414	CZC9459	CZC9482	CZC9493	CZC9494	CZC9489	CZC9488	CZC9484	CZC9490
AAK1	1110/54	1138/69	1288/69	1459/75	823/35	777/44	989/48	1032/57	663/36	352/16
ALK2	85/2		80/2	100/2				49/1	106/3	
AMPKa1										
ARG										
BRAFps		96/4						78/2		
CaMK2a	909/33	357/8	1294/57	417/25	1023/49	1002/32	1430/69	1307/78	1187/83	71/2
CaMK2b	1128/71	151/5	1315/99	626/18	1077/77	806/21	939/67	1251/72	969/65	
CaMK2d	736/21		760/42	414/10	752/24	376/9	712/39	720/35	716/24	
CaMK2g	970/25		812/32		709/27		741/17	929/26	620/26	
CaMKK2	242/8		178/4	287/10	225/7		140/4	167/6	237/6	
CDK5	677/33	513/12	525/14	773/20	906/44	580/13	838/38	907/24	951/30	204/5
CDKL5										
CK1e								80/2		
CRIK			50/1							
CSK					73/2	66/2	121/2		73/2	
EphA4				123/4						
EphA5										
EphA7		88/2								
EphB1										

【 0 2 5 3 】

10

20

30

【表 1 3 - 2】

キナーゼ	CZC9413	CZC9414	CZC9459	CZC9482	CZC9493	CZC9494	CZC9489	CZC9488	CZC9484	CZC9490
EphB2			74/2						247/7	
Erk1ps5	121/4	144/5	262/8	469/15	176/5	333/10	89/3	597/19	513/14	
Erk2	913/36	852/37		837/51	676/40	837/44	822/24	896/30	994/51	759/28
FAK				302/8		81/2	193/6	153/6		
FER				118/3			154/6	344/9	149/4	
FYN								53/1		
GAK	234/6	663/20	388/10	63/1	187/5	732/21	161/4	530/14	201/6	
GSK3Aps	586/18	891/23	335/7	230/5		201/5	630/14	745/15	1030/55	78/2
GSK3B	663/32	471/23	294/14	143/5	282/8	257/7	343/8	567/29	908/60	
JNK1				595/36			553/17	964/34	703/23	
JNK2		394/23		469/15	84/3		523/17	562/30	494/33	
JNK3	371/10	555/33	610/30	662/44	346/10	164/5	635/37	968/45	789/47	
LIMK1ps							46/1			
LYN										
MAP2K1	95/4		253/8	93/3	234/8	152/5	105/4	481/12	338/10	48/1
MARK2										
NEK9	122/3							46/1		
p38a										
p38b										
PAK5										
PKCa										
PKCg						210/6		145/4	167/5	
PYK2	133/3	292/7	430/12	833/21	219/6	47/1	1712/42	1769/51	703/17	51/1
QSK										
RSK1	445/11	100/3		193/4	207/4	511/12	466/14	1471/38	634/17	

【 0 2 5 4】

【表 1 3 - 3】

キナーゼ	CZC9413	CZC9414	CZC9459	CZC9482	CZC9493	CZC9494	CZC9489	CZC9488	CZC9484	CZC9490
RSK3	272/8		94/2	211/5		354/11		437/14	301/10	
SRC									135/3	
TBK1										
TRKB					139/4			111/3		
TRKC				97/3						
YESps										

【 0 2 5 5】

実施例 4：共固定されたりガンドと個別にカップリングされたりガンドの比較

この実験の目的は、一種類のリガンドを含有するビーズの混合物（個別にカップリング

10

20

30

40

50

されたりガンド)が、共固定されたりガンド(同時カップリング)と比較して、同定されたキナーゼに関して同様の結果を生じるかどうか評価することであった。

【0256】

結果は、両方の実験において同定されたキナーゼの広範囲な重なりがあることを示し、両方のやり方が適していることを証明した。

二つのリガンドは、セファロースビーズに個別にまたは同時のいずれかでカップリングし、そしてHeLa細胞溶解物を用いた選抜実験(pulldown experiment)に用いた(リガンド1:BisVIII;リガンド2:CZC00008004;詳細は実施例1:キノビーズの調製、と同様)。化合物の個別のカップリングは実施例1に詳細を記載したように行った。二つのリガンドの同時カップリングもまた、標準的な $1\mu\text{mol}/\text{mL}$ ビーズの代わりに $0.5\mu\text{mol}/\text{mL}$ の濃度で同じビーズ上に化合物がカップリングされたことを除いては、実施例1と同様に行った。個別にまたは同時に固定化された化合物についてのカップリングの成功は、HPLC分析を介して制御された。ビーズは、実施例1に記載されたように洗浄し、そして保存した。

10

【0257】

HeLa細胞溶解物の調製、ビーズ洗浄、ビーズの溶解物との接触、洗浄および質量分析法による放出されたタンパク質の分析 薬物は実施例2に記載したように行った(シグナロキノーム実験)。

【0258】

表14: 質量分析解析によって同定されたキナーゼ。二つの同時にカップリングされたりガンド(左部分)および個別にカップリングされた化合物(混合ビーズ;右部分)での実験の比較。キナーゼ名は、ヒトキナーゼ命名法(<http://kinase.com>)および、補足の材料の項で特定されるようにManningら、2002, Science 298, 1912-1934による。

20

【0259】

【表 1 4 - 1】

同時カップリング(予め混合された BisVIII および CZC8004)					カップリング後に混合されたビーズ(BisVIII および CZC8004)				
識別表示	キナーゼ	MS スコア	ペプチド の数	後混合 にもある	識別表示	キナーゼ	MS スコア	ペプチド の数	予め混合 にもある
1	TBK1	1531	63	X	1	TBK1	1365	57	X
2	GSK3B	932	52	X	2	NEK9	1113	36	X
3	AurA	895	40	X	3	TNK1	921	44	X
4	TYK2	841	29	X	4	TYK2	917	34	X
5	TNK1	771	46	X	5	AurA	910	46	X
6	CDK2	741	34	X	6	GSK3A	814	47	X
7	NEK9	736	22	X	7	CaMK2g	781	38	X
8	GSK3A	707	43	X	8	GSK3B	745	33	X
9	JNK2	654	24	X	9	JAK1	731	27	X
10	JNK1	548	23	X	10	CaMK2d	641	26	X
11	CaMK2g	494	24	X	11	AurB	631	28	X
12	CaMK2d	456	21	X	12	DNAPK	610	24	X
13	AAK1	450	17	X	13	JNK2	578	23	X
14	AurB	424	15	X	14	JNK1	499	21	X
15	JAK1	187	6	X	15	CDK2	485	19	X

【 0 2 6 0】

【表 1 4 - 2】

同時カップリング(予め混合された BisVIII および CZC8004)					カップリング後に混合されたビーズ(BisVIII および CZC8004)				
識別表示	キナーゼ	MS スコア	ペプチド の数	後混合 にもある	識別表示	キナーゼ	MS スコア	ペプチド の数	予め混合 にもある
16	CDK9	160	6	0	16	FER	423	17	X
17	YES	108	5	X	17	AAK1	368	17	X
18	FER	106	3	X	18	TEC	159	7	0
19	MPSK1	80	3	0	19	BIKE	124	4	0
20	DNAPK	72	4	X	20	YES	108	6	X
21	ULK3	64	1	0	21	FRAP	59	3	0

【 0 2 6 1】

表 1 5： 同時カップリング実験において同定されたキナーゼおよびプロテオタイピックペプチドの配列

【 0 2 6 2 】

【表 1 5 - 1 】

キナーゼ名	プロテオタイピックペプチド
AAK1	APEMVNLYSGK
AURKB	IYLILEYAPR
AURKB	LPLAQVSAHPWVR
AURKB	SNVQPTAAPGQK
CAMK2D	DLKPENLLLASK
CAMK2D	FTDEYQLFEELGK
CAMK2D	GAILTTMLATR
CAMK2D	IPTGQEYAAK
CAMK2G	LTQYIDGQGRPR
CDK2	ALFPGDSEIDQLFR
CDK2	FMDASALTGIPLPLIK
CDK9	IGQGTFGEVFK
CDK9	LLVLDPAQR
CDK9	NPATTNQTEFER
GSK3A	SQEVAYTDIK
GSK3A	VIGNGSFGVVYQAR
GSK3A	VTTVVATLGQGPER
GSK3A	YFFYSSGEK
GSK3B	DIKPQNLLDPDTAVLK
GSK3B	LYMYQLFR
GSK3B	VIGNGSFGVVYQAK
JAK1	LIMEFLPSGSLK

