

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-537291

(P2004-537291A)

(43) 公表日 平成16年12月16日(2004. 12. 16)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/45	A 6 1 P 25/18	4 B O 2 4
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 29/00	4 B O 5 0
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 43/00	1 O 5
A 6 1 P 43/00	C O 7 K 16/40	4 B O 6 3
		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-592480 (P2002-592480)	(71) 出願人	599133646
(86) (22) 出願日	平成14年5月23日 (2002. 5. 23)		セファロン・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月25日 (2003. 11. 25)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1938
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/016387		Oウエストチエスター・ブランデイワイン
(87) 国際公開番号	W02002/095017		パークウェイ145
(87) 国際公開日	平成14年11月28日 (2002. 11. 28)	(74) 代理人	100060782
(31) 優先権主張番号	60/293, 381		弁理士 小田島 平吉
(32) 優先日	平成13年5月24日 (2001. 5. 24)	(72) 発明者	エンジェルズ, テルマ・エス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1938
			Oウエストチエスター・グローブナーコート1509
		(72) 発明者	ダーキン, ジョン・テイ
			アメリカ合衆国ペンシルベニア州1900
			3アードモア・ウエリントンロード47
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規混合系統キナーゼ (7) (MLK 7) ポリペプチド、それをコードするポリヌクレオチド、およびそれらの使用方法

(57) 【要約】

本発明は、単離された混合系統キナーゼ (7) (MLK) ポリヌクレオチド、発現ベクター、宿主細胞、単離されたポリペプチド、ポリペプチドの製造方法、単離された抗体、前述を有する組成物、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを結合する化合物の同定方法、および、ポリペプチドの活性を調節する化合物の同定方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 2 を含んで成るポリペプチドをコードする配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

配列番号 1 の少なくとも一部分に相補的なヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 1 記載のポリヌクレオチドを含んで成る発現ベクター。

【請求項 5】

前記ベクターがプラスミドもしくはウイルス粒子である、請求項 4 記載の発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 4 記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 7】

前記細胞が、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞である、請求項 6 記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 8】

a) 請求項 4 記載の組換え発現ベクターを適合性の宿主細胞に導入すること ;
b) 配列番号 2 を含んで成るポリペプチドの発現のための条件下で前記宿主細胞を成長させること ; および
c) 前記ポリペプチドを回収すること
の段階を含んで成る、前記ポリペプチドの製造方法。

【請求項 9】

請求項 1 記載のポリヌクレオチドおよび担体もしくは希釈剤を含んで成る組成物。

【請求項 10】

請求項 4 記載の組換え発現ベクターおよび担体もしくは希釈剤を含んで成る組成物。

【請求項 11】

請求項 1 記載のポリヌクレオチドによりコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号 2 を含んで成る単離されたポリペプチド。

【請求項 13】

前記ポリペプチドが配列番号 2 を含んで成る、請求項 11 記載のポリペプチド。

【請求項 14】

請求項 11 記載のポリペプチドおよび担体もしくは希釈剤を含んで成る組成物。

【請求項 15】

請求項 12 記載のポリペプチドおよび担体もしくは希釈剤を含んで成る組成物。

【請求項 16】

請求項 12 記載のポリペプチド上のエピトープに結合する単離された抗体。

【請求項 17】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 16 記載の抗体。

【請求項 18】

請求項 16 記載の抗体および担体もしくは希釈剤を含んで成る組成物。

【請求項 19】

請求項 12 記載のポリペプチドに結合する抗体を含んで成るキット。

【請求項 20】

請求項 1 記載のポリヌクレオチドを含んで成るキット。

【請求項 21】

請求項 12 記載のポリペプチドを含んで成るキット。

10

20

30

40

50

【請求項 22】

- a) 請求項 12 記載のポリペプチドを化合物と接触させること；および
 b) 前記化合物が前記ポリペプチドに結合するかどうかを決定すること
 の段階を含んで成る、前記ポリペプチドを結合する化合物の同定方法。

【請求項 23】

前記ポリペプチドへの前記化合物の結合がタンパク質結合アッセイにより測定される、請求項 20 記載の方法。

【請求項 24】

前記タンパク質結合アッセイが、ゲルシフトアッセイ、ウェスタンブロット、放射標識競争アッセイ、ファージに基づく発現クローニング、クロマトグラフィーによる共分画、共沈殿法、架橋、相互作用捕捉 / 2 ハイブリッド分析、サウスウェスタン分析および E L I S A よりなる群から選択される、請求項 23 記載の方法。 10

