

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5524481号
(P5524481)

(45) 発行日 平成26年6月18日 (2014. 6. 18)

(24) 登録日 平成26年4月18日 (2014. 4. 18)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/48 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
G O 1 N 33/573 (2006. 01)	G O 1 N 33/573 A
G O 1 N 33/543 (2006. 01)	G O 1 N 33/543 5 7 5

請求項の数 14 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2008-520763 (P2008-520763)	(73) 特許権者	591032596
(86) (22) 出願日	平成18年7月7日 (2006. 7. 7)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ ト ベシュレンクテル ハフツング
(65) 公表番号	特表2009-501516 (P2009-501516A)		Merck Patent Gesell schaft mit beschrae nkter Haftung
(43) 公表日	平成21年1月22日 (2009. 1. 22)		ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ ルムシュタット フランクフルター シュ トラーセ 250
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/006642		Frankfurter Str. 25
(87) 国際公開番号	W02007/009613		O, D-64293 Darmstadt
(87) 国際公開日	平成19年1月25日 (2007. 1. 25)		, Federal Republic o f Germany
審査請求日	平成21年7月7日 (2009. 7. 7)	(74) 代理人	100123788
(31) 優先権主張番号	05015493.9		弁理士 宮崎 昭夫
(32) 優先日	平成17年7月16日 (2005. 7. 16)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チロシンキナーゼリン酸化の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キナーゼ阻害剤の存在下での前記キナーゼ阻害剤の非存在下と比較した1種または複数のチロシンキナーゼの自己リン酸化の測定方法であって、

(a) 血清除去によって細胞を飢餓状態にするステップと、

(b) キナーゼ阻害剤の存在下または非存在下で、血清、増殖因子および／またはサイトカインを添加することによってキナーゼ自己リン酸化を誘導するステップと、

(c) 細胞を溶解して、細胞から細胞溶解物を遊離させるステップと、

(d) 複数のチロシンキナーゼ特異的抗体を添加することによって、細胞溶解物中のキナーゼを捕捉するステップであって、該抗体のそれぞれが特有の色素と結合しているステ
ップと、

(e) d) のいずれの該色素とも区別できるマーカーをタグ付けしたリン酸化チロシン特異的抗体を添加するステップと、

(f) d) の該色素およびe) の該マーカーを検出することにより自己リン酸化チロシンキナーゼを同定するステップと、

(g) キナーゼ阻害剤の存在下でのチロシンキナーゼの自己リン酸化とキナーゼ阻害剤の非存在下でのチロシンキナーゼの自己リン酸化のレベルを比較するステップと、
を有し、自己リン酸化を有する場合には、該色素の第一のシグナルと該マーカーの第二のシグナルとが検出され、自己リン酸化がない場合には、該色素の第一のシグナルのみを検出することを特徴とする測定方法。

10

20

【請求項 2】

キナーゼ阻害剤の存在下での前記キナーゼ阻害剤の非存在下と比較した 1 種または複数のチロシンキナーゼの自己リン酸化の測定方法であって、

(a) 特定のチロシンキナーゼを特有の色素に結合するステップと、

(b) キナーゼ阻害剤の存在下または非存在下で、キナーゼ自己リン酸化を誘導するステップと、

(c) a) のいずれの該色素とも区別できるマーカーをタグ付けしたリン酸化チロシン特異的抗体を添加するステップと、

(d) a) の該色素および c) の該マーカーを検出することにより自己リン酸化チロシンキナーゼを同定するステップと、

(e) キナーゼ阻害剤の存在下でのチロシンキナーゼの自己リン酸化とキナーゼ阻害剤の非存在下でのチロシンキナーゼの自己リン酸化のレベルを比較するステップと、を有し、自己リン酸化を有する場合には、該色素の第一のシグナルと該マーカーの第二のシグナルとが検出され、自己リン酸化がない場合には、該色素の第一のシグナルのみを検出することを特徴とする測定方法。

10

【請求項 3】

キナーゼ活性化因子の存在下での前記キナーゼ活性化因子の非存在下と比較した 1 種または複数のチロシンキナーゼの自己リン酸化の測定方法であって、

(a) 血清除去によって細胞を飢餓状態にするステップと、

(b) キナーゼ活性化因子の存在下または非存在下で、血清、増殖因子および／またはサイトカインを添加することによってキナーゼ自己リン酸化を誘導するステップと、

(c) 細胞を溶解して、細胞から細胞溶解物を遊離させるステップと、

(d) 複数のチロシンキナーゼ特異的抗体を添加することによって、細胞溶解物中のキナーゼを捕捉するステップであって、該抗体のそれぞれが特有の色素と結合しているステップと、

(e) d) のいずれの該色素と区別できるマーカーをタグ付けしたリン酸化チロシン特異的抗体を添加するステップと、

(f) d) の該色素および e) の該マーカーを検出することにより自己リン酸化チロシンキナーゼを同定するステップと、

(g) キナーゼ活性化因子の存在下でのチロシンキナーゼの自己リン酸化とキナーゼ活性化因子の非存在下でのチロシンキナーゼの自己リン酸化のレベルを比較するステップと、を有し、自己リン酸化を有する場合には、該色素の第一のシグナルと該マーカーの第二のシグナルとが検出され、自己リン酸化がない場合には、該色素の第一のシグナルのみを検出することを特徴とする測定方法。

20

30

【請求項 4】

前記色素が蛍光またはルミネセンス色素であることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記マーカーが蛍光またはルミネセンスマーカーであることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 6】

前記細胞飢餓 (a) の前に、チロシンキナーゼをコードする核酸で該細胞を形質転換することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞は真核細胞であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記真核細胞は哺乳類細胞であることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

チロシンキナーゼを阻害する特異性についてキナーゼ阻害剤をプロファイリングするた

50

めの方法であって、

- (a) 血清除去によって細胞を飢餓状態にするステップと、
 - (b) キナーゼ阻害剤の存在下または非存在下で、血清、増殖因子および／またはサイトカインを添加することによってキナーゼ自己リン酸化を誘導するステップと、
 - (c) 細胞を溶解して、細胞から細胞溶解物を遊離させるステップと、
 - (d) 複数のチロシンキナーゼ特異的抗体を添加することによって、細胞溶解物中のキナーゼを捕捉するステップであって、該抗体のそれぞれが特有の色素と結合しているステップと、
 - (e) d) のいずれの該色素とも区別できるマーカーをタグ付けしたリン酸化チロシン特異的抗体を添加するステップと、
 - (f) d) の該色素および e) の該マーカーを検出することにより自己リン酸化チロシンキナーゼを同定するステップと、
 - (g) キナーゼ阻害剤の存在下と非存在下での該チロシンキナーゼの自己リン酸化のレベルを比較するステップと
- を有し、キナーゼ阻害がない場合には、該色素の第一のシグナルと該マーカーの第二のシグナルとが検出され、キナーゼ阻害の場合には、該色素の第一のシグナルのみを検出することを特徴とする検出方法。

10

【請求項 10】

チロシンキナーゼを活性化する特異性についてキナーゼ活性化因子をプロファイリングするための方法であって、

20

- (a) 血清除去によって細胞を飢餓状態にするステップと、
 - (b) キナーゼ活性化因子の存在下または非存在下で、血清、増殖因子および／またはサイトカインを添加することによってキナーゼ自己リン酸化を誘導するステップと、
 - (c) 細胞を溶解して、細胞から細胞溶解物を遊離させるステップと、
 - (d) 複数のチロシンキナーゼ特異的抗体を添加することによって、細胞溶解物中のキナーゼを捕捉するステップであって、該抗体のそれぞれが特有の色素と結合しているステップと、
 - (e) d) のいずれの該色素とも区別できるマーカーをタグ付けしたリン酸化チロシン特異的抗体を添加するステップと、
 - (f) d) の該色素および e) の該マーカーを検出することにより自己リン酸化チロシンキナーゼを同定するステップと、
 - (g) キナーゼ活性化因子の存在下と非存在下での該チロシンキナーゼの自己リン酸化のレベルを比較するステップと
- を有し、キナーゼ活性化の場合には、該色素の第一のシグナルと該マーカーの第二のシグナルとが検出され、キナーゼ活性化のない場合には、該色素の第一のシグナルのみを検出することを特徴とする検出方法。

30

【請求項 11】

キナーゼ阻害剤の非存在下でのチロシンキナーゼのリン酸化をプロファイルすることを含み、チロシンキナーゼ活性の増強又は過剰発現を特徴とする腫瘍の診断を補助する方法であって、

40

- (a) 血清除去によって細胞を飢餓状態にするステップと、
- (b) キナーゼ阻害剤の存在下または非存在下で、血清、増殖因子および／またはサイトカインを添加することによってキナーゼ自己リン酸化を誘導するステップと、
- (c) 細胞を溶解して、細胞から細胞溶解物を遊離させるステップと、
- (d) 複数のチロシンキナーゼ特異的抗体を添加することによって、細胞溶解物中のキナーゼを捕捉するステップであって、該抗体のそれぞれが特有の色素と結合しているステップと、
- (e) d) のいずれの該色素とも区別できるマーカーをタグ付けしたリン酸化チロシン特異的抗体を添加するステップと、
- (f) d) の該色素および e) の該マーカーを検出することにより自己リン酸化チロシ

50

ンキナーゼを同定するステップと、

(g) キナーゼ阻害剤の存在下と非存在下での該チロシンキナーゼの自己リン酸化のレベルを比較するステップと

を有し、自己リン酸化を有する場合には、該色素の第一のシグナルと該マーカの第二のシグナルとが検出され、自己リン酸化がない場合には、該色素の第一のシグナルのみを検出することを特徴とする測定方法。

【請求項 1 2】

前記チロシンキナーゼが、上皮成長因子受容体(EGFR)、PDGF受容体、インシュリン受容体チロシンキナーゼ(IRK)、Met受容体チロシンキナーゼ、繊維芽細胞増殖因子(FGF)受容体、インシュリン受容体、インシュリン増殖因子(IGF-1)受容体、TrkA受容体、TIE-1、Tek/Tie2、Flt-1、Flk、VEGFR3、EGFR(HER-1、ERBB2(HER-2)、ERBB3(HER-3)、ERBB4(HER-4)、Ret、Kit、Alk、Ax11、FGFR1、FGFR2、FGFR3またはEph受容体である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記抗体が、ビーズ又は小球体の上にコーティングされていることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