10

20

30

【 0 2 6 3 】

【表 1 5 - 2】

キナーゼ名	プロテオタイピックペプチド
JAK1	LSDPGIPITVLSR
MAPK8	APEVILGMGYK
MAPK9	ILDFGLAR
MAPK9	NIISLLNVFTPQK
MAPK9	VIEQLGTPSAEFMK
NEK9	LGINLLGGPLGGK
NEK9	LNPAVTCAGK
NEK9	LQQENLQIFTQLQK
NEK9	SSTVTEAPIAVVTSR
NEK9	VLACGLNEFNK
PRKDC	INQVFHGCITEGNELTK
PRKDC	NELEIPGQYDGR
PRKDC	QLFSSLFSGILK
PRKDC	YPEETLSLMTK
STK16	APELFSVQSHCVIDER
STK16	GTLWNEIER
STK6	SKQPLPSAPENNPEEELASK
STK6	VEFTFPDFVTEGAR
TBK1	IASTLLLYQELMR
TBK1	LFAIEEETTR
TBK1	TTEENPIFVVS
TBK1	VIGEDGQSVYK
TNK1	AAALSGGLSDPELQR
TNK1	VADFGGLVRPLGGAR
TYK2	LGLAEGTSPFIK

10

20

30

40

【 0 2 6 4 】

【表 15-3】

キナーゼ名	プロテオタイピックペプチド
TYK2	LSDPGVGLGALSR
TYK2	MVVAQQLASALSYLENK
TYK2	SLQLVMEYVPLGSLR
TYK2	SQAPDGMQSLR
ULK3	ASVENLLTEIEILK
YES1	AANILVGENLVCK
YES1	EVLEQVER

10

【0265】

表 16：混合実験（カップリング後に混合されたビーズ）において同定されたキナーゼおよびプロテオタイピックペプチドの配列

【0266】

【表 16-1】

キナーゼ名	プロテオタイピックペプチド
AAK1	ADIWALGCLLYK
AURKB	HFTIDDFEIGRPLGK
AURKB	IYLILEYAPR
AURKB	LPLAQVSAHPWVR
AURKB	SNVQPTAAPGQK
BMP2K	ADIWALGCLLYK
BMP2K	ITDTIGPTETSIAPR
CAMK2D	AGAYDFPSPEWDTVTPPEAK
CAMK2D	FTDEYQLFEELGK
CAMK2D	FYFENALSK
CAMK2D	GAILTTMLATR
CAMK2G	AGAYDFPSPEWDTVTPPEAK
CAMK2G	DLKPENLLLASK

20

30

40

【0267】

【表 16-2】

キナーゼ名	プロテオタイピックペプチド
CAMK2G	FTDDYQLFEELGK
CAMK2G	LTQYIDGQGRPR
CAMK2G	NLINQMLTINPAK
CDK2	ALFPGDSEIDQLFR
CDK2	FMDASALTGIPLPLIK
FER	HSIAGIIR
FER	THAEDLNSGPLHR
FRAP1	GPTPAILESISINNK
GSK3A	SQEVAYTDIK
GSK3A	VIGNGSFGVVYQAR
GSK3A	VTTVVATLGQGPFR
GSK3A	YFFYSSGEK
GSK3B	DIKPQNLLDPDTAVLK
GSK3B	LLEYTPRAR
GSK3B	LYMYQLFR
GSK3B	VIGNGSFGVVYQAK
GSK3B	YFFYSSGEK
JAK1	LIMEFLPSGSLK
JAK1	LSDPGIPITVLSR
MAPK8	APEVILGMGYK
MAPK8	NIIGLLNVFTPQK
MAPK9	APEVILGMGYK
MAPK9	ILDFGLAR
MAPK9	NIISLLNVFTPQK
MAPK9	VIEQLGTPSAEFMK

10

20

30

40

【0268】

【表 1 6 - 3】

キナーゼ名	プロテオタイピックペプチド
NEK9	AGGGAAEQEELHYIPR
NEK9	LNPAVTCAGK
NEK9	LQQENLQIFTQLQK
NEK9	SSTVTEAPIAVVTSR
NEK9	VLACGLNEFNK
PRKDC	AALSALLESFLK
PRKDC	DFGLLVFVR
PRKDC	DILPCLDGYLK
PRKDC	DLLLNTMSQEEK
PRKDC	DQNILLGTTYR
PRKDC	FMNAVFFLLPK
PRKDC	FVPLLPGNR
PRKDC	GLSSLLCNFTK
PRKDC	HSSLITPLQAVAQR
PRKDC	INQVFHGCITEGNETK
PRKDC	LAGANPAVITCDELLLGHEK
PRKDC	LATTILQHWK
PRKDC	LSDFNDITNMLLLK
PRKDC	LYSLALHPNAFK
PRKDC	NELEIPGQYDGR
PRKDC	QCLPSLDLSCK
PRKDC	SDPGLLTNTMDVFVK
PRKDC	SIGEYDVLR
PRKDC	SLGPPQGEEDSVPR
PRKDC	VTELALTASDR

10

20

30

40

【 0 2 6 9 】

【表 16-4】

キナーゼ名	プロテオタイピックペプチド
STK6	QWALEDFEIGRPLGK
STK6	SKQPLPSAPENNPEEEELASK
STK6	VEFTFPDFVTEGAR
TBK1	IASTLLLYQELMR
TBK1	LFAIEEETTR
TBK1	TTEENPIFVVS
TBK1	VIGEDGQSVYK
TEC	ELGSGLFGVVR
TEC	GQEYLILEK
TEC	HAFGSIPEIIEYHK
TNK1	AAALSGGLLSDPELQR
TNK1	ANLWDAPPAR
TNK1	MLPEAGSLWLLK
TNK1	VADFGLVRPLGGAR
TYK2	AAALSFVSLVDGYFR
TYK2	HGIPLEEVAK
TYK2	LGLAEGTSPFIK
TYK2	LSDPGVGLGALSR
TYK2	MVVAQQLASALSYLENK
TYK2	SIQLVMEYVPLGSLR
TYK2	SQAPDGMQSLR
YES1	EVLEQVER

10

20

30

【0270】

実施例 5：キノビーズリガンド 5（インドールリガンド 91）の合成

インドールリガンド 91 合成： 5-〔5-フルオロ-2-オキソ-1, 2-ジヒドロ-インドール-（3Z）-イリデンメチル〕-2, 4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸（3-アミノ-プロピル）-アミド

40

工程 1： 5-フルオロ-1, 3-ジヒドロ-インドール-2-オン

ヒドラジン水和物（55%、10 ml）中の 5-フルオロイサチン（1 g）の溶液を 110℃で 30 分間加熱した。懸濁液が溶液になったら、反応物を 110℃で 4 時間加熱し、そして 0℃に冷却した。沈殿をろ過し、そして水で洗浄した。固体を水（10 ml）に懸濁し、濃 HCl の添加により pH を pH 2 に下げ、そして溶液を室温で 5 時間攪拌した。沈殿を集め、固体を水（2×15 ml）で洗浄し、そして真空オーブンで 40℃で乾燥させた（0.26 g、30%）。

【0271】

【化 5】

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.2 (s, 1H); 6.8-7.0 (dd, 2H); 6.6 (m, 1H); 3.2 (s, 2H);.
LCMS: 方法 D, RT=1.736 分, $[\text{MH}^+=152]$.