【請求項 25】

- a) 請求項 1 記載のポリヌクレオチドを化合物と接触させること；および
 b) 前記化合物が前記ポリヌクレオチドを結合するかどうかを決定すること
 の段階を含んで成る、前記ポリヌクレオチドを結合する化合物の同定方法。

【請求項 26】

結合がゲルシフトアッセイにより測定される、請求項 24 記載の方法。

【請求項 27】

- a) 請求項 12 記載のポリペプチドを化合物と接触させること；および 20
 b) 前記ポリペプチド活性が調節されたかどうかを決定すること
 の段階を含んで成る、前記ポリペプチドの活性を調節する化合物の同定方法。

【請求項 28】

前記活性が基質のリン酸化である、請求項 27 記載の方法。

【請求項 29】

前記活性が J N K 活性化である、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

請求項 22 記載の方法により同定される化合物。

【請求項 31】

請求項 25 記載の方法により同定される化合物。 30

【請求項 32】

請求項 27 記載の方法により同定される化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は 2001 年 5 月 24 日出願の米国仮出願第 60 / 293,381 号明細書（そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）に対する優先権を主張する。

【0002】

本発明は、部分的に、新規混合系統キナーゼ 7 (M L K 7) ポリペプチド、それをコードするポリヌクレオチド、該ポリペプチドに結合するもしくはその活性を調節する化合物の 40
 同定方法、および M L K 7 の酵素活性のアッセイ方法に向けられる。

【背景技術】

【0003】

M L K ファミリーは、該ファミリーメンバーのキナーゼドメインのタンパク質配列がチロシンおよびセリン / トレオニンタンパク質キナーゼ双方と相同性を示す酵素の一群を含んで成る。とりわけ、この領域は、チロシンキナーゼ間で高度に保存される多くのアミノ酸を含有するが、しかし、触媒ドメインすなわちサブドメイン V I b および V I I I 中のセリン / トレオニンタンパク質キナーゼに対する相同性は、M L K 3 の既知のセリン / トレオニンキナーゼ活性と矛盾しない（非特許文献 1）。加えて、全部のファミリーメンバーは、ロイシンジッパー（平行コイルドコイル構造を形成するための最低 22 アミノ酸の伸長 50

について7番目のアミノ酸ごとのロイシンもしくはイソロイシンの周期的反復を特徴とする - らせん構造)を含有する(非特許文献2)。これらのキナーゼは、例えば、とりわけc - J u nのN末端キナーゼ(J N K)(順に、とりわけc - J u n、A T F 2およびE L K 1を包含する転写因子を調節する)の調節を必要とするストレスシグナル伝達カスケードのような非常に複雑なキナーゼカスケードの一部を含んで成る。J N Kは特許文献1、2、3および4に記述される。

【0004】

M L Kファミリーは、6種の報告されたファミリーメンバー、すなわち1)混合系統キナーゼ1(M L K 1); 2)混合系統キナーゼ2(M L K 2); 3)混合系統キナーゼ3(M L K 3); 4)二重ロイシンジッパーを担持するキナーゼ(D L K); 5)ロイシンジッパー担持キナーゼ(L Z K)および6)M L K様マイトジェン活性化プロテイン三重キナーゼ/混合系統キナーゼ6(M L T K / M L K 6)よりなる。部分的配列がM L K 1について報告されている(非特許文献3)。混合系統キナーゼ1、2および3は、上述された特徴に加えて、キナーゼドメインに対しN末端のs r c - 相同性 - 3(S H 3)ドメインを有する(非特許文献4; 5; および6)。それらのロイシンジッパー領域はキナーゼドメインに対しすぐC末端にあり、そして、二重ロイシンジッパーと命名される小さなスペーサー領域により分離される4個の - らせん領域の2個の繰り返しより構成される。欠失分析は、ホモ二量体化におけるこのドメインの機能的役割を示唆する(非特許文献7)。このドメインの後に、数種のタンパク質からの核局在化シグナルに類似の圧倒的に優勢の塩基性アミノ酸より構成される小さな領域が続く(非特許文献5)。C d c 4 2 / R a c相互作用結合(C R I B)ドメインがそれにすぐ隣接する(非特許文献8)。C末端は全般に低レベルの複雑さを有し、ここで3種のアミノ酸(プロリン、セリンおよびグリシン)が一次アミノ酸配列の41%(M L K 3)まで含んで成る。M L K 2はM S Tとしてもまた知られる(非特許文献9)。M L K 3は、s c r - 相同性3(S H 3)ドメインを含有するプロリン豊富なキナーゼ(S P R K)(非特許文献1)およびプロテインチロシンキナーゼ1(P T K 1)(非特許文献10)としてもまた知られる。