キナーゼ阻害剤の存在下での前記キナーゼ阻害剤の非存在下と比較した 1 種または複数のチロシンキナーゼの自己リン酸化の測定方法であって、

20

(a) 血清飢餓した細胞試料の複数のチロシンキナーゼの自己リン酸化を、血清、増殖因子、又はサイトカインを加えることにより、キナーゼ阻害剤の存在下又は非存在下において活性化するステップと、

(b) 該(a)から得られた細胞試料の溶解物中の複数のキナーゼを、抗体に特有である色素と接合し、さらにチロシンキナーゼに特異的に結合する、複数のチロシンキナーゼ特異的抗体で捕捉するステップと、

(c) 該(b)のいずれの色素とも区別できるマーカをタグ付けした第 2 のリン酸化チロシンキナーゼ特異的抗体を添加するステップと、

(d) 該色素と該マーカとを検出することにより、自己リン酸化チロシンキナーゼを同定するステップと、

30

(e) キナーゼ阻害剤の存在下でのチロシンキナーゼの自己リン酸化とキナーゼ阻害剤の非存在下でのチロシンキナーゼの自己リン酸化のレベルを比較するステップと、を有し、自己リン酸化を有する場合には、該色素の第一の蛍光シグナルと該マーカの第二の蛍光シグナルとが検出され、自己リン酸化がない場合には、該色素の第一の蛍光シグナルのみを検出することを特徴とする測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

(発明の分野)

本発明は、1 腔中の 100 個までの異なるチロシンキナーゼの自己リン酸化を検出するための免疫測定法に関する。

【0002】

(発明の背景)

増大する配列データベースの普及と共に、ゲノム分野では、細胞におけるタンパク質発現のより迅速で、より効率的な全体的スクリーニング方法が要求されている。しかし、タンパク質翻訳後の修飾も考慮するならば、細胞プロテオームの複雑さは大幅に拡大する。

【0003】

50

タンパク質の翻訳後の動的修飾は、タンパク質構造および機能の維持および調節に重要である。今まで特徴づけられた数百もの様々な種類の翻訳後修飾の中でも、タンパク質リン酸化は際だった役割を担っている。タンパク質の酵素触媒によるリン酸化および脱リン酸化は、生細胞において鍵となる調節現象である。細胞周期、細胞増殖、細胞分化および代謝などの複雑な生物学的プロセスは、タンパク質活性、安定性、相互作用および局在化を調節する可逆的リン酸化現象によって調和し、しっかり調節されている。例えば、構造的に活性化または不活性化したタンパク質キナーゼおよびホスファターゼを生じる変異によって、タンパク質のリン酸化状態を混乱させると、腫瘍形成において際だった役割を果たす。このようなタンパク質のリン酸化部位の正確な位置確認と結びつけてリン酸化タンパク質を総合的に分析し同定すること（ホスホプロテオミクス）は、複雑な生体系および疾患を引き起こす分子的特徴を理解するために必要不可欠である。

10

【0004】

タンパク質リン酸化は、共有結合修飾の最も一般的な機構の1つである。哺乳類細胞に存在する全タンパク質の3分の1がリン酸化されており、このリン酸化に関与する酵素、キナーゼは、発現したゲノムの約1から3%に相当すると推定される。生体は、情報伝達、遺伝子発現、細胞周期、細胞骨格調節およびアポトーシスを含む多くの細胞プロセスを制御するためにタンパク質の可逆的リン酸化を利用している。リン酸基は、セリン、トレオニン、チロシン、ヒスチジン、アルギニン、リシン、システイン、グルタミン酸およびアスパラギン酸残基を修飾することができる。しかし、セリン（90%）、トレオニン（10%）またはチロシン（0.05%）残基のヒドロキシル基のリン酸化が最も一般的で、代謝、細胞分割、細胞増殖および細胞分化におけるその他のプロセスに関与している。生命の調節において、リン酸化は中心的役割を果たすので、タンパク質リン酸化を特徴づける方法の開発に多大な労力が注がれてきた。これらのリン酸化部位の多くは、重要な生物学的プロセスを制御し、分子医学の重要な診断または治療標的となることが判明している。例えば、今までに同定された100個を超える優性癌遺伝子のうち46個がタンパク質キナーゼである。

20

【0005】

多くの癌は、癌細胞の制御不能な成長および増殖を引き起こす、細胞情報伝達経路の破壊が特徴である。受容体チロシンキナーゼ（RTK）は、これらの情報伝達経路で極めて重要な役割を担っており、細胞の細胞質および／または核に細胞外からの分子信号を送っている。ほとんど全種の組織の細胞が固有のチロシンキナーゼ活性を備えた膜貫通受容体分子を発現しており、それによって、様々な増殖および分化因子が一連の生物学的効果を媒介している（Aronson, Science 254: 1146~52 (1991)）に概説されている）。

30

【0006】

チロシンキナーゼの触媒活性は、活性部位と呼ばれるキナーゼドメインの1領域内の自己リン酸化によって刺激されることが多く（Weinmaster他、(1984) Cell 37, 559~568）、実際に、これはRTKが活性化される主要な機構と見なされている（HubbardおよびTill(2000) Annu.Rev.Biochem. 69, 373~398、およびHubbard、(1997) EMBO J. 16, 5572~5581）。いくつかの受容体から単離されたキナーゼドメインの構造分析によって、活性化部位がどのようにしてキナーゼ活性を抑制し、それによってリン酸化がこの自己阻害を緩める方法が明らかになった。不活性化インシュリン受容体の場合、活性化部位のTyr1162が活性部位に突き出しており、この活性化部位がATP結合部位への接近を遮断している（Hubbard他、(1994) Nature 372, 746~754）。Tyr1162および隣接する2個のチロシン残基の自己リン酸化は、活性化部位の位置を変化させ、それによって活性部位が外来基質と自由に結合できるようになり、触媒作用に必要な残基を機能的構造に再構成する（Hubbard(1997) EMBO J. 16, 5572~5581）。対照的に、繊維芽細胞増殖因子(FGF)受容体の活性化部位は、比較的動きやすく、受容体活性化によってリン酸化されるチロシンは活性部位を占有

40

50

していない。しかし、FGFR1活性化部位のC末端は、基質の接近を遮断するようである(Mohammadi他、(1996)Cell 86、577~587)。

【0007】

本発明の範囲内の受容体チロシンキナーゼには、限定はしないが、上皮成長因子受容体(EGFR)、PDGF受容体、インシュリン受容体チロシンキナーゼ(IRK)、Met受容体チロシンキナーゼ、繊維芽細胞増殖因子(FGF)受容体、インシュリン受容体、インシュリン増殖因子(IGF-1)受容体、TrkA受容体、TIE-1、Tek/Tie2、Flt-1、Flk、VEGFR3、EGFR(HER-1、ERBB2(HER-2)、ERBB3(HER-3)、ERBB4(HER-4)、Ret、Kit、Alk、Ax11、FGFR1、FGFR2、FGFR3およびEph受容体が含まれる。

10

【0008】

様々なヒト悪性腫瘍と増殖因子-RTKシグナル経路の破壊との間には生物学的関係が存在することが知られている。例えば、EGFRファミリー受容体の過剰発現は、胸部、膀胱、肺および胃の癌などの様々な侵襲性ヒト上皮癌にしばしば認められる(例えば、Neal他、Lancet 1:366~68(1985)、Sainsbury他、Lancet 1:1398~1402(1987)参照)。同様に、HER2の過剰発現はまた、胃、子宮内膜、唾液腺、膀胱および肺の癌を含むその他のヒト癌と相関している(例えば、Yokota他、Lancet 1:765~67(1986)、Fukushigi他、Mol. Cell. Biol. 6:955~58(1986)参照)。このようなRTKのリン酸化は、それらの細胞質ドメインキナーゼ機能を活性化し、次に下流情報伝達分子を活性化する。RTKは、異なるチロシン残基などの複数の異なる部位をリン酸化することが多い。これらの酵素は、癌治療の有望な薬剤標的としての人気が高まっている。例えば、EGFRの阻害剤、イレッサ(商標)は、近年乳癌治療の臨床試験に移行した。同様に、BCR/ABLの阻害剤、グリベック(商標)は、CMLの治療に現在広く使用されている。単一のタンパク質の活性を改変しようとする標的化治療が従来の化学毒性治療または放射線療法よりも非常に有利であるのは、それらが調節解除された細胞を特異的に標的化し、したがって、現在の治療に見られるような広範な細胞毒性および有害な副作用がないことである。細胞の異常な増殖、分化および/または機能障害は、多くの疾患の原因であると考えられる。タンパク質キナーゼおよび関連分子は、これらの細胞の制御において重要な役割を果たし、したがってそれらは非常に重要な薬剤標的である。

20

30

【0009】

タンパク質キナーゼは、細胞増殖および外部刺激に対するその他の応答を制御する細胞情報伝達カスケードの重要な成分である。キナーゼを阻害することによってこれらの情報伝達カスケードを変更すると、癌、炎症、糖尿病および脳卒中を含めた多くの疾患および症状に影響が及ぶ可能性がある。

【0010】

癌は、西欧では死因の第2位である。診断および治療は進歩しているものの、患者の全体的な生存率は低いままである。近年科学の進歩によって、癌の生物学的理解は深まってきた。ヒトタンパク質チロシンキナーゼ(PTK)は、ヒトの発癌において中心的な役割を担っており、有望な新規標的として浮上してきた。チロシンキナーゼを阻害するいくつかのアプローチが開発されてきた。これらの薬剤は、前臨床研究では印象的な抗癌作用を示し、臨床では有望な薬剤となってきている。慢性骨髄性白血病の治療におけるBCR-ABLチロシンキナーゼ阻害剤、イマチニブ(グリベック(商標))のめざましい成功は、この分野の熱心な研究を特に刺激した。少なくとも30種の阻害剤が、癌における臨床応用の様々な段階にあり、約120種の臨床試験が世界中で進行中である。これらの薬剤の潜在力を十分に評価するには画期的なアプローチが必要であり、国際的に一致団結した努力が役立って、近い将来、癌治療にこれらの阻害剤を組み入れることが期待される。

40

【0011】

結果的に、タンパク質キナーゼは、薬剤開発のための最も顕著な標的ファミリーの1つとなってきた。したがって、患者の予後を改善するために、より新しく、より効果的な治

50

療を開発することが緊急に必要とされている。

【0012】

近年、科学の目覚ましい進歩によって、癌の生物学に対する我々の理解が深まってきた。その結果、いくつかの新たな標的が同定された。チロシンキナーゼは、癌治療の新たな有望な標的として浮上してきた。多くの小分子キナーゼ阻害剤が現在開発中で、グリベック(商標)(Novartis、白血病、消化器官腫瘍)およびイレッサ(商標)(AstraZeneca、肺癌)の承認によって、非常に有望な治療戦略としてキナーゼの阻害の妥当性が確認された。