【0272】

工程 2: {3-[(5-ホルミル-2, 4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボニル)-アミノ]-プロピル}-カルバミン酸 tert-ブチルエステル

ジメチルホルムアミド (3 ml) 中、5-ホルミル-2, 4-ジメチル-1H-ピラゾール-3-カルボン酸 (0.300 g, 1.79 mmol)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド (0.516 g, 2.69 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (0.364 g, 2.69 mmol)、トリエチルアミン (0.502 ml, 3.56 mmol) の溶液に、N-Boc-1, 3-ジアミノプロパン (0.375 ml, 2.15 mmol) を加えた。溶液を室温で 15 時間攪拌した。ブライン (1.5 ml)、水 (1.5 ml) および飽和重炭酸ナトリウム水溶液 (1.5 ml) の混合物を加え、そして 10 N 水酸化ナトリウムの添加により溶液の pH を 12 に調整した。溶液は、ジクロロメタン：メタノール (9:1) の混合物で 3 回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を除去し、そして残渣をフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル (50 から 100 %)) で精製して、目的化合物を黄色固体として得た (0.30 g, 52 %).

【0273】

【化 6】

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.90 (s, 1H); 9.50 (s, 1H); 7.50 (m, 1H); 6.90 (m, 1H); 3.20 (q, 2H); 3.00 (q, 2H); 2.30 (s, 3H); 2.20 (s, 3H); 1.60 (m, 2H); 1.40 (s, 9H).
LCMS: 方法 D, RT=2.103 分, $[\text{M}+\text{Na}^+=346]$, および $[\text{M}-\text{Boc}+\text{Na}^+=246]$.

【0274】

工程 3: [3-({5-[5-フルオロ-2-オキソ-1, 2-ジヒドロインドール-(3Z)-イリデンメチル]-2, 4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボニル}-アミノ)-プロピル]-カルバミン酸 tert-ブチルエステル

エタノール (2 ml) 中の {3-[(5-ホルミル-2, 4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボニル)-アミノ]-プロピル}-カルバミン酸 tert-ブチルエステル (0.200 g, 0.62 mmol) および 5-フルオロ-1, 3-ジヒドロインドール-2-オン (0.011 g, 0.62 mmol)、ピロリジン (0.003 ml) の溶液を 78 °C で 3 時間加熱した。反応物を 0 °C に冷却し、そして得られた沈殿物をろ過し、冷エタノールで洗浄した。生成物をエタノール (4 ml) 中に懸濁させ、72 °C で 30 分間攪拌した。反応物をろ過し、沈殿物を真空オーブン中で 40 °C で乾燥し、目的化合物を固体として得た (0.265 g, 94 %).

【0275】

【化 7】

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.8 (s, 1H); 11.00 (s, 1H); 7.80 (m, 2H); 7.70 (m, 1H); 7.0 (m, 1H); 6.9 (m, 2H); 3.30 (q, 2H); 3.10 (q, 2H); 2.50 (dd, 6H) 1.60 (m, 2H); 1.40 (s, 9H).
LCMS: 方法 D, RT=2.86 分, $[\text{M}+\text{Na}^+=479]$, および $[\text{M}-\text{Boc}+\text{Na}^+=379]$.

【0276】

工程 4: 5-[5-フルオロ-2-オキソ-1, 2-ジヒドロインドール-(3Z)-イリデンメチル]-2, 4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸 (3-アミノプロピル)-アミド

[3-({5-[5-フルオロ-2-オキソ-1, 2-ジヒドロインドール-(3Z

)-イリデンメチル]-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボニル}-アミノ)-プロピル]-カルバミン酸tert-ブチルエステルをメタノールに懸濁した。2 ml のジオキサン中のHCl (4 N) を加え、そして反応物を室温で一晩攪拌した。溶媒を除去して目的化合物を得た (0.098 g, 91%)。

【0277】

【化8】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.8 (s, 1H); 11.00 (s, 1H); 7.90-7.70 (m, 5H); 6.9 (m, 2H); 3.30 (q, 2H); 2.80 (q, 2H); 2.50 (dd, 6H) 1.80 (m, 2H).

【0278】

10

LCMS: 蛍光のため決定的ではなかった。

すべての反応は不活性な雰囲気下で行った。 NMR スペクトルはBruker dpx400で得られた。LCMSは、zorbax SBC-18, 4.6mm x 150mm - 5 μ カラムまたは小さなカラム: ZORBAX (登録商標) SB-C18, 4.6 x 75mm, 3.5ミクロン (“短いカラム”) を用いたAgilent 1100で行った。カラム流速は1 ml / 分であり、用いた溶媒は水およびアセトニトリル (0.1% TFA) で、10 μ l のインジェクション体積であった。波長は254および210 nmであった。方法は以下に示す。

【0279】

表17: 分析方法

【0280】

20

【表 17】

方法	イーザーアクセス 方法名	ChemStation 方法名	流速	溶媒	ラン タイム
A	分析ポジティブ 7mn	ANL_POS7.M	1ml/分	0-2.5 分 5-95% MeCN 2.5-6 分 95% MeCN	7 分
B	分析ポジティブ イオン	ANAL_POS.M	1ml/分	0-11 分 5-95% MeCN 11-13 分 95% MeCN	15 分
C	ループインジェクション ポジティブ		1ml/分	95% MeCN	1 分
D	分析ポジティブ イオン	短いカラム ANL ポジティ ブ	1ml/mn	0-4.5 分 30-95% MeCN	5 分
E	分析 高 pH	分析 高 pH	3ml/分	0 to 8 分 5-95% MeCN 8 to 9 分 95% MeCN	10 分

【0281】

表 18： 化学プロトコルで使用した略語

【0282】

【表 18】

aq	水溶液
D	二重線
DMSO	ジメチルスルホキシド
G	グラム
HCl	塩酸
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
LCMS	液体クロマトグラフィー質量分析法
M	多重線
mins	分
mmol	ミリモル
N	ノーマル
NMR	核磁気共鳴
Q	四重線
RT	保持時間
S	一重線
sat	飽和
T	三重線

10

20

【0283】

実施例 6：キノビーズリガンド 6（キナゾリンリガンド 32）の合成

キナゾリンリガンド 32 の合成： 7-（4-アミノ）-ブチルオキシ-4-（2-フルオロ-4-ブロモフェニル）-アミノ-6-メトキシキナゾリン

30

工程 1： 7-ベンジルオキシ-4-（2-フルオロ-4-ブロモフェニル）-アミノ-6-メトキシキナゾリン

イソプロパノール（10 ml）中、7-ベンジルオキシ-4-クロロ-6-メトキシキナゾリン（0.250 g、0.83 mmol）および 4-ブロモ-2-フルオロアニリン（190 mg、1 mmol）の溶液に塩酸（ジオキサン中で 4 M、0.231 ml、0.92 mmol）を加えた。混合物を 90℃で 2 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷ました。固体を濾別し、冷イソプロパノールおよびエーテルで洗浄し、そして最終的に 50℃で一晩乾燥させて、標題化合物を得た（0.297 g-79%）。

【0284】

40

【化 9】

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ 8.65 (s, 1H); 7.96(s, 1H); 7.55(m, 5H); 7.40(t, 3H); 7.30 (s, 1H); 5.37 (s, 2H); 4.89 (s, 1H); 4.08 (s, 1H). LCMS: 方法 C, [M⁺=454].

【0285】

工程 2： 7-ヒドロキシ-4-（2-フルオロ-4-ブロモフェニル）-アミノ-6-メトキシキナゾリン

7-ベンジルオキシ-4-（2-フルオロ-4-ブロモフェニル）-アミノ-6-メトキシキナゾリン（297 mg、0.654 mmol）をトリフルオロ酢酸に溶解し、溶液を還流温度で 1 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷まし、氷上に注いだ。固体を濾

50

別し、メタノール中に取り出した (taken up)。溶液をアンモニア水を用いて塩基性 (pH 11) にし、真空で還元した。固体をろ過により回収し、冷水およびエーテルで洗浄し、そして最終的に真空下 50 °C で一晚乾燥させて、標題化合物を得た。(0.165 g - 69%)。

【0286】

【化10】

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ 8.55 (s, 1H); 7.89(s, 1H); 7.52(m, 3H); 7.13(s, 1H); 4.08 (s, 3H). LCMS: 方法 C, [M⁺=364].