10

20

30

40

50

【0005】

D L KおよびL Z Kは同一の全般的特徴を共有するが、しかしS H 3およびC R I Bドメインは有さず、また、二重ロイシンジッパー中のそれらのスペーサー領域は、M L K 1 - 3中でより約18アミノ酸より長い(非特許文献11; 12)。D L Kは、ロイシンジッパープロテインキナーゼ(Z P K)(非特許文献13)およびM A P K上流キナーゼ(M U K)(非特許文献14)としてもまた知られる。

【0006】

M L T K / M L K 6はなおより互いに異なる。それらはキナーゼドメインおよび推定のロイシンジッパー領域を共有するが、しかし、D L K / L Z K群と同様、S H 3結合ドメインもしくはC R I Bドメインが存在せず、また塩基性アミノ酸領域も存在しない。むしろ、2種のc D N A配列は推定のロイシンジッパー領域の後で異なり、2個の異なるアイソフォーム および をもたらす。さらに、「二重の」4 + 4反復を含有する他のファミリーメンバーと異なり、推定のロイシンジッパー領域は6個の連続する - らせん反復を含有する。加えて、他のファミリーメンバーと異なり、該キナーゼドメインは本質的にN末端にある(非特許文献15)。M L T K / M L K 6 は、ロイシンジッパー不毛(s t e r i l e)モチーフキナーゼ(Z A K)としてもまた知られる(非特許文献16)。

【0007】

M L Kファミリーのメンバーはまた、例えば、特許文献5; 特許文献6; 特許文献7; 特許文献8; 非特許文献17; 非特許文献18; 非特許文献19; 非特許文献20; 非特許文献21; 非特許文献22; 非特許文献23; 非特許文献24; 非特許文献25; 非特許文献26; 非特許文献27; および非特許文献28にも記述される。ヒトキナーゼ相同物のキナーゼドメインの部分はまた特許文献9にも報告されている。加えて、混合系統キナーゼのm R N Aのヌクレオチド配列はジェンバンク(G e n b a n k)データベースに報告されている(受託番号A F 2 3 8 2 5 5およびA F 2 5 1 4 4 1を参照されたい)。

【 0 0 0 8 】

ストレスシグナル伝達カスケードのメンバーを調節しかつ細胞死もしくは細胞生存のいずれかを促進する化合物のスクリーニングの不十分により、化合物の新たな選択的スクリーニング方法に対する必要性が存在し続けている。加えて、炎症および神経変性性障害の治療において有用であるかもしれない治療薬のスクリーニングアッセイに対する必要性が存在し続けている。本発明は、これらならびに他の重要な目的に向けられる。とりわけ、本発明は、MLKファミリーの付加的なメンバー、すなわち、MLK1 - 3サブファミリーに73 ~ 76 % 相同なキナーゼドメインをコードするヒトゲノム配列から同定される、本明細書でMLK7と命名される第7のファミリーメンバーを記述する。MLK7はキナーゼドメインに対しN末端にSH3ドメインを含有する。MLK7はまた、キナーゼドメインに対しC末端の二重ロイシンジッパー、次いで、数種のタンパク質からの核局在化シグナルに類似の圧倒的に優勢の塩基性アミノ酸より構成される小さな領域も含有する。これを、機能的キナーゼタンパク質をコードするcDNAをクローン化するのに使用した。本発明の新規ポリペプチドは、例えばMAPキナーゼキナーゼ4 (MKK4) およびMKK7をリン酸化するのに使用することができ、そしてJNKのストレス活性化キナーゼ経路の活性化である役割を演じている。従って、本発明のポリペプチドは、例えばその阻害剤を同定するのに使用することができ、そして、こうした阻害剤を使用して神経細胞の生存を促進することができる。MLKポリペプチドの活性を低下させる化合物は、例えば細胞の生存を促進し、神経変性性障害を治療し、および炎症を治療するのに有用である。