【0013】

ヒトゲノム配列の分析によって、約518個のヒトタンパク質キナーゼ(ヒト遺伝子全体の約1.7%を構成する)が同定された。この大きなタンパク質キナーゼ補体の中で、少なくとも90個のチロシンキナーゼ遺伝子(58個の受容体チロシンキナーゼ(RTK、表1)および32個の非受容体チロシンキナーゼ(NRTK、表2)が同定された。それらが引き起こす細胞シグナル伝達経路は複雑である(Schlessinger J.他、Cell 103(2000)、pp.211~225)。簡単に説明すると、受容体チロシンキナーゼ(RTK)は、アミノ末端細胞外リガンド結合ドメイン(通常グリコシル化されている)、疎水性膜貫通ヘリックス、ならびに保存されたタンパク質チロシンキナーゼ核および付加的な調節配列を含有する細胞質ドメイン(非常に重要なC末端チロシン残基および受容体調節モチーフを含有する)を含有する。細胞外ドメイン(ECD)に対するリガンド結合(HGF、IGF、EGF、TGFその他)は、受容体の2量体化/オリゴマー化を生じ、細胞質チロシンキナーゼ活性の活性化およびチロシン残基のリン酸化を引き起こす(Schlessinger 他、Neuron(1992)9:383~391)。自己リン酸化されたチロシン残基は、多様な細胞シグナル伝達応答を調節する特異的な一連のシグナル伝達タンパク質(例えば、SH2(Src相同性2)ドメインおよびPTB(リン酸化チロシン結合)ドメイン)の認識および動員の基盤として役立つ。非受容体チロシンキナーゼは、異なるアダプタータンパク質モチーフを有するモジュラーN末端を備えた通常保存された触媒ドメイン(RTKと同様)を有する。チロシンキナーゼは、細胞発達、分化、増殖、生存、成長、アポトーシス、細胞形成、接着、移動、細胞周期制御、T細胞およびB細胞活性化、血管新生、細胞外刺激に対する応答、神経伝達物質のシグナル伝達、血小板活性化、転写ならびにグルコース摂取を含む基本的な細胞プロセスの調節に重要な役割を担っている(Hunter T.Philos.Trans.R.Soc.Lond., Biol.Sci.353(1998)、pp.583~605)。通常ホメオスタシスにおいてそれらが中心的役割を担うとすれば、発達異常(頭蓋骨癒合症候群その他)、免疫不全(重症複合免疫不全病(SCID)、遺伝性無ガンマグロブリン症)、非インシュリン依存性糖尿病(NIDDM)、アテローム性動脈硬化、乾癬、腎疾患、神経疾患、白血病および固形癌を含むいくつかのヒト障害に関与することはおそらく驚くべきことではない(Madhusudan S.およびGanesan TS.Clin Biochem.2004 Jul;37(7):618~35)。

【0014】

10

20

30

【表 1 - 1】

表 1

受容体チロシンキナーゼおよび癌	
チロシンキナーゼ	関連する癌
EGFRファミリー	
EGFR (HER-1)	乳癌、卵巣癌、肺癌、多形神経膠芽腫など
ERBB2 (HER-2)	乳癌、卵巣癌、胃癌、肺癌、結腸癌など
ERBB3 (HER-3)	乳癌
ERBB4 (HER-4)	乳癌、顆粒膜細胞腫
インシュリンRファミリー	
IGF-1R	子宮頸癌、腎臓癌（明細胞）、肉腫など
IRR、INSR	-
PDGFRファミリー	
PDGFR-α	神経膠腫、神経膠芽種、卵巣癌
PDGFR-β	慢性骨髄単球性白血病 (CMML)、神経膠腫
CSF-1R	CMML、悪性組織球増殖症、神経膠腫、子宮内膜腫
KIT/SCFR	GIST、AML、骨髄形成異常、肥満細胞症、精上皮腫、肺癌
FLK2/FLT3	急性骨髄性白血病 (AML)
VEGFRファミリー	
VEGFR1	腫瘍血管新生
VEGFR2	腫瘍血管新生
VEGFR3	腫瘍血管新生、カポシ肉腫、血管肉腫
FGFRファミリー	
FGFR-1	AML、リンパ腫、いくつかの固形癌
FGFR-2	胃癌、乳癌、前立腺癌
FGFR-3	多発性骨髄腫
FGFR-4	-
KLG/CCKファミリー (CCK4)	-
NGFRファミリー	
TRKA	乳頭様甲状腺癌、神経芽細胞腫
TRKB	
TRKC	先天性線維肉腫、急性骨髄性白血病
HGFRファミリー	
MET	乳頭様甲状腺癌、横紋筋肉腫、肝癌、腎臓癌

【0 0 1 5】

【表 1 - 2】

RON	結腸癌、肝癌	
EPHRファミリー		
EPHA2	黒色腫	
EPHA1、3、4、5、6、7 および8	-	
EPHB2	胃癌、食道癌、結腸癌	10
EPHB4	乳癌	
EPHB1、3、5および6	-	
AXLファミリー		
AXL	AML	
MER、TYRO3	-	
TIEファミリー		
TIE	胃癌、毛細管芽腫	20
TEK	腫瘍血管新生	
RYKファミリー (RYK)	卵巣癌	
DDRファミリー (DDR1 およびDDR2)	乳癌、卵巣癌	
RETファミリー (RET)	甲状腺癌 (乳頭様および髄様)、多発性内分泌腫瘍	
ROSファミリー (ROS)	神経膠芽種、星状細胞腫	30
LTKファミリー		
ALK	非ホジキンリンパ腫	
LTK	-	
RORファミリー (ROR1 およびROR2)	-	
MUSKファミリー (MUSK)	-	
LMRファミリー (AATYK、AATYK 2 および3)	-	40
RTK106	-	

【0 0 1 6】

【表 2 - 1】

表 2

非受容体チロシンキナーゼおよび癌

チロシンキナーゼ	関連する癌	
ABLファミリー		
ABL1	慢性骨髄性白血病 (CML)、AML、ALL、CMML	
ARG	AML	
FRKファミリー		
BRK	乳癌	10
FRK	-	
SRMS	-	
JAKファミリー		
JAK1	白血病	
JAK2	AML、ALL、T細胞小児ALL、非定型CML	
JAK3	白血病、B細胞腫瘍	
JAK4	-	20
SRC-Aファミリー		
FGR	AML、CLL、EBV関連リンパ腫	
FYN	-	
SRC	結腸癌、乳癌、膵臓癌、神経芽腫	
YES1	結腸癌、黒色腫	
SRC-Bファミリー		
BLK	-	30
HCK	-	
LCK	T細胞ALL、CLL	
LYN	-	
SYKファミリー		
SYK	乳癌	
ZAP70	-	
FAKファミリー		
FAK	いくつかの腫瘍の接着性、侵襲性および転移性	40
PYK2	いくつかの腫瘍の接着性、侵襲性および転移性	
ACKファミリー		
ACK1	-	
TNK1	-	

【0 0 1 7】

【表 2 - 2】

CSKファミリー	-
CSK	
MATK	-
FESファミリー	
FER	-
FES	-
TECファミリー	
BMX	-
BTk	-
ITK	-
TEC	-
TXK	-

10

【0018】

チロシンキナーゼは、細胞の発癌形質転換に中心的な役割を担っている。これは、いくつかの方法で実現される(Blume-Jensen P.他、Nature 411(2001)、pp.355~365)。PTKの遺伝子増幅および／または過剰発現(例えば、いくつかの癌で通常見られるEGFRおよびHER-2の過剰発現)は、チロシンキナーゼ活性の増加を引き起こし、下流シグナル伝達の定量的および定性的な改変を伴う。ゲノム再構成(染色体転座など)は、構成的活性型キナーゼ活性を備えた融合タンパク質をもたらすことができる(例えば、慢性骨髄性白血病に見られるp210BCR-ABL融合タンパク質)。キナーゼドメインまたは細胞外ドメイン内のPTKの機能獲得型(GOF)変異または欠失は、構成的活性型チロシンキナーゼを生じる(例えば、細胞外ドメインのアミノ酸6~273を欠失したEGFRvIII変異体は、構成的活性型であり、固形腫瘍に見られる)。リガンドの過剰発現による自己分泌-パラ分泌刺激は、持続性チロシンキナーゼ刺激を生じる(例えば、TGF-は、神経膠芽種ならびに頭部および頸部の癌で過剰発現する(Grandis J.R.他、J.Cell.Biochem.69(1998)、pp.55~62)。最後に、構造変化の調節解除に伴うPTK対応癌原遺伝子のレトロウイルスによる形質導入は、動物(齧歯類および鶏)で生じる癌遺伝子形質転換の一般的な機構である(Blume-Jensen P.他、Nature 411(2001)、pp.355~365)。

20

30

【0019】

非常に多数の(受容体型および非受容体型両方の)チロシンキナーゼが癌に関係している。臨床研究によって、チロシンキナーゼの過剰発現／調節解除は、患者において予後的／予測的価値を有し得る(すなわち、侵襲性腫瘍の生物学的特徴を示すか、または治療に対する応答性の低さおよび生存の短さを予測できる)。チロシンキナーゼのEGFRファミリーは最も多岐にわたって研究されている。EGFR(HER-1)過剰発現は、卵巣癌、頭部および頸部の癌、食道癌、子宮頸癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、胃癌および子宮内膜癌の予後不良と関係がある(Nicholson R.I他、Eur.J.Cancer 37 Suppl.4(2001)、pp.S9~S15)。HER-2の過剰発現は、乳癌(Tandon A.K.他、A.K.Clin.Oncol.7(1989)、pp.1120~1128)、卵巣癌(Meden H.他、Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.71(1997)、pp.173~179)、前立腺癌(Sadasivan R.他、J.Urol.150(1993)、pp.126~131)、肺癌(Selvaggi G.他、Cancer 94(2002)、pp.2669~2674)および骨癌(Zhou H.