【0287】

工程3: 7-(4-アミノフタルイミド)-ブチルオキシ-4-(2-フルオロ-4-ブロモフェニル)-アミノ-6-メトキシキナゾリン

ジメチルホルムアミド (7 ml) 中、7-ヒドロキシ-4-(2-フルオロ-4-ブロモフェニル)-アミノ-6-メトキシキナゾリン (360 mg, 0.989 mmol) および炭酸カリウム (410 mg, 2.967 mmol) の混合物に N-(4-ブロモブチル)-フタルイミド (0.355 g, 0.1187 mmol) を一度に加えた。反応混合物を 60 °C で 2 時間攪拌し、次いで室温まで冷ました。水 (10 ml) を加え、そして沈殿物を濾別した。固体を冷水およびメタノールで洗浄し、最終的に 50 °C 真空下で一晚乾燥させ、標題化合物を得た (0.317 mg - 57%)。

【0288】

【化11】

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ 9.49 (s, 1H); 8.29(s, 1H); 7.82(m, 4H); 7.71(s, 1H); 7.61(m, 1H); 7.47(t, 1H, J=8.3Hz); 7.413(m, 1H); 7.11(s, 1H); 4.09(m, 2H); 3.87(s, 3H); 3.62(m, 2H); 1.75(ブロード s, 4H). LCMS: 方法 B, RT=9.20 分, [MH⁺=410].

【0289】

工程4: 7-(4-アミノ)-ブチルオキシ-4-(2-フルオロ-4-ブロモフェニル)-アミノ-6-メトキシキナゾリン

ジメチルホルムアミド (5 ml) 中の 7-(4-アミノフタルイミド)-ブチルオキシ-4-(2-フルオロ-4-ブロモフェニル)-アミノ-6-メトキシキナゾリン (150 mg, 0.265 mmol) の懸濁液を、ヒドラジン-水和物で処理した。反応混合物を室温で 2 日以上攪拌し (数分後に可溶化が起こり、出発物質の完全消費が観察された)、次いで真空下で還元した。濃い黄色油状物を「キャッチ・アンド・リリース」法 (最適化された放出法を伴う Isolute SCX-2 カートリッジ) を用いて精製し、標題化合物を得た (63 mg, 51%)。

【0290】

【化12】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₆) δ 8.68(s, 1H); 8.48(t, 1H, J=8.5Hz); 7.36(m, 1H); 7.33(m, 1H); 7.32(broad s, 1H); 7.25(s, 1H); 7.00(s, 1H); 4.19(m, 2H); 4.02(s, 3H); 2.80(m, 2H); 1.98(m, 2H); 1.67(m, 2H); 1.49(ブロード s, 2H). HPLC: 方法 D, RT=3.52 分.

【0291】

すべての反応は不活性な雰囲気下で行った。NMR スペクトルは Bruker dpx400 で得られた。LCMS は zprbax SBC-18, 4.6 mm x 150 mm - 5 μ カラムまたは小さいカラム: ZORBA X (登録商標) SB-C18, 4.6 x 75 mm, 3.5 ミクロン ("短いカラム") を用いた Agilent 1100 で行った。カラム流速は 1 ml / 分であり、使用した溶媒は水およびアセトニトリル (0.1% TFA) で、インジェクション体積は 10 μ l であった。波長は 254 および 210 nm であった。方法は以下に記載する。

【0292】

表19： 分析方法

【0293】

【表19】

方法	イーザーアクセス 方法名	ChemStation 方法名	流速	溶媒	ラン タイム
A	分析ポジティブ 7mn	ANL_POS7.M	1ml/分	0-2.5 分 5-95% MeCN 2.5-6 分 95% MeCN	7 分
B	分析ポジティブ イオン	ANAL_POS.M	1ml/分	0-11 分 5-95% MeCN 11-13 分 95% MeCN	15 分
C	ループインジェクショ ン、 ポジティブ		1ml/分	95% MeCN	1 分
D	分析ポジティブ イオン	短いカラム ANL ポジティブ	1ml/mn	0-4.5 分 30-95% MeCN	5 分
E	分析 高pH	分析 高pH	3ml/分	0 to 8 分 5-95% MeCN 8 to 9 分 95% MeCN	10 分

【0294】

表20： 化学プロトコルで用いた略語

【0295】

10

20

30

40

【表 20】

aq	水溶液
D	二重線
DMSO	ジメチルスルホキシド
G	グラム
HCl	塩酸
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
LCMS	液体クロマトグラフィー質量分析法
M	多重線
mins	分
mmol	ミリモル
N	ノーマル
NMR	核磁気共鳴
Q	四重線
RT	保持時間
S	一重線
sat	飽和
T	三重線

【0296】

実施例 7：キノビーズリガンド 7（修飾スタウロスポリン）の合成

スタウロスポリンに基づくキノビーズリガンド 7 は以下のプロトコルに従って合成した。

【0297】

工程 1：ジグリコール酸無水物によるスタウロスポリンの修飾

スタウロスポリン（典型的には 10 mg、Iris-Biotech、ドイツ）を 1 ml の水不含 DMF に溶解し、5 μ L の TEA を加え、0 $^{\circ}$ C に冷却する。LC-MS システム（AGILENT、ドイツ）を用いた相対初期量の決定のために、この溶液から 5 μ l を取り、そして 50 μ l の ACN と混合する。LC-MS 分析のために、5 μ l の反応混合物を 50 μ l の 100% ACN へと希釈する。よく攪拌した後で、5 μ l をオートサンプラーを用いて HPLC 分析にアプライする。分離は、溶媒 A として水中 0.1% ギ酸および溶媒 B として 100% ACN 中 0.1% ギ酸で 450 μ l / 分の流速で、3 x 50 mm C18 カラム（ZORBAX-Extended C18、AGILENT、ドイツ）を用いて行う。75 分で 10% A から 95% B へのグラジエントを用いる。UV 吸収は 254 nm で観察し、化合物の分子量はシングルステージ四重極 MS システム（MSD、AGILENT、ドイツ）によりオンラインで決定する。記録したデータは手動で確認する。この最初の解析は、反応産物の収率の計算のための標準となる。UV シグナルのピーク面積は、純粋なスタウロスポリンに基づいて、初期量として 100% にセットした。

【0298】

氷冷スタウロスポリン溶液に、DMF 中、10 倍過剰のジグリコール酸無水物（Merck、ドイツ）を加える。100% 収率に近い反応は 10 分で終了し、5 μ l の反応混合物を 50 μ l ACN で混合することにより HPLC で確認し、そして上述したように LC-MS で分析する。分子量は、一価に荷電した分子について、467.5 Da（非修飾スタ

ウロスポリン) から 545.6 Da (修飾スタウロスポリン) へとシフトする。反応が完了しない場合は、別の 10 倍過剰のジグリコール酸無水物を加え、そして混合物を室温でさらに 30 分維持する。反応混合物は上述したように LC-MS で分析する。

【0299】

反応が完了した後、非修飾スタウロスポリンは検出することができない。5 mL の水を反応混合物に混合する、第一に酸無水物をクエンチし、第二に固相抽出のために希釈する。10 mL メタノールでの活性化、および水中 0.1% TFA での平衡化により、500 mg C18 固相抽出カートリッジ (Phenomenex、ドイツ) を調製する。膜真空ポンプを用いて約 2 から 3 mL / 分の流速で、溶媒をカートリッジを流し通す。水性の反応混合物をカートリッジにアプライし、上記と同じ流速で流し通す。溶液が完全にカートリッジを
10
通り抜けて、修飾スタウロスポリンが C18 材料に結合した後で、それを最初に 5% ACN、0.1% TFA、次いで 10% ACN、そして最後に 20% ACN、すべては水中 0.1% TFA を伴う、で洗浄する。次いで、修飾スタウロスポリンは水中 70% ACN、0.1% TFA、続いて水中 80% ACN、0.1% TFA で溶出する。溶出物は合わせて、そして真空中で乾燥する。