10

20

【 特 許 文 献 1 】

米国特許第5,534,426号明細書

【 特 許 文 献 2 】

米国特許第5,593,884号明細書

【 特 許 文 献 3 】

米国特許第5,605,808号明細書

【 特 許 文 献 4 】

国際特許公開第WO 95/03324号明細書

【 特 許 文 献 5 】

米国特許第5,676,945号明細書

【 特 許 文 献 6 】

米国特許第5,554,523号明細書

30

【 特 許 文 献 7 】

国際特許公開第WO 93/15201号明細書

【 特 許 文 献 8 】

カナダ国特許第2,148,898号明細書

【 特 許 文 献 9 】

米国特許第5,817,479号明細書

【 非 特 許 文 献 1 】

Galloら, J. Biol. Chem., 1994, 269, 15092 - 15100

【 非 特 許 文 献 2 】

Landschultzら, Science, 1988, 240, 1759 - 1764

40

【 非 特 許 文 献 3 】

Dorowら, Eur. J. Biochem., 1993, 213, 701 - 710

【 非 特 許 文 献 4 】

Dorowら, J. Protein Chem., 1994, 13, 458 - 460

【 非 特 許 文 献 5 】

Dorowら, Eur. J. Biochem., 1995, 234, 492 - 500

【 非 特 許 文 献 6 】

Ingら, Oncogene, 1994, 9, 1745 - 1750

【 非 特 許 文 献 7 】

50

- Leung S, J. Biol. Chem., 1998, 273, 32408 - 32415
 【非特許文献 8】
- Burbello S, J. Biol. Chem., 1995, 270, 29071 - 29074
 【非特許文献 9】
- Kato H, Oncogene, 1995, 10, 1447 - 1451
 【非特許文献 10】
- Ezoe S, Oncogene, 1994, 9, 935 - 938
 【非特許文献 11】
- Hotlitzman S, J. Biol. Chem., 1994, 269, 30808 - 30817
 【非特許文献 12】
- Sakuma S, J. Biol. Chem., 1997, 272, 28622 - 28629
 【非特許文献 13】
- Reddy S, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, 202, 613 - 620
 【非特許文献 14】
- Hirai S, Oncogene, 1996, 12, 641 - 650
 【非特許文献 15】
- Goto H, J. Biol. Chem., 2001, 276, 4276 - 4286
 【非特許文献 16】
- Liu S, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 274, 811 - 816
 【非特許文献 17】
- Diener S, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 9687 - 9692
 【非特許文献 18】
- DeAizpurua S, J. Biol. Chem., 1997, 272, 16364 - 16373
 【非特許文献 19】
- Tung S, Oncogene, 1997, 14, 653 - 659
 【非特許文献 20】
- Sells S, Trends in Cell Biol., 1997, 7, 161 - 167
 【非特許文献 21】
- Mata S, J. Biol. Chem., 1996, 271, 16888 - 16896
 【非特許文献 22】
- Hirai S, J. Biol. Chem., 1997, 272, 15167 - 15173
 【非特許文献 23】
- Fan S, J. Biol. Chem., 1996, 271, 24788 - 24793
 【非特許文献 24】
- Blouin S, DNA and Cell Biol., 1996, 15, 631 - 642
 【非特許文献 25】
- Pombo S, Nature, 1995, 377, 750 - 754
 【非特許文献 26】
- Kiefer S, EMBO J., 1996, 15, 7013 - 7025
 【非特許文献 27】
- Hu S, Genes & Dev., 1996, 10, 2251 - 2264

【非特許文献 28】

S u ら , E M B O J . , 1 9 9 7 , 1 6 , 1 2 7 9 - 1 2 9 0

【発明の開示】

【0009】

本発明は、新規 M L K 7 ポリペプチドおよびそれをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0010】

とりわけ、本発明は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド、配列番号 1 に相同なポリヌクレオチド、配列番号 2 を含んで成るポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および配列番号 2 に相同なアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに向けられる。 10

【0011】

本発明はまた、配列番号 1 の少なくとも一部分に相補的なヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチドにも向けられる。