40

50

他、J. Pediatr. Hematol. Oncol. 25(2003)、pp. 27～32)の患者における予後不良と関係がある。C-KITチロシンキナーゼにおける変異は、消化管間質腫瘍の患者における生存の低さに関係し(Taniguchi M.他、Cancer Res. 59(1999)、pp. 4297～43)、急性骨髄性白血病における再発率に悪影響を及ぼす(Care R.S.他、Br. J. Haematol. 121(2003)、pp. 775～777)。小細胞肺癌では、C-KIT発現が生存率の低さと関係していた(Naeem M.他、Hum. Pathol. 33(2002)、pp. 1182～1187)。IGF-1およびIGF-2と共にIGF-1Rの発現は、結腸癌患者の一部において予後的価値を有し得る(Peters G.他、Virchows Arch.(2003))。急性骨髄性白血病では、FLT3変異は、高い再発率および無再発生存率の低さを予測する(Schnittger S.他、Blood 100(2002)、pp. 59～66)。VEGFは、腫瘍血管新生を引き起こす主要な増殖因子であり、固形癌における重要な予後マーカーである(Fox S.B.他、Lancet Oncol. 2(2001)、pp. 278～289)。最近の研究で、肺癌におけるVEGFR3発現は著しく低い生存率と関係があり(Arinaga M.他、Cancer 97(2003)、pp. 457～464)、結腸癌では予後的に重要でありうる(Parr C.他、Int. J. Oncol. 23(2003)、pp. 533～539)ことが示唆された。Trkチロシンキナーゼは、神経芽細胞種(NB)の重要なマーカーである。TrkAは、好ましい生物学的特性を備えたNBに存在し、患者生存率と高い相関性があるが、一方、TrkBはMYCN増幅を伴う好ましくない侵襲性のNBで主に発現している(Egert A.他、Klin. Padiatr. 212(2000)、pp. 200～205)。HGFR(Met)過剰発現は、早期浸潤性子宮頸癌における疾患予後、再発および生存率の低さと関係があり(Baycal C.他、Gynecol. Oncol. 88(2003)、pp. 123～129)、滑膜肉腫における予後不良と関係があり(Oda Y.他、Hum. Pathol. 31(2000)、pp. 185～192)、肝細胞癌における5年生存率の有意な低さを予測する(Ueki T.他、Hepatology 25(1997)、pp. 862～866)。Axlチロシンキナーゼ発現は、急性骨髄性白血病における予後不良と関係があった(Rochlitz C.他、Leukemia 13(1999)、pp. 1352～1358)。Tie-1キナーゼ発現は、胃癌(Lin W.C.他、Clin. Cancer Res. 5(1999)、pp. 1745～1751)および早期慢性期慢性骨髄性白血病(Verstovsek S.他、Cancer 94(2002)、pp. 1517～1521)における生存率と逆相関している。可溶性Tie-2受容体レベルは独立して、頭部および頸部の扁平上皮細胞における局所領域的再発を予測する(Homer J.J.他、Head Neck 24(2002)、pp. 773～778)。ALKタンパク質発現は、生存率の独立した予測変数であり、未分化大細胞型リンパ腫の範囲内の特異的疾患の有用な生物学的マーカーとして役立つ(ALCL、Gascogne R.D.他、Blood 93(1999)、pp. 3913～3921)。Srcチロシンキナーゼは、ヒト結腸癌の全病期における臨床的予後不良の独立した指標である(Aligayer H.他、Cancer 94(2002)、pp. 344～351)。BCR-ABLチロシンキナーゼは、予後的に価値があり、慢性骨髄性白血病(Olavarria E.他、Blood 97(2001)、pp. 1560～1565およびO'Dwyer M.他、Oncologist 7 Suppl. 1(2002)、pp. 30～38)および急性リンパ芽球性白血病(Gleissner B.他、Blood 99(2002)、pp. 1536～1543)を含む血液学的腫瘍の治療に対する応答性を予測する。FAK過剰発現は、食道扁平上皮細胞癌における腫瘍浸潤およびリンパ節転移と相関しており(Miyazaki, T.他、Br. J. Cancer 89(2003)、pp. 140～145)、Syk遺伝子の発現減少は、乳癌における予後不良と相関している(Toyama T.他、Cancer Lett. 189(2003)、pp. 97～102)。

【0020】

チロシンキナーゼを標的とするいくつかのアプローチが開発されてきた。チロシンキナ

10

20

30

40

50

ーゼドメイン阻害剤、チロシンキナーゼ受容体遮断薬(例えば、モノクローナル抗体)、リガンド調節因子(例えば、モノクローナル抗体)、RNA干渉およびアンチセンス技術、遺伝子治療戦略、Srcチロシンキナーゼの阻害剤、BCR-ABL阻害剤、下流情報伝達経路阻害剤は、癌治療の有望な戦略である。作用様式に基づいたこのような阻害剤の分類を表3にまとめて示す。受容体チロシンキナーゼは多領域タンパク質である。触媒ドメイン(Mg-ATP複合体結合部位)は近年薬剤設計の最も有望な標的となってきた。化合物ライブラリーのランダムスクリーニングによって、触媒ドメインの小分子化学阻害剤が最初に同定された。コンビナトリアル化学、インシリコクローニング、構造をベースにした薬剤設計およびコンピュータ化学は現在、リード化合物同定およびこれらの阻害剤の最適化に不可欠な手段となっている。阻害剤をスクリーニングするための高感度、正確かつ信頼性の高いハイスループットアッセイ(シンチレーション近接アッセイ、蛍光偏光アッセイ、均一時間分解蛍光測定法および不均一時間分解解離増強蛍光技術(heterogeneous time-resolved dissociation-enhanced fluorescence technology)(F.A.Al-ObeidiおよびK.S.Lam、Oncogene 19(2000)、pp.5690~5701)を含む)が開発された。タンパク質キナーゼの3次構造に関する知識は増大しており、50個を超えるタンパク質キナーゼのX線結晶学的構造が解析されている。「ATP結合部位」の様々な部分(アデニン領域、糖領域、疎水性ポケット、疎水性溝およびリン酸結合領域)の分子相互作用の理解が、薬剤開発を加速させてきた(Fabbro D.他、Pharmacol. Ther. 93(2002)、pp.79~98)。

【0021】

10

20

【表 3 - 1】

表 3

阻害剤の分類

小分子阻害剤	リガンド調節	
EGFR標的化	VEGF標的化	
ZD1839 (イレッサ、ゲフィチニブ)	ベバシズマブ (RhuMab、アバスタチン)	
OSI-774 (タルセバ、エルロチニブ、CP-358774)	MV833	
PKI-166	可溶性Flt-1およびFlk-1	10
CI-1033 (PD183805)	VEGFトラップ	
CGP-59326A	GFB 116	
EKB-569	NM3	
GW 572016	VEGF121-ジフテリア毒素複合体	
HER-2/neu標的化	EGF標的化	
PKI-166 (EGFRも阻害する)	DAB389EGF (ジフテリア毒素複合体)	
TAK165	FGF標的化	
GE-572016 (EGFRを阻害する)	インターフェロン- α (FGF産生を抑える)	20
CI-1033 (pan erbB阻害剤)	受容体に対するモノクローナル抗体	
VEGFR標的化	EGFR標的化	
SU5416 (FLT3も標的化する)	IMC-C225 (セツキシマブ)	
ZD4190	ABX-EGF	
PTK787/ZK222584	Y10	
CGP 41251	MDX-447 (EMD 82633)	
CEP-5214	h-R3	
ZD6474 (RETも阻害する)	EMD 72000	
BIBF1000	HER-2/neu標的化	
VGA1102	ヘルセプチン (トラストマブ)	30
SU6668 (PDGFRおよびFGFRも阻害する)	MDX-H210	
PDGFR標的化	2C4 (ペルツズマブ)	
SU11248 (C-KIT、FLT-3も阻害する)	VEGFR標的化	
CGP-57148	IMC-1C11 (抗KDR抗体)	
三環式キノキサリン	抗Flt-1抗体 (MF1)	
(C-KITも標的化する)	遺伝子治療アプローチ	
FGFR標的化	EGFR標的化	
SU4984	アンチセンスオリゴヌクレオチド	
SU5406	VEGF/VEGFR標的化	
BCR-ABL標的化	アンチセンスオリゴヌクレオチド	40
STI571 (ギルベック) (C-KIT、PDGFRも標的化する)	アデノウイルスをベースにしたFlt-1	
NSC680410	遺伝子治療	
	レトロウイルスをベースにしたFlk-1	

【 0 0 2 2 】

【表 3 - 2】

C-KIT標的化	遺伝子治療	
PD166326 (BCR-ABLも標的化する)	レトロウイルスをベースにしたVHL	
PD1173952 (BCR-ABLも標的化する)	遺伝子治療	
	アンジオザイム	
	IGF-1R標的化	
	INX-4437 (アンチセンスオリゴヌクレオチド)	10
FLT3標的化	その他	
CT53518	APC8024 (HER-2過剰発現細胞に対するワクチン)	
GTP14564		
PKC412	AP22408 (Src SH2ドメイン阻害剤)	
Src標的化	B43-ゲニステイン複合体	
PP1 (C-KIT、BCR-ABLも阻害する)	AG538 (IGF-1R阻害剤)	
PD116285		20
CGP77675		
CGP 76030		
TRK標的化		
CEP-701 (Flt3も阻害する)		
CEP2583		

【0023】

ATP結合部位は、チロシンキナーゼの中で高く保存されているが、キナーゼドメイン構造における小さな違いが選択性の高い阻害剤の開発を可能にしている(Levitzi A. Eur. J. Cancer 38 Suppl. 5 (2002), pp. S11~S18) 30

。阻害剤OSI-774 (Tarceva (商標))と一緒に結晶化したEGFRに関するデータが最近発表され、この化合物の作用機構に有益な知識がもたらされた(Stamos J. 他、J. Biol. Chem. 277 (2002), pp. 46265~46272)。臨床開発における最も小さい分子が、ATPのアデニン部分の結合を模倣するために骨格の一部を使用して、標的キナーゼのATP結合部位の近辺に結合する。このようなATP模倣体は、触媒ドメイン内の基質結合部位の競合的阻害剤であり(Laird A.D. 他、Expert Opin. Invest. Drugs 12 (2003), pp. 51~64およびFry D.W. Exp. Cell Res. 284 (2003), pp. 131~139)、(しばしば細胞中にミリモルレベルで存在する)内在性ATPと競合して結合する。早期の潜在的リード化合物は溶解性が低く、最適な標的阻害を必要とする患者において適切な血漿 40