【0300】

工程 2: PyBrop 化学を用いる修飾スタウロスポリンの固相に結合したジアミンへのカップリング

水不含 DMF 中に修飾スタウロスポリンを溶解し、そして DMF 中の予め膨潤させたビス (アミノエチル) エチレングリコールトリチルレジン (IRIS Biotech、ドイツ) へと加える。固相に結合したジアミンは 2 から 3 倍過剰で加える。そのスラリーに、10 μ l のジイソプロピルエチルアミン (DIEA、FLUKA、ドイツ)、および、修飾スタウロスポリンに対して 5 倍過剰の PyBrop を加える。反応を室温で 16 時間、エンドオーバーエンドミキサー上での恒常的な混合の下で行う。非結合修飾スタウロスポリンについて、上述したように LC-MS システムを用いて HPLC により、上清を確かめる。この工程は定量的ではなく、非結合修飾スタウロスポリンの消失のみを測定する。反応が完了した後 (非結合修飾スタウロスポリンはもはや検出されなくなっている)、レジンを 10 容積の水不含 DMF、および 10 容積の DCM で 2 度、洗浄する。
20

【0301】

工程 3: 切断反応

次いでレジンは 5 体積の DCM 中に再懸濁し、0 $^{\circ}$ C に冷却し、そして 1 mL の TFA を加える。先の淡黄色レジンは、反応を示してこの時点で暗赤色に変わるはずである。切断は 0 $^{\circ}$ C で 20 分間、そして室温で 20 分間行う。溶液を回収し、そしてレジンを 10 容積の DCM で 2 度洗浄する。すべての溶出物を合わせ、ロータリーエバポレーターを用いて乾燥させる。残った油状のフィルムを 0.5 mL DMF に溶解し、5 mL の水を加える。修飾スタウロスポリンは固相抽出により上述のように精製し、そして真空中で乾燥する。収率を、254 nm の UV 吸収を伴う HPLC で上述した初期の非修飾スタウロスポリンに対して、反応産物を 1 mL の DMF に溶解した後の非修飾スタウロスポリンの溶液に関連して、確認する。この溶液からの 5 μ l を 50 μ l の ACN に混合し、して 5 μ l を
40
LC-MS で分析する。期待する産物の分子量は 727.8 Da である。254 nm でのピーク面積は、記載したように 100% として分析した非修飾スタウロスポリンのピーク面積に関連する。

【0302】

修飾スタウロスポリンを、通常のようにそのアミノ基を介して、NHS-活性化セファロースへのカップリングに用いる。カップリングの前に、1 mL のビーズを 12 mL の水不含 DMSO で 3 回洗浄し、そして 1 mL の水不含 DMSO で再懸濁する。この懸濁液に 20 μ l の TEA を加え、そして等量の DMF 中 1 μ mol の修飾スタウロスポリン。添加およびウェル混合および 1200 rpm で 1 分間の短い遠心分離の直後、20 μ l の上清を取り、5 μ l を LC-MS で分析する。ロータリーミキサー上での 16 時間の継続的な混合の後、懸濁液を再度遠心分離し、そして 20 μ l を、上述した LC-MS による 5 μ
50

1の分析による残った非結合修飾スタウロスポリンの決定のため取る。通常、100%の修飾スタウロスポリンが結合する。ビーズはその後12mlのDMSOで3回洗浄し、1ml DMSOに再び再懸濁し、そして50μlのエタノールアミン(MERCK、ドイツ)を未反応NHS-活性化基をブロックするために加える。反応は、継続的な混合の下で16時間行う。ブロッキング反応の後、ビーズは12mlのイソプロパノール(iso-prop anole)(MERCK、ドイツ)で3回洗浄し、使用するまで1:1スラリーとして4℃で保管する。

【0303】

以下の試薬を用いた：

DMF： N，N-ジメチルホルムアミド(FLUKA，40228)；

TEA： トリエチルアミン(SIGMA-Aldrich，T0886)；

ACN： HPLCのためのアセトニトリル(Merck，1.00030)；

TFA： トリフルオロ酢酸(FLUKA，09653)；

PyBroP： ブロモートリス-ピロリジノーホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(Novabiochem，01-62-0017)；

DCM： ジクロロメタン(FLUKA，66749)；

DMSO： ジメチルスルホキシド(FLUKA，41648)。

【0304】

実施例8： 溶解物内競合結合および定量的タンパク質親和性プロファイル(PAP)

本実施例は細胞溶解物(特に本発明の第三の側面を参照)における競合結合を示す。試験化合物、ビスインドリルマレイミドVII I(BisVII I、周知のキナーゼ阻害剤；Daviesら、2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochemical Journal 351(Pt 1): 95-105)を細胞溶解物へと加え、それにより試験化合物が溶解物中の標的タンパク質に結合するのを可能にした。次いで、溶解物をキノビーズ親和性マトリクスと接触させ、残りの遊離標的タンパク質を捕捉した。次いで、キノビーズマトリクスに結合したタンパク質は、界面活性剤含有バッファーで溶出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離し、免疫検出(ウェスタンブロットティング)または質量分析検出により分析した。

【0305】

ウェスタンブロットティング分析のために、親和性マトリクスに結合したタンパク質を親和性マトリクスから溶出し、そしてその後SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、そしてブロットング膜に転写した。個々のキナーゼをGSK3アルファ、GSK3ベータおよびITKに対する特異的な抗体で検出した(図4A)。結果は、細胞溶解物をBisVII Iと予めインキュベーションすることは、標的タンパク質であるGSK3アルファおよびGSK3ベータのキノビーズマトリクスへの結合を、用量に依存した様式で妨げたことを示した。キナーゼ阻害剤BisVII Iの増加する濃度は、ITKの結合は妨げなかったが、GSK3アルファおよびGSK3ベータのキノビーズへの結合を特異的に妨げた。GSK3ベータについて、シグナルを計数し、細胞溶解物へ加えたBisVII I濃度に対してプロットした(図4B)。

【0306】

質量分析法によるタンパク質の定量的検出のために、タンパク質を親和性マトリクスから溶出し、そしてその後SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。適切なゲル領域を切り出し、そしてトリプシンでのゲル内タンパク質分解消化にかけた。4つのトリプシン消化試料(溶解物における3つの異なるBisVII I濃度および1つのDMSO対照に対応する)をiTRAQ試薬で標識し、そして合わせた試料を単一LC-MS/MS質量分析とそれに続くMS/MSスペクトルにおけるピーク定量で分析した(Rossら、2004. Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using a mine-reactive isobaric tagging reagents. Mol. Cell. Proteomics 3(12): 1154-1169)。結果は、異なるレベルの個々のタンパク質が検出され、そして相対強度値が計算されたことを示す(表21)。個々のキナーゼについての結合曲線を示す(図5)。キナーゼ

ー化合物対の親和性を表す相対強度 50 (R I 50) 値は、キナーゼ酵素アッセイによって報告される I C 50 値と同様である (Daviesら、2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochemical Journal 351 (Pt 1): 95-105)。

【0307】

1. 細胞培養

ジャーカット (Jurkat) 細胞 (ATCCからのクローン E6-1、番号 TIB-152) は、1 リットルスピナーフラスコ (Integra Biosciences、#182101) 中で、10% 仔ウシ血清 (Invitrogen) を添加した RPMI 1640 培地 (Invitrogen、#21875-034) 中、懸濁液で、 0.15×10^6 および 1.2×10^6 細胞/ml の間の密度で増殖させ、そして遠心分離により回収した。細胞ペレットは液体窒素で凍結し、そしてその後 -80°C で保管した。