【0012】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含んで成る発現ベクターおよびそれを含んで成る宿主細胞にも向けられる。

【0013】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドによりコードされる単離されたポリペプチド、ならびに、本発明のポリヌクレオチドを含んで成る組換え発現ベクターを適合性の宿主細胞に導入すること、該ポリペプチドの発現のための条件下で該宿主細胞を成長させること、およびポリペプチドを回収することによる、配列番号 2 を含んで成るポリペプチドおよびそれに相同なポリペプチドの製造方法にも向けられる。 20

【0014】

本発明は、本発明のポリペプチド上のエピトープに結合する単離された抗体にもまた向けられる。

【0015】

本発明はまた、ポリヌクレオチド、発現ベクター、ポリペプチド、または抗体、および担体もしくは希釈剤を含んで成る組成物、ならびにポリヌクレオチド、発現ベクター、ポリペプチドもしくは抗体を含んで成るキットにも向けられる。 30

【0016】

本発明はまた、本発明のポリペプチドを化合物と接触させること、および該化合物が該ポリペプチドに結合するかどうかを測定することによる、該ポリペプチドを結合する化合物の同定方法にも向けられる。

【0017】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを化合物と接触させること、および該化合物が該ポリヌクレオチドを結合するかどうかを測定することによる、該ポリヌクレオチドを結合する化合物の同定方法にも向けられる。

【0018】

本発明はまた、本発明のポリペプチドを化合物と接触させること、および該ポリペプチドの活性が調節されたかどうかを測定することによる、該ポリペプチドの活性を調節する化合物の同定方法にも向けられる。 40

【0019】

本発明はまた、本発明の同定方法により同定される化合物にも向けられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明は、本明細書で「M L K 7」と称されるヒト M L K ポリペプチドをコードする精製かつ単離されたポリヌクレオチド（例えば、DNA 配列および RNA 転写物、キメラ RNA / DNA 分子、そのスプライス変異体を包含する一本鎖および二本鎖双方のセンスおよび相補的アンチセンス双方の鎖）を提供する。本発明の DNA ポリヌクレオチドは、ゲノ 50

ΔDNA、cDNA、および化学的に合成されたDNAを包含する。

【0021】

本明細書で使用されるところの「活性」は、直接もしくは間接的のいずれかの結合を示唆するもしくは示す；例えば本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを直接結合するための化合物の親和性を包含する何らかの曝露もしくは刺激に応答して測定可能な影響（affect）、または、例えば上流もしくは下流のタンパク質（例えばJNK）の量もしくはその活性の測定値、あるいは刺激もしくは事象後の他の類似の機能を有するような応答に影響を及ぼす、多様な測定可能な徴候を意味する。

【0022】

本明細書で使用されるところの「抗体」は、完全な無傷の抗体、およびFab、Fab'、F(ab)₂、ならびにそれらの他のフラグメントを意味する。完全な無傷の抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体および人化抗体を包含する。

【0023】

本明細書で使用されるところの「結合」は、2種のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドまたは化合物または関連するタンパク質もしくは化合物、あるいはそれらの組合せ間の物理的もしくは化学的相互作用を意味する。結合は、限定されるものでないが、イオン、非イオン、水素結合、ファンデルワールス、疎水性相互作用などを挙げることができる。結合は、別のタンパク質もしくは化合物の影響によりもしくはそのために直接もしくは間接的のいずれであることもできる。

【0024】

本明細書で使用されるところの「化合物」は、限定されるものでないが小分子、ペプチド、タンパク質もしくはポリペプチド、糖、ヌクレオチドまたは核酸などを挙げることができるいずれかの化学物質もしくは分子を意味する。化合物は天然もしくは合成であることができる。

【0025】

本明細書で使用されるところの「接触させること」は、化合物を直接的にもしくは間接的にのいずれかで、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの物理的近接と一緒にもたらしことを意味する。ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドはいずれかの数の緩衝剤、塩、溶液など中にあることができる。接触させることは、限定されるものでないが、化合物を、MLK7ポリペプチドもしくはそのフラグメント、それをコードするポリヌクレオチド、またはそれに結合する抗体を含有するビーカー、マイクロタイタープレート、細胞培養フラスコ、もしくはマイクロアレイなど中に置くことを挙げることができる。