レベルを実現し維持するためには、継続して複数回投与する計画が必要であった。溶解性を高めるため、新たな化合物が製造されたが、キナーゼドメインに対する親和性は減少した。これらの問題を回避するために、キナーゼドメインに選択的阻害剤を共有結合させて、触媒活性が完全に消失した効力のある薬剤に変換することを期待して、不可逆的な阻害剤を現在開発中である(Denny W.A. 他、Pharmacol. Ther. 93 (2002), pp. 253~261)。このような阻害剤2種が開発の実用段階にある(CI-1033) (Pfizer) およびEKB-569 (Wyeth) で、それぞれEGFRおよびHER-2に不可逆的に結合する(Laird A.D. 他、Expert Opin. Invest. Drugs 12 (2003), pp. 51~64)。複数のチロシンキナーゼを標的とする小分子も開発されており、これらは複数の経路を遮断し、増強された抗癌作用を生 50

じる潜在力を備えている(表3)。PKI-166は、EGFRを阻害し、HER-2(Mellin ghoff I.K.他、Cancer Res.62(2002)、pp.5254~5259CI-1033)は汎用ErbB阻害剤であり(Slichenmyer, W. J.他、Semin.Oncol.28(2001)、pp.80~85)、SU6668はVEGFR、PDGFRおよびFGFRを阻害し(Hoekman K.他、7 Cancer J. Suppl.3(2001)、pp.S134~S13、STI571はBCR-ABL、C-KIT、PDGFRおよびARGを阻害する(Buchdunger, E.他、Eur.J.Cancer 38 Suppl.5(2002)、pp.S28~S36、およびNishimura N.他、Oncogene 22(2003)、pp.4074-4082。【0024】

10

1980年代、最初の天然チロシンキナーゼ阻害剤ケルセチンおよびゲニステインが報告された(Akiyama T.他、J.Biol.Chem.262(1987)、pp.5592~5595およびJ. Mendelsohn J.J.Clin.Oncol.20(2002)、pp.1S~13S)。

【0025】

それ以来、数え切れないほど多くの天然および合成の小分子阻害剤が報告されてきた。チロシンキナーゼ阻害剤は、天然産物および関連誘導体(ケルセチン、ゲニステイン、スタウロスポリン、エルバスタチン、クラビラクトン)、キナゾリン、ピリドピリミジンおよび関連複素環(例えばZD1839)、フェニルアミノピリミジン(例えばSTI571)、チロホスチンおよび類似体(例えば、SU1498、SU101、SU0020)、インドールおよびオキシインドール(例えばSU5416、SU6668、SU5402、F.A.AI-ObeidiおよびK.S.Lam、Oncogene 19(2000)、pp.5690~5701)に大きく分類することができる。

20

【0026】

小分子キナーゼ阻害剤の開発における主な問題の1つは、特異性である(McMahon他、(1998)Curr.Op.in Drug Discovery and Dev.1(2)、131~146)。ほとんどの化合物は最近、キナーゼの保存性の高いATP結合部位を標的としているので、その種の複数の酵素に結合し、阻害する傾向がある。500種を超えるヒトタンパク質キナーゼがあり(Manning他、Science(2002)298、1912)、複数のキナーゼ(または「間違っ」キナーゼ)の阻害が副作用を引き起こすので、化合物の特異性を評価することは非常に重要である。しかし、ほとんどの「標的外」相互作用は予測不可能で、従来の実験によるキナーゼ活性測定法の開発は非常に時間と資源を消費することが問題であった。結果的に、化合物特異性を評価することが非常に重要であるにもかかわらず、総合的かつ系統的に実施することは、不可能でないにしても極めて困難である。タンパク質キナーゼは、真核細胞のほとんどの細胞シグナル伝達経路の鍵となる調節因子である。多くのタンパク質キナーゼ阻害剤が開発され、シグナル伝達経路における、および有望な治療薬としてのキナーゼの特異的機能が研究されてきた(Cohen, P.(2002)Nat.Rev.Drug Discov.1、309~315)。タンパク質キナーゼスーパーファミリーが大きいこと(ヒトで500超)、およびほとんどのキナーゼ阻害剤が保存性の高いATP結合ポケットに結合するという事実から、キナーゼ阻害剤は複数の標的を阻害することが広く受け入れられている(Davies, S.P., Reddy, H., Cai v ano, M. & Cohen, P.(2000)Biochem.J.351、95~105)。結果として、理解が不十分であることが多いシグナル伝達経路におけるキナーゼの役割を調べる化学的手段として使用された阻害剤は、裏を返せば、特異性の特徴づけが不完全である。同様のことがキナーゼ活性化因子にも当てはまる。本発明はまた、1腔中の複数のキナーゼのキナーゼ活性化因子を並行してプロファイルするためには有用である。

30

40

【0027】

発明の最良の実施形態

上記の問題は、(1腔において100個までの)非常に多数のヒトキナーゼに対する多く

50

の化合物の試験を可能にする測定様式によって解決される。この測定は、特異性の効率的、定量的、総合的および体系的な評価を可能にする。少数のキナーゼのみに対する試験に基づいて化合物特異性を全体的に推定することはもはや必要ない。特異性のプロファイリングは、薬剤開発プロセスの早期および開発方針全体に沿って組み入れることができ、特異性は、体系的かつ迅速に、より多くの化合物について評価することができる。このこれまでにない能力によって、医化学と分子試験との間の緊密なフィードバックが可能になる。効力および特異性は並行して最適化することができ、はるかに少ない時間で品質のより高い前臨床候補をもたらすことができる。

【0028】

既存の後期候補または薬剤の特異性を総合的に評価することによって、これらの確認済み化合物の今までに知られていない標的も明らかにすることができる。新規標的を同定することによって、新たな徴候を示唆することができる場合があり、公知の、主要な標的では説明できなかった副作用の原因も明らかにすることができる場合もある。

【0029】

本発明の対象は、小分子キナーゼ阻害剤または活性化剤の開発において、主な障害の1つである特異性プロファイリング先への新たな取り組みであり、重要な種類の新薬の開発に重大な影響を及ぼすことが期待される。

【0030】

本発明の対象は、チロシンキナーゼの自己リン酸化を検出するサンドイッチ-ELISA (酵素結合免疫吸着測定法) 技術と細胞溶解物などのタンパク質混合物中の特定のタンパク質を同定する Lumine x (商標)-xMAP 検出システムとを組み合わせた測定法である。この測定法によって、例えば、1腔中の細胞溶解物の様々なキナーゼ100種までについて、潜在的キナーゼ阻害剤の存在下でのRTKまたはNTKの自己リン酸化の有無の検出が可能となる。この測定様式によって、抗ホスホチロシン抗体で1腔におけるリン酸化状態を検出することによって、100個までの異なるチロシンキナーゼについて、潜在的キナーゼ阻害剤をプロファイリングすることが可能となる。例えば、この測定法によって、ウェル当たり100種までのキナーゼに対して、1HTSの96種の異なる潜在的キナーゼ阻害剤について、96ウェルプレートにおけるサンドイッチ-ELISAでプロファイリングを実施することが可能である。関心のあるチロシンキナーゼ受容体の活性化(すなわち、自己リン酸化)を測定する測定法は、EP0730740に記載されており、以下のステップを含む。

【0031】

a) 細胞培養物または動物材料からの実質的に均一な細胞が第1の固相に接着するように、第1の固相をその細胞集団でコーティングする。この細胞は、内因性チロシンキナーゼを有するか、またはチロシンキナーゼをコードしているDNAで形質転換されており、このDNAは、チロシンキナーゼ構築物が細胞膜または細胞の細胞質ゾルに存在するように発現した。b) 次に、チロシンキナーゼがリガンドに曝露するように、リガンドを前記接着細胞を有する固相に添加する。c) リガンドに曝露した後、接着細胞を可溶化し、それによって細胞溶解物を放出させる。d) 第2の固相を、特異的抗体として、チロシンキナーゼか、または受容体構築物の場合はポリペプチドエピトープタグに特異的に結合する捕捉因子でコーティングする。e) ウェルにチロシンキナーゼを捕捉するために、ステップc) で得られた細胞溶解物を、接着捕捉因子を含有するウェルに添加する。f) 次に、未結合の細胞溶解物を除去し、捕捉されたチロシンキナーゼを遊離するために、洗浄ステップを実施する。g) 捕捉されたチロシンキナーゼ構築物を、チロシンキナーゼ中のリン酸化残基を同定する標識化抗ホスホチロシン抗体に曝露する。h) 捕捉されたチロシンキナーゼに対する抗ホスホチロシン抗体の結合を測定する。1個のウェル中で100種までのチロシンキナーゼの自己リン酸化状態の並行検出を可能にする本発明で使用した捕捉因子は、Lumine x (商標)-xMap technologyから入手した。この捕捉因子は、結合タンパク質でコーティングしたビーズまたは小球体であることができる。結合したタンパク質は、最も一般的にはタンパク質またはポリヌクレオチドなどの生体分子

10

20

30

40

50

である。この生体分子は、場合によって天然に生じる、組換え、または合成された生体分子であってよい。抗体または抗体断片は、タンパク質—捕捉因子として非常に適している。結合タンパク質はまた、アプタマーまたはアンチカリンまたはその他の任意の結合分子であることができる。Luminox(商標)—xMap技術は、2種類の蛍光色素の比によって特徴づけられた色素を互いに備えた100種の異なるビーズまたは小球体を生成するために、2種類の蛍光色素の正確な比を使用する証明済み多重基盤である。各群は、2種類の異なる色素の内部蛍光色素比に基づいて区別され、したがって、特異的抗体または特定のチロシンキナーゼに対するモノクローナル抗体のような特有の生物学的試薬に結合することができる。ビーズまたは小球体表面に結合した抗体は、既に記載したサンドイッチELISA試験において、捕捉試薬として役立つ。異なるキナーゼに特異的なそれぞれの抗体は、各特異的抗体—小球体複合体について異なる色を生じる様々な蛍光色素比でビーズ表面に結合した。この蛍光色は、限定されたキナーゼの特定のエピトープを認識して結合する特異的抗体の抗原として役立つ特定のキナーゼに割り当てることができる。

10

【0032】

リン酸化チロシンを認識するリン酸特異的抗体は一般的に、チロシンキナーゼの自己リン酸化の測定のために使用された。リン酸特異的抗体はビオチン化され、小球体の蛍光色素から区別することができるストレプトアビジン結合2次蛍光標識(例えば、フィコエリトリン)によって検出することができる。