【0308】

2. 細胞溶解物の調製

ジャーカット細胞を、溶解バッファー: 50 mM トリス-HCl、0.8% NP40、5% グリセロール、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、25 mM NaF、1 mM バナジン酸ナトリウム、1 mM DTT、pH 7.5、中、ポッターSホモジナイザー中で、ホモジナイズした。25 ml のバッファーあたり 1 の完全 EDTA 不含タブレット (プロテアーゼ阻害剤カクテル、Roche Diagnostics、1873580) を加えた。材料は、機械化POTTER Sを用いて10回ダウンスし、50 ml フアルコンチューブに移し、氷上で30分間インキュベートし、そして 4°C 、20,000 g で10分間スピンドウンした (予め冷やしたSorvall SLA600中で10,000 rpm)。上清を超遠心 (UZ) -ポリカーボネートチューブ (Beckmann、355654) に移し、そして 4°C で100,000 g で1時間スピンした (予め冷やしたTi50.2中で33,500 rpm)。上清を新しい50 ml フアルコンチューブに再度移し、タンパク質濃度をブラッドフォードアッセイ (BioRad) により決定し、そしてアリコットあたり 50 mg のタンパク質を含有する試料を調製した。試料はすぐに実験に用いるか、液体窒素で凍結して -80°C で冷凍して保管した。

【0309】

3. 溶解物と試験化合物のブレインキュベーション

ジャーカット溶解物のアリコット (10 mg タンパク質) を異なる BisVI II I 濃度で 4°C で1時間インキュベートした (BisVI II I の最終濃度、0.025 μM 、0.074 μM 、0.22 μM 、0.67 μM 、2.0 μM 、および 6.0 μM)。この目的を達成するために、目的とする最終 BisVI II I 濃度の200倍に対応する BisVI II I 溶液を、溶媒として100% DMSO中で調製した (Alexix Biochemicalsカタログ番号ALX 270-056からの BisVI II I)。5 μl のこれらの溶液を、示した最終濃度となるように1 ml の溶解物に加えた。対照実験のために、BisVI II I を含まない 5 μl のDMSOを用いた。

【0310】

4. キノビーズでのタンパク質捕捉

それぞれの予めインキュベートした溶解物試料に、40 μl のキノビーズ (実施例1を参照) を加え、そして 4°C で1時間インキュベートした。インキュベーションの間、チューブはエンドオーバーエンドシェーカー (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) 上で回転させた。ビーズは遠心分離により回収し、Mobicol-カラム (MoBiTech 10055) へと移し、そして0.4% NP40界面活性剤を含有する1×DPバッファー10 ml で洗浄し、0.2% NP40界面活性剤を含有する1×DPバッファー5 ml での洗浄が続いた。結合したタンパク質を溶出するために、100 μl の2×SDS試料バッファーを添加し、カラムを 50°C で30分間過熱し、そして溶出物を遠心分離により遠心チューブに移した。次いで、タンパク質はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した。バッファーの組成および調製は実施例2に示した

。

【0311】

5. ウェスタンブロット分析によるタンパク質検出

ウェスタンブロットは標準的な手順に従って行い、そして製造元の指示に従って E C L ウェスタンブロットティング検出システムを用いて現像した (Amersham Biosciences, #RPN 2106)。Amershamからの E C L ウェスタンブロットティングシステムは、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (H R P) 標識抗体での直接的または間接的な、特定の抗原の検出のための発光非放射性方法である。

【0312】

抗グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ベータ (G S K 3 ベータ) 抗体は 1 : 1 0 0 0 の希釈率で使用した (ウサギポリクローナル抗 G S K 3 β 、Stressgen Bioreagents、カナダビクトリア州、製品番号 KAP-ST002)。この抗体は G S K 3 アルファもまた認識する。抗 I T K 抗体もまた、1 : 1 0 0 0 の希釈率で使用した (ウサギポリクローナル抗 I T K 抗体、Upstate Lake Placid、ニューヨーク、カタログ番号 06-546)。

10

【0313】

6. 質量分析法によるタンパク質検出

6. 1 質量分析解析の前のタンパク質消化

ゲルで分離したタンパク質は、Shevchenkoら、1996, Anal. Chem. 68:850-858に記載された工程に本質的に従って、ゲル内で還元し、アルキル化し、そして消化した。簡単には、ゲルで分離したタンパク質は清浄なメスを用いてゲルから切り出し、1 0 m M D T T を用いて還元し (5 m M 重炭酸アンモニウム中、5 4 $^{\circ}$ C、4 5 分間)、そしてその後 5 5 m M ヨードアセトアミド (5 m M 重炭酸アンモニウム中) で室温、暗所で 3 0 分間アルキル化した。還元され、アルキル化されたタンパク質はゲル内でブタトリプシン (Promega) で、5 m M 炭酸水素トリエチルアンモニウム (T E A B) 中、1 0 n g / μ l のプロテアーゼ濃度で、消化した。消化は 3 7 $^{\circ}$ C で 4 時間進行させ、そしてその後反応は 5 μ l の 5 % ギ酸を用いて停止した。

20

【0314】

6. 2 質量分析解析の前の試料調製

ゲルプラグを、水中 1 % ギ酸 2 0 μ l で 2 度、水中 0 . 1 % ギ酸、6 0 % アセトニトリル 2 0 μ l で 1 度抽出し、そして酸性化消化物上清とともにプールした。試料を真空中で乾燥させた。

30

【0315】

6. 3 ペプチド抽出物の i T R A Q 標識化

異なる濃度の試験化合物 (0 . 0 7 4 μ M、0 . 2 2 μ M、および 0 . 6 7 μ M B i s V I I I) および溶媒対照 (0 . 5 % D M S O) で処理した試料のペプチド抽出物を、異なる異性体の等圧タグ化試薬 (iTRAQ Reagents Multiplex Kit、パート番号 4352135、Applied Biosystems、米国カリフォルニア州フォスターシティ) で処理した。i T R A Q 試薬は、ペプチドの同時同定および定量を可能にする 4 つまでの異なる生物学的試料中のすべてのペプチドを標識できる、多発性の、アミン特異的な、安定同位体試薬である。i T R A Q 試薬は、製造元が提供する指示に従って用いた。

40

【0316】

試料を 1 0 μ l の 5 0 m M T E A B 溶液、p H 8 . 5 に再懸濁し、そして 1 0 μ l のエタノールを加えた。i T R A Q 試薬は 8 5 μ l のエタノールに溶解し、そして 1 0 μ l の試薬溶液を試料に加えた。標識化反応は室温で 1 時間、水平シェーカー上で行い、水中の 1 0 % ギ酸 1 0 μ l を加えることにより停止した。次いで 4 つの標識したサンプルを合わせ、真空遠心分離器で乾燥させ、水中 0 . 1 % ギ酸 1 0 μ l 中に再懸濁した。

【0317】

6. 4 質量分析データ収集

ペプチド試料を、四重極 T O F (QTOF2, QTOF Ultima, QTOF Micro, Micromass) またはイオントラップ (LTQ Deca XP) 質量分析計に直接つないだ、ナノ L C システム (CapLC

50

、WatersまたはUltimate, Dionex) へとインジェクトした。ペプチドは、水性および有機溶媒を用いたグラジエントを用いてLCシステム上で分離した(以下を参照)。溶媒Aは0.5%ギ酸中5%アセトニトリルであり、溶媒Bは0.5%ギ酸中70%アセトニトリルであった。

【0318】

表3: LCシステムから溶出したペプチドは質量分析計で部分的に配列決定された。

【0319】

【表21】

時間 (分)	% 溶媒 A	% 溶媒 B
0	95	5
5.33	92	8
35	50	50
36	20	80
40	20	80
41	95	5
50	95	5

10

20

【0320】

6.5 タンパク質同定

LC-MS/MS実験で生じたペプチド質量およびフラグメンテーションデータは、NCBI (NCBI nr, dbESTならびにヒトおよびマウスゲノムについて) およびEuropean Bioinformatics Institute (EBI, ヒト、マウス、D.メラノガスターおよびC.エレガンスプロテオームデータベースについて)で維持され定期的に更新される、fastaフォーマットされたタンパク質およびヌクレオチド配列データベースへのクエリーに用いた。タンパク質は、測定されたペプチド質量およびフラグメンテーションデータを、ソフトウェアツールMascot (Matrix Science; Perkinsら、1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 20, 3551-3567)を用いて、データベースのエントリーから計算した同じデータを相関させることにより同定した。サーチ基準は、どの質量分析計を分析に用いたかに応じて変化した。