【0026】

本明細書で使用されるところの「相同なヌクレオチド配列」もしくは「相同なアミノ酸配列」またはそれらの変形は、少なくともある指定される割合のヌクレオチドレベルもしくはアミノ酸レベルでの相同性を特徴とする配列を意味する。相同なヌクレオチド配列は、限定されるものでないが哺乳動物を挙げることができるヒト以外の種のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を包含する。相同なヌクレオチド配列はまた、限定されるものでないが、天然に存在する対立遺伝子変異および本明細書に示されるヌクレオチド配列の突然変異も挙げることができる。相同なヌクレオチド配列は、しかしながら、他の既知のMLKポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に同一でない。相同なアミノ酸配列は、保存的アミノ酸置換をコードするアミノ酸配列、ならびにキナーゼ活性を有するポリペプチドを包含する。相同なアミノ酸配列は、しかしながら、他の既知のMLKポリペプチドをコードするアミノ酸配列に同一でない。相同性パーセントは、例えば、SmithとWatermanのアルゴリズム（Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489（そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる））を使用する、デフォルトの設定を使用するGapプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package）、Version 8 for Unix、ジェネティクス コンピュータ グループ（Genetics Computer Group）、ユニバーシティ リサーチ パーク、ウ

イスコンシン州マディソン)により決定することができる。

【0027】

本明細書で使用されるところの「調節する」もしくは「改変する」は、特定の活性もしくはポリペプチドの量、質もしくは影響の増大もしくは減少を意味する。

【0028】

本明細書で使用されるところの「治療すること」は、ある生物体において治療効果を示すことおよび異常な状態を少なくとも部分的に軽減もしくは阻止することを意味する。

【0029】

本明細書で使用されるところの「治療効果」は、異常な状態を引き起こすもしくはそれに寄与する因子の阻害もしくは活性化を意味する。治療効果は、少なくとも若干の程度まで、異常な状態の症状の1つもしくはそれ以上を軽減する。異常な状態の治療に関して、治療効果は、以下、すなわち i) 細胞の増殖、成長および/もしくは分化の増大; ii) 細胞死の阻害(すなわち遅延もしくは停止); iii) 変性の阻害; iv) 該異常な状態に関連する症状の1つもしくはそれ以上を若干の程度まで楽にすること; ならびに v) 細胞の冒された集団の機能を高めること、の1つもしくはそれ以上を指すことができる。

10

【0030】

本明細書で使用されるところの「異常な状態」は、その生物体においてそれらの正常な機能から逸脱する生物体の細胞もしくは組織中の機能を意味する。異常な状態は個体により望まれないいかなる状態であることもできる。異常な状態は、細胞増殖、細胞分化、細胞のシグナル伝達もしくは細胞の生存に関係する可能性がある。異常な分化状態は、限定されるものでないが神経変性性もしくは炎症性障害を挙げることができる。異常な細胞の生存の状態はまた、プログラムされた細胞死(アポトーシス)経路が活性化もしくは阻止される状態にも関係する可能性がある。

20

【0031】

本明細書で使用されるところの「投与すること」は、生物体の細胞もしくは組織中への化合物の取り込み方法を意味する。生物体内の細胞について、投与技術は、限定されるものでないが、経口、筋肉内、腹腔内、皮内、皮下、静脈内、動脈内に、眼内に、心もしくは脳室内に(intraventricular)および経皮で、ならびに吸入もしくは坐剤によりを挙げることができる。生物体の外側の細胞について、投与技術は、限定されるものでないが細胞微小注入、形質転換および担体技術を挙げることができる。

30

【0032】

本明細書で使用されるところの「生物体」は、マウス、ラット、ウサギ、モルモットもしくはヤギのような哺乳動物、より好ましくはサルもしくは類人猿のような霊長類、そして最も好ましくはヒトを意味する。