【0033】

リン酸特異的抗体は、広く市販されており(例えば、Cell Signaling Technology, Inc.; BioSource, Inc.; Santa Cruz; Biotechnology, Inc.; Upstate Biotechnology, Inc.から入手できる)、当業界の周知の技術によって生成することもできる。

20

【0034】

各捕捉キナーゼの自己リン酸化は、特有の蛍光色素で色づけされた小球体のすべておよびビオチン化抗リン酸化チロシン抗体に結合したストレプトアビジン結合蛍光マーカールを検出することができる装置によって分析される。これらの装置は、当業界では周知である。Luminox(商標)装置は様々な蛍光リポーターシグナルを検出する。Luminox(商標)装置では、ビーズは2本のレーザービームを迅速に通過し、そこで高速デジタルシグナル処理装置が2種類の蛍光シグナル(小球体のシグナルおよび抗リン酸化チロシン抗体のシグナル)または1種類の蛍光シグナル(小球体のシグナルのみ)を有するビーズ間を区別する。自己リン酸化現象の場合、リン酸特異的抗体は、特定のビーズに結合した特異的抗体によって捕捉されたリン酸化キナーゼに結合することができ、2種類の蛍光シグナルを検出することができる。自己リン酸化現象がない場合、小球体シグナルのみをレーザーによって検出することができる。

30

【0035】

自己リン酸化を遮断する添加された特定のキナーゼ阻害剤によって阻害された試験細胞溶解物中のキナーゼはすべて小球体シグナルのみを示し、試験したキナーゼ阻害剤によって阻害されるチロシンキナーゼとして認識することができる。試験したキナーゼ阻害剤は、両方のシグナルを示すキナーゼは阻害しない。キナーゼ阻害剤を含まない同一の対照細胞溶解物では、試験溶解物中で1種類のシグナルのみを示すキナーゼは両方のシグナル(小球体のシグナルおよび抗リン酸化チロシン抗体のシグナル)を示す。これらのキナーゼは、細胞溶解物中のキナーゼ群であり、試験した特定の阻害剤によって阻害される。

40

【0036】

細胞中のキナーゼの活性化は、組織培養研究室で広く使用されている周知の技術である。牛胎児血清またはその他の血清を除去すると細胞は飢餓状態になる。飢餓の後、牛胎児血清(FCS)またはその他の血清を加えることによってキナーゼの活性化を誘導する。この活性化はまた、増殖因子およびサイトカイン、例えば、EGF、VEGF、PDGF、HGF、TGF、NGF、FGF、インシュリン、様々なインターロイキンおよびインターフェロンによって誘導することができる。この増殖因子およびサイトカインは、複数の

50

キナーゼを誘導するために、カクテルとして適用しなければならない。活性化によって、様々なキナーゼの自己リン酸化が生じる。

【0037】

本発明の他の態様では、これらのキナーゼを小球体に直接結合させる。これらの結合は、グルタチオンによってコーティングされたときはグルタチオン-S-トランスフェラーゼのような融合タンパク質によって、または6×ヒスチジンタグでコーティングされた場合は抗ヒスチジン抗体によって実現することができる。結合後、ATPの存在下でキナーゼ自己リン酸化反応が生じる。

【0038】

本発明の主要な実施形態は、キナーゼ阻害剤の存在下での前記キナーゼ阻害剤の非存在下と比較した1種または複数のチロシンキナーゼの自己リン酸化の測定方法であって、この方法は、

- (a) 血清除去によって細胞を飢餓状態にするステップと、
- (b) キナーゼ阻害剤の存在下または非存在下で、血清、増殖因子および／またはサイトカインを添加することによってキナーゼ自己リン酸化活性を誘導するステップと、
- (c) 細胞を可溶化して、それによって細胞から細胞溶解物を遊離させるステップと、
- (d) 様々なチロシンキナーゼ特異的結合タンパク質を添加することによって、細胞溶解物中のキナーゼを捕捉するステップであって、様々な結合タンパク質それぞれが特有の色素と結合しているステップと、
- (e) d) の特有の色素のいずれかから区別できるマーカーでタグ付けしたリン酸化チロシン特異的抗体を添加するステップと、
- (f) d) の特有の色素およびe) のリン酸化チロシン特異的抗体のマーカーを有する自己リン酸化チロシンキナーゼを同定するステップと、
- (g) キナーゼ阻害剤の存在下での誘導から生じたf) の自己リン酸化チロシンキナーゼと前記キナーゼ阻害剤の非存在下での誘導を比較するステップとを含む。

【0039】

それらの変法は、キナーゼ阻害剤の存在下での前記キナーゼ阻害剤の非存在下と比較した1種または複数のチロシンキナーゼの自己リン酸化の測定方法であって、この方法は、

- (a) 限定されたチロシンキナーゼを特有の色素に結合するステップと、
- (b) キナーゼ阻害剤の存在下または非存在下で、キナーゼ反応をするステップと、
- (c) a) の特有の色素のいずれかから区別できるマーカーにタグ付けしたリン酸化チロシン特異的抗体を添加するステップと、
- (d) a) の特有の色素およびc) のリン酸化チロシン特異的抗体のマーカーを有する自己リン酸化チロシンキナーゼを同定するステップと、
- (e) キナーゼ阻害剤の存在下での誘導から生じたd) の自己リン酸化チロシンキナーゼと前記キナーゼ阻害剤の非存在下での誘導を比較するステップとを含む。

【0040】

使用した色素は好ましいが、蛍光色素またはルミネセンス色素に限定はしない。

【0041】

本発明の他の実施形態では、細胞飢餓の前に、細胞中でリン酸化を誘導することができるタンパク質のポリペプチドをコードする核酸で形質転換する。

【0042】

この細胞は、真核細胞であることができ、好ましい実施形態では、この細胞は哺乳類細胞である。

【0043】

本発明の他の実施形態は、並行して1から100個の異なるキナーゼの自己リン酸化を測定するために、捕捉抗体が特異的に結合できるエピトープを有する限定されたチロシンキナーゼに特異的に結合する1個の異なる捕捉抗チロシンキナーゼ抗体とそれぞれ結合した1から100個の特有の色素を含有する組成物である。

【0044】

10

20

30

40

50

並行して1から100個の異なるキナーゼの自己リン酸化を測定するための特有の色素の数は、1と100との間であることができる。

【0045】

並行して測定できるキナーゼの好ましい数は、1から20、1から40、1から60および1から80個の間のキナーゼである。

【0046】

本発明の他の実施形態は、キナーゼ阻害剤の特異性をプロファイリングする前述の方法で使用するためのキットであって、

(a) 捕捉抗体が特異的に結合できるエピトープを有する限定されたチロシンキナーゼに特異的に結合する異なる捕捉抗チロシンキナーゼ抗体と結合した1から100個の特有の色素の組成物、および

10

(b) a)の色素から区別可能な色素で標識された抗リン酸化チロシン抗体を含むキットである。

【0047】

この方法、キットおよび組成物は、キナーゼ阻害剤の非存在下で1から100個の異なるキナーゼの自己リン酸化の並行測定と比較した、キナーゼ阻害剤の存在下での1から100個の異なるキナーゼの自己リン酸化の並行測定による、潜在的キナーゼ阻害剤それぞれの特異性プロファイリングに使用できる。Luminox(商標)装置は、自己リン酸化の測定のために使用できる。キナーゼ阻害剤は、キナーゼ阻害剤の非存在下でのみ自己リン酸化を示すキナーゼを阻害できる。この方法は、マイクロタイタープレートで実施できる。

20

【0048】

本発明の方法の他の使用は、腫瘍標本中の様々なキナーゼの自己リン酸化状態のプロファイリングである。様々なキナーゼの活性状態は、患者を治療するための診断および適切な治療方法に影響を与える手がかりとなる(Espina V.他、(2005)Cancer Invest、23(1)、pp.36~46)。この特定の場合、分析すべき試料は、タンパク質上清または腫瘍標本の溶解物(生検またはレーザー捕獲顕微解剖試料)、血液試料または動物材料である。分析は、キナーゼ阻害剤の非存在下で前述のように実施することができる。

【0049】

30

図面の説明

図1は、4種の独立した実験(A:EGFR-リン酸化、B:FAK-リン酸化、C:IGFR1-リン酸化およびD:Met-リン酸化)の結果を示す。自己リン酸化は、平均蛍光強度(MFI)を測定することによって検出した。縦棒は、以下の実験設定のMFI率を示す(淡灰色は、1腔中の蛍光色素小球体と結合した多数の捕捉抗体の設定であり、濃灰色は、1腔中の蛍光色素小球体と結合した1個の捕捉抗体の設定である)。

【0050】

縦棒A1(MFI=53)

蛍光色素小球体と結合したEGFRの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したIGFRの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したFAKの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したMetの捕捉抗体、

EGFキナーゼ阻害剤および

EGF。

40

【0051】

縦棒A2(MFI=17)

蛍光色素小球体と結合したEGFRの捕捉抗体、

EGFキナーゼ阻害剤および

EGF。

【0052】

50

縦棒 A 3 (M F I = 2 1 1 9)

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した I G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体および
E G F

縦棒 A 4 (M F I = 2 2 1 3)

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体および E G F。

【0053】

縦棒 B 1 (M F I = 3 9)

10

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した I G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体、
F A K キナーゼ阻害剤および
F C S。

【0054】

縦棒 B 2 (M F I = 3 7)

蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
F A K キナーゼ阻害剤および
F C S。

20

【0055】

縦棒 B 3 (M F I = 1 1 4 3)

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した I G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体および F C S、
縦棒 B 4 (M F I = 9 5 7)

蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体および F C S。

30

【0056】

縦棒 C 1 (M F I = 3)

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した I G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体、
I G F R - 1 キナーゼ阻害剤および
I G F。

【0057】

縦棒 C 2 (M F I = 3)

蛍光色素小球体と結合した I G F R 1 の捕捉抗体、
I G F R 1 キナーゼ阻害剤および
I G F。

40

【0058】

縦棒 C 3 (M F I = 6 7 3)

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した I G F R の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体および I G F

縦棒 C 4 (M F I = 5 2 9)

蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体および I G F。

50

【0059】

縦棒D1 (MFI = 9)

蛍光色素小球体と結合したEGFRの捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合したIGFRの捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合したFAKの捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合したMetの捕捉抗体、
 Metキナーゼ阻害剤および
 HGF。

【0060】

縦棒D2 (MFI = 9)