30

【0321】

6.6 タンパク質定量

相対的タンパク質定量は、本質的にRossおよびその同僚 (Rossら、2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. Mol. Cell. Proteomics 3(12): 1154-1169)により記載されたように、iTRAQレポーターイオンシグナルのピーク面積を用いて行った。

40

【0322】

6.7 結合曲線およびRI50値の決定

同定されたキナーゼについての相対強度 (RI) 値は表21に示す。試験化合物BisVI I Iは細胞溶解物において3つの異なる濃度で使用され、そしてRI値はDMSO対照について規格化した。選択されたキナーゼについて、RI値をBisVI I Iの濃度に対してプロットし、そして双曲線平衡モデルを用いてXlfitプログラム (ID Business Solutions Ltd.)を用いてカーブフィッティングを行った(図5)。RI50値は、キナーゼについてのMSシグナルの相対強度が、溶媒 (DMSO) 対照と比較して50%となる試験化合物 (BisVI I I) 濃度に対応する。

【0323】

50

表 2 1 : 質量分析解析により同定されたタンパク質

試験化合物 B i s V I I I は溶解物中で 3 つの異なる濃度で用い、そして得られた R I 値は D M S O 対照について規格化され、それは 1. 0 に定められた。相対強度値を列挙する。代表は国際タンパク質インデックス (IPI、European Bioinformatics Institute) のデータベースアクセス番号に関連し、タンパク質配列の編集はいくつかの高品質配列データベース (GenBank、EMBL、SwissProt、RefSeq、Ensemblを含む) に由来する。キナーゼ名は、ヒトキナーゼ命名法 (<http://kinase.com>) および、補足の材料の項目で特定される Manning et al., 2002, Science 298, 1912-1934 に従った。

【 0 3 2 4 】

【表 2 2 】

代表	クラス名	キナーゼ名	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4
			DMSO	0.074 μ M	0.22 μ M	0.67 μ M
IPI00298977.4	AAK1	AAK1	1.00	0.82	0.90	0.75
IPI00329488.4	ABL2	ARG	1.00	0.96	0.97	0.91
IPI00176642.3	AURKB	AurB	1.00	0.95	1.04	0.97
CZB00000043.1	ABL1	Abl1	1.00	0.81	0.90	1.03
IPI00306217.1	BLK	BLK	1.00	0.90	0.96	0.83
IPI00430291.1	CAMK2D	CaMK2d	1.00	0.91	0.99	0.88
IPI00169392.3	CAMK2G	CaMK2g	1.00	0.83	0.98	0.88
IPI00031681.1	CDK2	CDK2	1.00	0.89	0.85	0.65
IPI00023530.4	CDK5	CDK5	1.00	0.92	1.02	0.95
IPI00000685.1	CDK7	CDK7	1.00	1.03	1.04	0.89
IPI00013212.1	CSK	CSK	1.00	0.84	0.94	0.89
IPI00183400.8	CSNK1A1	CK1a	1.00	0.97	1.04	1.02
IPI00465058.1	CSNK1G1	CK1g1	1.00	1.01	1.05	0.96
IPI00219012.2	FYN	FYN	1.00	0.91	1.04	0.93
IPI00298949.1	GAK	GAK	1.00	0.92	1.01	0.97
IPI00292228.1	GSK3A	GSK3A	1.00	0.50	0.29	0.20
IPI00216190.1	GSK3B	GSK3B	1.00	0.54	0.39	0.28
IPI00004566.1	ITK	ITK	1.00	0.80	0.94	0.91
IPI00515097.1	LCK	LCK	1.00	0.87	1.00	0.94
IPI00003479.1	MAPK1	Erk2	1.00	0.89	1.04	0.98
IPI00002857.1	MAPK14	p38a	1.00	0.82	0.95	0.93
IPI00024672.1	MAPK8	JNK1	1.00	0.91	1.02	0.83
IPI00024673.1	MAPK9	JNK2	1.00	0.97	1.08	1.04
IPI00012069.1	NQO1		1.00	0.84	0.99	0.87
IPI00219129.7	NQO2		1.00	0.87	0.95	0.78
IPI00410287.1	PRKAA1	AMPKa1	1.00	0.88	1.00	0.91
IPI00220409.2	PRKAB1		1.00	0.91	0.94	0.79
IPI00549328.2	PRKAG1		1.00	0.78	0.79	0.68
IPI00385449.3	PRKCA	PKCa	1.00	0.25	0.19	0.18
IPI00219628.1	PRKCB1	PKCb	1.00	0.29	0.23	0.17
IPI00029702.1	PTK2B	PYK2	1.00	0.82	0.90	0.74
IPI00465291.3	SNF1LK2	QIK	1.00	0.93	1.11	0.98
IPI00479211.2	SRC	SRC	1.00	0.93	0.98	0.94
IPI00298940.2	STK6	AurA	1.00	0.90	1.03	0.87
IPI00293613.1	TBK1	TBK1	1.00	1.05	1.13	1.14
IPI00411818.3	ULK3	ULK3	1.00	0.95	0.97	1.15
IPI00025830.1	WEE1	Wee1	1.00	1.21	1.15	1.14
IPI00477734.1	YES1	YES	1.00	0.82	0.92	0.87

【図面の簡単な説明】

【 0 3 2 5 】

【図 1】キノビーズ (kinobeads) リガンドの構造。リガンドの源および合成経路は、実施例 1 に記載される。図 1 a : キノビーズリガンド 1 (ビスインドリルマレイミド V I I

I)、図1b:キノビーズリガンド2(プルバラノールB)、図1c:キノビーズリガンド3(CZC00007324、(7-(4-アミノメチル-フェニルアミノ)-3-(2,6-ジクロロ-フェニル)-1-メチル-1H-[1,6]ナフチリジン-2-オン))、図1d:キノビーズリガンド4(CZC00008004、2-(4'-アミノメチルフェニルアミン)-5-フルオロ-ピリミジン-4-イル)-フェニル-アミン)

【図2】シグナロキノーム(実施例2を参照されたい)。この図は、キノビーズを用いた薬剤選抜(drug pulldown)(左の円)と抗ホスホチロシン抗体ビーズを用いた慣用の免疫沈降(右の円)との比較を示す。キノビーズの実験では、合計626のタンパク質が同定され、これらのうち100がキナーゼである。免疫沈降(IP)実験では、合計503のタンパク質が同定され、これらのうちの12がキナーゼであった。双方の実験で同定されたキナーゼ(共通のキナーゼ)は、重なった部分に掲載される。結果は、キノビーズを用いると、抗ホスホチロシン抗体ビーズ(12キナーゼ)と比較して、有意により多くのキナーゼが同定された(100キナーゼ)ことを示す。

10

【図3】キノビーズリガンド5、6および7の構造。該リガンドの合成経路は、実施例5、6および7に記載される。図3a:キノビーズリガンド5(インドールリガンド91)の構造、図3b:キノビーズリガンド6(キナゾリンリガンド32)の構造、図3c:キノビーズリガンド7(修飾スタウロスポリン)の構造

【図4】定量的タンパク質親和性プロファイル(PAP)。この図は、溶解物の試験化合物Bis VII Iとの競合、およびウエスタンブロット解析を用いたタンパク質の検出を示す。選抜実験を、10mgのタンパク質を含有するジャークット細胞溶解物試料を用いて、実施例8に記載のように行った。投入された溶解物(レーンL:50μgタンパク質)およびキノビーズからのSDS溶出液(レーン1~7)を、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離し、メンブレンに転写し、そして抗体でプローブした。図4A:ウエスタンブロットを、まず、GSK3βに対する抗体でプローブした。ペルオキシダーゼで標識した二次検出抗体を、化学発光検出に用いた。ローディング対照として、ブロットを、抗ITK抗体でプローブした。レーンL:50μgのジャークット溶解物;レーン1:6.0μM Bis VII I;レーン2:2.0μM Bis VII I;レーン3:0.67μM Bis VII I;レーン4:0.22μM Bis VII I;レーン5:0.074μM Bis VII I;レーン6:0.025μM Bis VII I;レーン7:0.5% DMSO(溶媒対照)、図4B:GSK3βのキノビーズへの結合に対する、Bis VII Iによる濃度依存的競合。図2Aに示したウエスタンブロット上のGSK3βのバンドを、定量し、そして溶解物に加えたBis VII Iの濃度に対してプロットした。