蛍光色素小球体と結合したMetの捕捉抗体、
 Metキナーゼ阻害剤および
 HGF。

10

【0061】

縦棒D3 (MFI = 817)

蛍光色素小球体と結合したEGFRの捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合したIGFRの捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合したFAKの捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合したMetの捕捉抗体およびHGF

縦棒D4 (MFI = 675)

蛍光色素小球体と結合したMetの捕捉抗体およびHGF。

20

【0062】

図2

A部

陽性対照の%で表したEGFR (—◆—)、FAK (—■—)、IGFR1 (—▲—)
 およびMet (—●—)の自己リン酸化の測定 (100% = EGFR阻害剤の非存在下で
 のEGF活性化に対するEGFRの自己リン酸化)

濃度を増加させたEGFR阻害剤の存在下でのEGF、IGFおよびHGFとの共刺激
 (図の通り)。

【0063】

B部

陽性対照の%で表したEGFR (—◆—)、FAK (—■—)、IGFR1 (—▲—)
 およびMet (—●—)の自己リン酸化の測定 (100% = IGFR1阻害剤の非存在下
 でのIGF活性化に対するIGFR1の自己リン酸化)

濃度を増加させたIGFR1阻害剤の存在下でのEGF、IGFおよびHGFとの共刺
 激 (図の通り)。

30

【0064】

C部

陽性対照の%で表したEGFR (—◆—)、FAK (—■—)、IGFR1 (—▲—)
 およびMet (—●—)の自己リン酸化の測定 (100% = Met阻害剤の非存在下での
 HGF活性化に対するMetの自己リン酸化)

濃度を増加させたMet阻害剤の存在下でのEGF、IGFおよびHGFとの共刺激 (図の通り)。

40

【0065】

図3

A部

PTK787キナーゼ阻害剤濃度を増加させたときの、陽性対照の%で表した、蛍光色素小球体と結合したFGFR1 (1)、FGFR2 (2)、FGFR3 (3)、IGFR1 (4)、Met (5)、CSF1R (6) 触媒ドメインの自己リン酸化の測定 (100% = キナーゼ阻害剤の非存在下での (DMSOのみ) 自己リン酸化)。

50

【0066】

B部

PTK787キナーゼ阻害剤濃度を増加させたときの、陽性対照の%で表した、蛍光色素小球体と結合したInsR(1)、VEGFR1(2)、FGFR4(3)、PDGFRα(4)、PDGFRβ(5)、Fak(6)、Tyk(7)、EGFR(8)触媒ドメインの自己リン酸化の測定(100%=キナーゼ阻害剤なしでの(DMSOのみ)自己リン酸化)。

【0067】

C部

PTK787キナーゼ阻害剤濃度を増加させたときの、陽性対照の%で表した、蛍光色素小球体と結合したTie2(1)、NTRK(2)、Ax1(3)、VEGFR2(4)、Tek(5)、Ros1(6)触媒ドメインの自己リン酸化の測定(100%=キナーゼ阻害剤なしでの(DMSOのみ)自己リン酸化)。

10

【0068】

実施例

実施例1

細胞培養、阻害剤処理および細胞溶解物

ヒト腫瘍細胞系HT29(結腸癌)は、ATCCから入手し、牛胎児血清10%を含有するダルベッコ変法イーグル培地中で、37℃、5%CO₂で維持した。阻害剤処理の16から20時間前に、牛胎児血清を含まない培地中でHT29細胞を飢餓状態にした。細胞をキナーゼ阻害剤(EGFR阻害剤、FAK阻害剤、IGFR1阻害剤またはMet阻害剤)30μMと共に、または陽性対照としてキナーゼ阻害剤を含まない培地中で45分間インキュベートした。

20

【0069】

キナーゼ阻害剤は、EGFRでは(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-[7-メトキシ-6-(3-モルホリン-4-イルプロポキシ)-キナゾリン-4-イル]-アミン(イレッサ)、Metでは5-(2,6-ジクロロフェニルメタンスルホニル)-3-[1-[3,5-ジメチル-4-((R)-2-ピロリジン-1-イルメチル-ピロリジン-1-カルボニル)-1H-ピロール-2-イル]-メス-(Z)-イリデン]-1,3-ジヒドロインドール-2-オン(PHA665752、Christensen他(2003)Cancer Res.(63)、pp.7345~7355)ならびにFAKおよびIGFR1ではN⁴-キノリン-3-イル-N²-(3,4,5-トリメトキシフェニル)-ピリミジン-2,4-ジアミンである。

30

【0070】

キナーゼの活性化は、Metキナーゼでは対応するリガンドEGF、IGF、HGF、またはFAKキナーゼでは牛胎児血清100ng/mlによって、10から15分間惹起した。細胞を氷冷TBSで洗浄し、グリセロール10%、ホスファターゼ阻害剤カクテルI(Sigma)1%、ホスファターゼ阻害剤カクテルII(Sigma)1%、プロテアーゼ阻害剤カクテルIII(Calbiochem)0.1%、ベンズナーゼ(Novagen)0.01%を補給した20mM Tris-HCl pH8.0、NaCl 150mMに溶かした1%NP40で、氷上で20分間溶解した。

40

【0071】

Luminex(商標)ビーズアッセイ

Luminex小球体2.5×10⁶個を製造者によって記載された通りに抗体50μg/mlと結合させた(EGFR、IGFR、METおよびFakの捕捉抗体は、R&D Systems and Upstateから入手した)。ウェル当たり抗体結合小球体1000個をアッセイ緩衝液(ブロック試薬、Roche、Tween20 1%)に溶かしたHT29細胞溶解物と4℃で一晩攪拌しながらインキュベートした。アッセイ緩衝液で洗浄ステップを3回行った後、リン酸化チロシン残基をビオチン化抗リン酸化チロシン抗体(室温で1時間攪拌、Santa Cruz Biotechnology)およびフ

50

ィコエリトリン結合ストレプトアビジン(室温で45分間攪拌、D i a n o v a)で検出した。小球体は、L u m i n e x (商標)100機器で製造者によって記載された通りに分析した。

【0072】

適切なキナーゼ阻害剤を含んで、または含まないで、1回の実験または並行実験で自己リン酸化の測定を試験するために、以下の設定を試験した(図1も参照)。

【0073】

A 1

蛍光色素小球体と結合したE G F Rの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したI G F Rの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したF A Kの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したM e tの捕捉抗体、

E G Fーキナーゼ阻害剤および

E G F。

10

【0074】

A 2

蛍光色素小球体と結合したE G F Rの捕捉抗体、

E G Fキナーゼ阻害剤および

E G F。

【0075】

A 3

蛍光色素小球体と結合したE G F Rの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したI G F Rの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したF A Kの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したM e tの捕捉抗体および

E G F

A 4

蛍光色素小球体と結合したE G F Rの捕捉抗体および

E G F。

20

【0076】

B 1

蛍光色素小球体と結合したE G F Rの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したI G F Rの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したF A Kの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したM e tの捕捉抗体、

F A Kーキナーゼ阻害剤および

F C S。

30

【0077】

B 2

蛍光色素小球体と結合したF A Kの捕捉抗体、

F A Kーキナーゼ阻害剤および

F C S。

40

【0078】

B 3

蛍光色素小球体と結合したE G F Rの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したI G F Rの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したF A Kの捕捉抗体、

蛍光色素小球体と結合したM e tの捕捉抗体およびF C S

B 4

蛍光色素小球体と結合したF A Kの捕捉抗体およびF C S。

50

【0079】

C 1

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した I G F R の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体、
 I G F R 1 - キナーゼ阻害剤および
 I G F。

【0080】

C 2

蛍光色素小球体と結合した I G F R 1 の捕捉抗体、
 I G F R 1 - キナーゼ阻害剤および
 I G F。

10

【0081】

C 3

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した I G F R の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体および I G F

C 4

蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体および I G F。

20

【0082】

D 1

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した I G F R の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体、
 M e t - キナーゼ阻害剤および
 H G F。

【0083】

D 2

蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体、
 M e t - キナーゼ阻害剤および
 H G F。

30

【0084】

D 3

蛍光色素小球体と結合した E G F R の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した I G F R の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した F A K の捕捉抗体、
 蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体および H G F

D 4

蛍光色素小球体と結合した M e t の捕捉抗体および H G F。

40

【0085】

実施例 2

細胞培養、阻害剤処理および細胞溶解物

ヒト腫瘍細胞系 H T 2 9 (結腸癌)は、A T C C から入手し、牛胎児血清 1 0 % を含有するダルベッコ変法イーグル培地中で、3 7 °C、5 % C O₂ で維持した。阻害剤処理の 1 6 から 2 0 時間前に、牛胎児血清を含まない培地中で H T 2 9 細胞を飢餓状態にした。細胞を様々な濃度のキナーゼ阻害剤 (0 . 0 1 μ M、0 . 0 3 μ M、0 . 1 μ M、0 . 3 μ M、1 . 0 μ M、3 μ M、1 0 μ M、3 0 μ M、E G F R - 阻害剤 [図 2 A]、I G F R 1 -

50

阻害剤[図2B]およびMet-阻害剤[図2C])と共に45分間インキュベートした。キナーゼ阻害剤を含まないDMSOの陽性対照を参照キナーゼ活性(100%)として使用する。

【0086】

キナーゼ阻害剤は、EGFRでは(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-[7-メトキシ-6-(3-モルホリン-4-イルプロポキシ)-キナゾリン-4-イル]-アミン(イレッサ)、Metでは5-(2,6-ジクロロフェニルメタンスルホニル)-3-[1-[3,5-ジメチル-4-((R)-2-ピロリジン-1-イルメチル-ピロリジン-1-カルボニル)-1H-ピロール-2-イル]-メス-(Z)-イリデン]-1,3-ジヒドロインドール-2-オン(PHA665752、Christensen他(2003)Cancer Res.(63)、pp.7345~7355)およびIGFR1ではN⁴-キノリン-3-イル-N²-(3,4,5-トリメトキシフェニル)-ピリミジン-2,4-ジアミンである。

10

【0087】

キナーゼの活性化は、MetキナーゼではEGF、IGF、HGF100ng/mlによって、10から15分間惹起した。細胞を氷冷TBSで洗浄し、グリセロール10%、ホスファターゼ阻害剤カクテルI(Sigma)1%、ホスファターゼ阻害剤カクテルII(Sigma)1%、プロテアーゼ阻害剤カクテルIII(Calbiochem)0.1%、ベンゾナーゼ(Novagen)0.01%を補給した20mM Tris-HCl pH 8.0、NaCl 150mMに溶かした1%NP40で、氷上で20分間溶解した。

20

【0088】

Luminox(商標)ビーズアッセイ

Luminox小球体2.5×10⁶個を製造者によって記載された通りに抗体50μg/mlに結合させた(EGFR、IGFR、MetおよびFakの捕捉抗体は、R&D-Systems and Upstateから入手した)。ウェル当たり抗体結合小球体1000個をアッセイ緩衝液(ブロック試薬、Roche、Tween20 1%)に溶かしたHT29細胞溶解物と共に4℃で一晩攪拌しながらインキュベートした。アッセイ緩衝液で洗浄ステップを3回行った後、リン酸化チロシン残基をビオチン化抗リン酸化チロシン抗体(室温で1時間攪拌、Santa Cruz Biotechnology)およびフィコエリトリン結合ストレプトアビジン(室温で45分間攪拌、Dianova)で検出した。小球体は、Luminox(商標)100機器で製造者によって記載された通りに分析した。

30

【0089】

実施例3

構築物、細胞培養および細胞溶解物

InsR、VEGFR1、FGFR4、PDGFRA、PDGFRB、Fak、Tyk、EGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、IGF1R、Met、CSF1R、Tie2、NTKRK1、Ax1、VEGFR2、Tek、Ros1チロシンキナーゼの触媒ドメインを、N末端6×His親和性タグおよびSタグと共に発現させるため、ベクターpLEX1(Novagen)にサブクローニングした。Hi5昆虫細胞(BTI-TN-5B1~4、Invitrogen)を、グルタミン18mM、ペニシリン50U/mlおよびストレプトマイシン50μg/mlを含むExpress Five SFM培地(Invitrogen)中で27℃で維持した。製造者によって記載された通りに、Hi5昆虫細胞1×10⁶個をDNA2μgおよびGene Juice形質移入試薬(Novagen)10μlで一時的に形質移入した。48時間後の形質移入細胞を氷冷TBSで洗浄し、ホスファターゼ阻害剤カクテルI(Sigma)1%、ホスファターゼ阻害剤カクテルII(Sigma)1%、プロテアーゼ阻害剤カクテルIII(Calbiochem)0.1%、ベンゾナーゼ(Novagen)0.01%を補給した20mM Tris-HCl pH 8.0、NaCl 150mMに溶かした1%NP40で氷上で15分間溶解した。溶解物を33600×gで45分間遠心した。上清をすぐに使用するか、またはグ

40

50

リセロール 30 % で衝撃冷凍した。

【0090】

Lum i n e x ビーズアッセイ

製造者によって記載された通りに、N i - N T A - L u m i n e x 小球体 (Q i a g e n) 0.5 μ l を組換えタンパク質を発現させた細胞溶解物と 4℃ で 60 分間結合させた。特定のキナーゼの触媒ドメインそれぞれを特定の区別可能な小球体に結合させた。キナーゼ自己リン酸化反応は、測定用緩衝液 (B S A 0.1 % および B r i j 3 5 0.03 % を補給した M O P S 20 mM、 β -グリセロリン酸 25 mM、E G T A 5 mM、D T T 1 mM、バナジン酸ナトリウム 1 mM、pH 7.2) に溶かした A T P 5 μ M および M g C l₂ 40 mM で 37℃ で 30 分間攪拌して開始した。キナーゼ自己リン酸化反応は、キナーゼ阻害剤 (P T K 7 8 7) 10 μ M、3 μ M、1 μ M、0.3 μ M、0.1 μ M、0.03 μ M の存在下で、または陽性対照としてキナーゼ阻害剤の非存在下 (D M S O のみ) で実施した。キナーゼ反応は、E D T A 150 mM で停止した。検出緩衝液 (P B S に溶かした B S A 1 %、B r i j 3 5 0.03 %) で洗浄ステップを 3 回行った後、リン酸化チロシン残基をビオチン化抗リン酸化チロシン抗体 (室温で 1 時間攪拌、S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) およびフィコエリトリン結合ストレプトアビジン (室温で 45 分間攪拌、D i a n o v a) で検出した。小球体は、L u m i n e x¹⁰⁰ 機器で製造者によって記載された通りに分析した。

10

【0091】

1 腔内で P T K 阻害剤の存在下での並行実験で自己リン酸化の測定を試験するために、以下の設定を試験した (図 3 も参照)。

20

【0092】

A

- グラフ 1 : 蛍光色素小球体と結合した F G F R 1 (触媒ドメイン)
- グラフ 2 : 蛍光色素小球体と結合した F G F R 2 (触媒ドメイン)
- グラフ 3 : 蛍光色素小球体と結合した F G F R 3 (触媒ドメイン)
- グラフ 4 : 蛍光色素小球体と結合した I G F 1 R (触媒ドメイン)
- グラフ 5 : 蛍光色素小球体と結合した M e t (触媒ドメイン)
- グラフ 6 : 蛍光色素小球体と結合した C S F 1 R (触媒ドメイン)。

【0093】

B

- グラフ 1 : 蛍光色素小球体と結合した I n s R (触媒ドメイン)
- グラフ 2 : 蛍光色素小球体と結合した V E G F R 1 (触媒ドメイン)
- グラフ 3 : 蛍光色素小球体と結合した F G F R 4 (触媒ドメイン)
- グラフ 4 : 蛍光色素小球体と結合した P D G F R A (触媒ドメイン)
- グラフ 5 : 蛍光色素小球体と結合した P D G F R B (触媒ドメイン)
- グラフ 6 : 蛍光色素小球体と結合した F a k (触媒ドメイン)
- グラフ 7 : 蛍光色素小球体と結合した T y k (触媒ドメイン)
- グラフ 8 : 蛍光色素小球体と結合した E G F R (触媒ドメイン)。

30

【0094】

C

- グラフ 1 : 蛍光色素小球体と結合した T i e 2 (触媒ドメイン)
- グラフ 2 : 蛍光色素小球体と結合した N T R K 1 (触媒ドメイン)
- グラフ 3 : 蛍光色素小球体と結合した A x 1 (触媒ドメイン)
- グラフ 4 : 蛍光色素小球体と結合した V E G F R 2 (触媒ドメイン)
- グラフ 5 : 蛍光色素小球体と結合した T e k (触媒ドメイン)
- グラフ 6 : 蛍光色素小球体と結合した R o s 1 (触媒ドメイン)。

40

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図 1】4 種の独立した実験 (A : E G F R - リン酸化、B : F A K - リン酸化、C : I

50

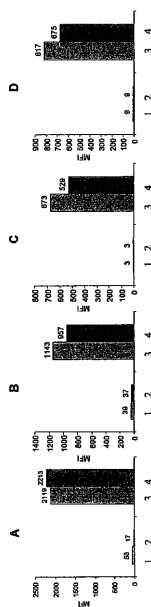
G F R 1ーリン酸化およびD : M e tーリン酸化)の結果を示すグラフである。

【図2】陽性対照の%で表したE G F R、F A K、I G F R 1およびM e tの自己リン酸化の測定を示す図である。

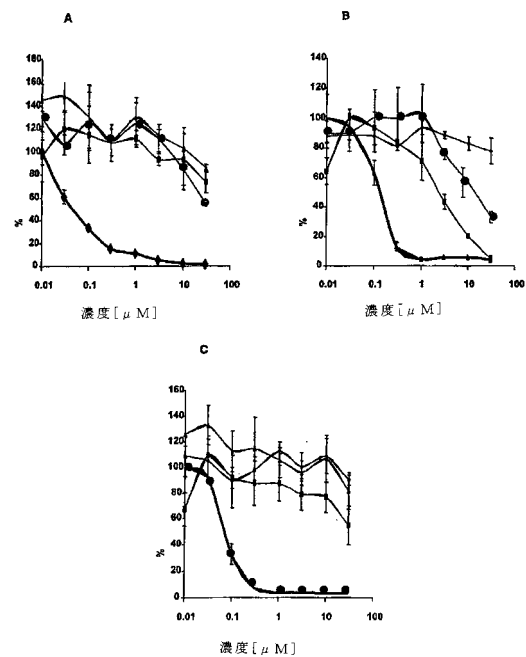
【図3】P T K 7 8 7キナーゼ阻害剤濃度を増加させたときの、陽性対照の%で表した、蛍光色素小球体と結合したF G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、I G F 1 R、M e t、C S F 1 R触媒ドメインの自己リン酸化の測定を示す図である。

【図1】

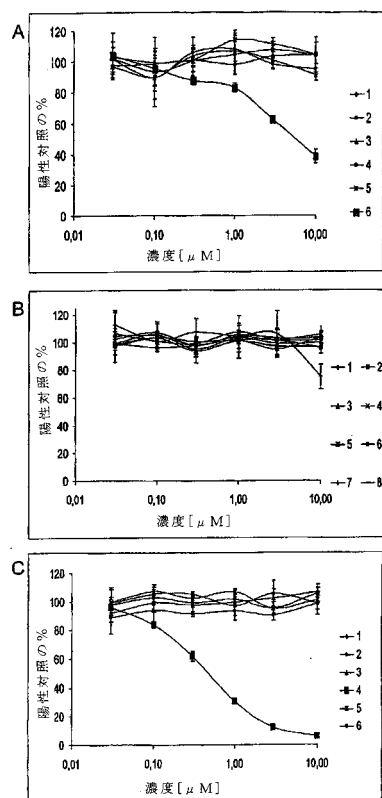
Figure 1



【図2】



【図 3】



フロントページの続き

(74)代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(74)代理人 100127454

弁理士 緒方 雅昭

(72)発明者 ヘンツラー、 タンヤ

ドイツ連邦共和国 6 9 1 9 8 シュリースハイム ガルテンシュトラーセ 1

(72)発明者 ホック、 ビエールン

ドイツ連邦共和国 6 3 4 7 7 マイントール フリードリヒエベルトーシュトラーセ 5 3

(72)発明者 ブラウカト、 アンドレー

ドイツ連邦共和国 6 4 3 6 7 ミュールタール アム クリンゲンタイヒ 1 7アー

(72)発明者 ホフマン、 ウヴェ

ドイツ連邦共和国 6 4 3 4 2 ゼーハイム-ユーゲンハイム ホホシュテッター シュトラーセ
5

審査官 小暮 道明

(56)参考文献 J. Pharmacol. Exp. Ther., 281[3](1997) p.1446-1456

Nature Methods, 2[3](Mar. 2005) p.225-232

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 /

C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)