20

30

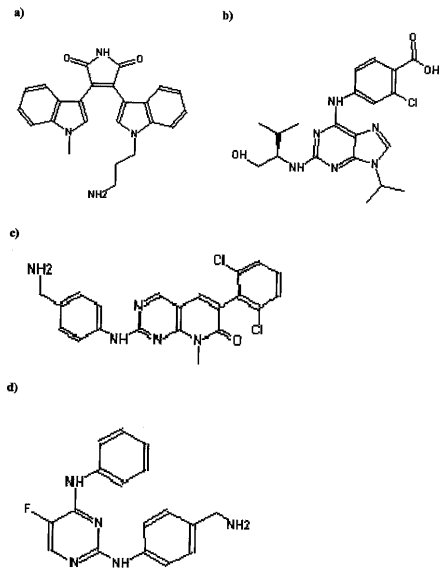
【図5-1】キナーゼの定量的タンパク質親和性プロファイル。実施例8の定量的親和性プロファイル実験の結果を、四つのキナーゼについて示す。相対強度(RI)値を、化合物の濃度に対してプロットする(Bis VII I)。RI50値とは、DMSO対照と比較して所与のキナーゼに対するMSシグナルの相対強度が50%であるときの、化合物の濃度を示す。図5A:グリコーゲンシンターゼキナーゼ3αに対する曲線(GSKa;RI50=72.7nM)、図5B:グリコーゲンシンターゼキナーゼ3βに対する曲線(GSKb;RI50=95nM)、

40

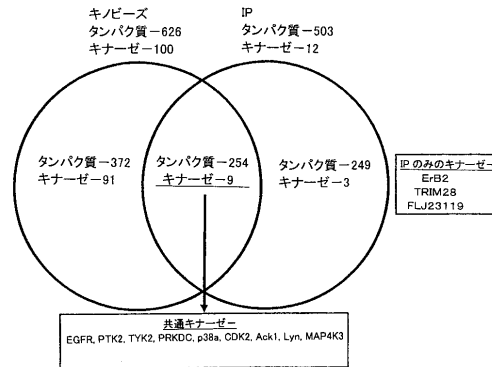
【図5-2】キナーゼの定量的タンパク質親和性プロファイル。実施例8の定量的親和性プロファイル実験の結果を、四つのキナーゼについて示す。相対強度(RI)値を、化合物の濃度に対してプロットする(Bis VII I)。RI50値とは、DMSO対照と比較して所与のキナーゼに対するMSシグナルの相対強度が50%であるときの、化合物の濃度を示す。図5C:プロテインキナーゼCαに対する曲線(PKCa;RI50=12.2nM)、図5D:プロテインキナーゼCβに対する曲線(PKCb;RI50=21.5nM)

【図 1】

Figure 1:

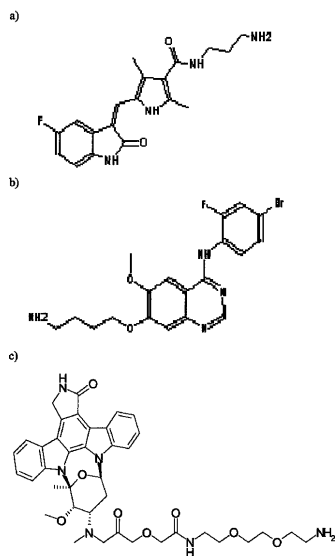


【図 2】

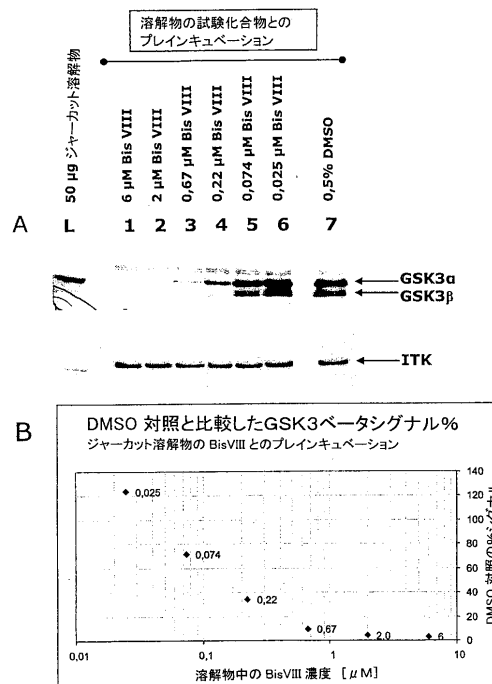


【図 3】

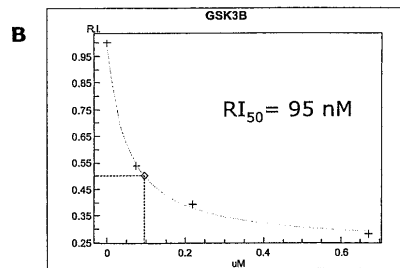
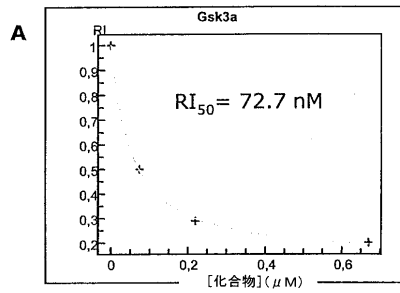
Figure 3:



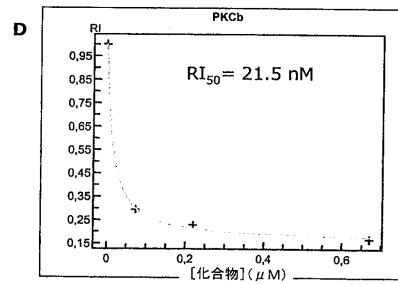
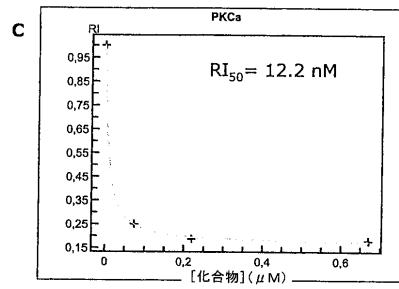
【図 4】



【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/782,170

(32)優先日 平成18年3月14日(2006.3.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ドリューズ, ジェラルド

ドイツ国 69121 ハイデルベルク, ブルクシュトラッセ 13

(72)発明者 キュスター, ベルンハルト

ドイツ国 69117 ハイデルベルク, ゾンネンヴェーク 17アー

(72)発明者 クルゼ, ウルリヒ

ドイツ国 69221 ドッセンハイム, フランケンヴェーク 32

(72)発明者 ホプフ, カルステン

ドイツ国 68165 マンハイム, ライプニッツシュトラッセ 6

(72)発明者 エーバーハルト, ディルク

ドイツ国 69256 マオアー, ヴェーレッカー・ヴェーク 6

(72)発明者 バンチェフ, マルクス

ドイツ国 69124 ハイデルベルク, シュヴァイツィンガーシュトラッセ 60

(72)発明者 リーダー, ヴァレリー

イギリス国ケンブリッジ シービー1 6ジェイエス, リントン, コールズ・レイン 5

(72)発明者 ライダ, マンフレート

シンガポール国 259281 シンガポール, サマーヴィル・パーク, ファーラー・ドライブ
75, ナンバー 15-01

(72)発明者 ミドルミス, デーヴィッド

イギリス国 シーエム23 33エヌエフ, ハートフォードシャー, ビショップス・スタートフォ
ード, ソーリー・ヒル 61

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 国際公開第2004/013633 (WO, A1)

国際公開第2003/089922 (WO, A1)

特開2004-340974 (JP, A)

国際公開第2004/007757 (WO, A1)

国際公開第93/005398 (WO, A1)

特開平07-194382 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

Science Direct