【0033】

本明細書で使用されるところの「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」もしくは「ストリンジェントな条件」は、プローブ、プライマーもしくはオリゴヌクレオチドがその標的配列にハイブリダイズするがしかし他の配列にしないことができる条件を意味する。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる環境で異なることができる。一般に、ストリンジェントな条件は、定義されるイオン強度およびpHでの特定の配列の熱的融点(T_m)より約5°Cより低いように選択される。標的配列は一般に過剰に存在する。典型的には、ストリンジェントな条件は、pH 7.0ないし8.3で塩濃度が約1.0 Mナトリウムイオン未満、典型的には約0.01ないし1.0 Mナトリウムイオン(もしくは他の塩)でありかつ温度が短いプローブ、プライマーもしくはオリゴヌクレオチド(例えば10ないし50ヌクレオチド)について最低約30°C、およびより長いプローブ、プライマーもしくはオリゴヌクレオチドについて最低約60°Cであるものであることができる。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加でもまた達成することができる。

40

【0034】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドのタンパク質コーディング領域を含

50

んで成りかつ対立遺伝子変異体もしくはそれらのスプライス変異体を包含することもまた意図しているゲノムDNAを包含することができる。本発明のスプライス変異体は同一の元のゲノムDNA配列によりコードされるが、しかし別個のmRNA転写物から生じる。対立遺伝子変異体は改変された形態の野性型遺伝子配列であり、該改変は、染色体分離、もしくは遺伝子突然変異を生じさせる条件への曝露の間の組換えから生じる。対立遺伝子変異体は、野性型遺伝子と同様、インビトロ操作から生じる天然に存在しない変異体と反対に、天然に存在する配列である。

【0035】

本発明において、MLK7ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを配列番号1に示す。本発明の好ましいポリペプチドは二本鎖分子を含んで成る。普遍的核遺伝暗号の公知の縮重によって配列番号1に示される特定のポリヌクレオチドと配列が異なる本発明の特定のMLK7ポリペプチドをコードする他のポリヌクレオチドもまた好ましい。

10

【0036】

本発明は、ヒトMLK7ポリヌクレオチドの付加的な種の相同物（好ましくは哺乳動物の）にさらに向けられる。ときに「類似物（ortholog）」と称される種の相同物は、一般に、本発明のヒトポリヌクレオチドと最低35%、最低40%、最低45%、最低50%、最低60%、最低65%、最低70%、最低75%、最低80%、最低85%、最低90%、最低95%、最低98%、もしくは最低99%の相同性を共有する。一般に、本発明のポリヌクレオチドに関しての配列の「相同性」パーセントは、最大の配列の同一性パーセントを達成するように配列を整列しかつ必要な場合はギャップを導入した後に特定のポリヌクレオチド配列中に示されるMLK7配列中のヌクレオチドに同一である候補配列中のヌクレオチド塩基のパーセンテージとして計算することができる。

20

【0037】

関係するポリヌクレオチドの例は、対立遺伝子変異体を包含するヒトおよび非ヒトゲノム配列、ならびに、MLK7ポリペプチドに相同なポリペプチドならびにMLK7ポリペプチドの1種もしくはそれ以上の生物学的、免疫学的および/もしくは物理的特性を共有する構造的に關係するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを包含する。MLK7ポリペプチドに相同なタンパク質をコードする非ヒト種の遺伝子は、サザンおよび/もしくはPCR分析によってもまた同定することができ、そしてMLKポリペプチド障害の動物モデルで有用である。本発明のポリヌクレオチドはまた、MLK7ポリペプチドを発現する細胞の能力を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイでも有用である。本発明のポリヌクレオチドはまた、疾患状態（1種もしくは複数）の根底にあるMLK7遺伝子座の遺伝子変化（1個もしくは複数）を同定するために有用な診断方法の基礎も提供する可能性があり、こうした情報は診断、および治療戦略の選択双方に有用である。

30

【0038】

MLK7ポリペプチドをコードする完全長のポリヌクレオチドの本明細書の開示は、完全長のポリヌクレオチドのすべての可能なフラグメントを当業者に容易に利用可能にする。MLK7ポリヌクレオチドは、従って、MLK7をコードするポリヌクレオチドの最低14、および好ましくは最低16、18、20、25、50、75、100、150、200、250、400、500、750、1000、1250、1500、1750、2000、2250、2500、2750もしくは3000の連続するヌクレオチドを含んで成るフラグメントを包含する。好ましくは、本発明のフラグメントポリヌクレオチドは、MLK7をコードするポリヌクレオチド配列に独特の配列を含んで成り、そして従って、高度にストリンジェントなもしくは中程度にストリンジェントな条件下でMLK7をコードするポリヌクレオチド（もしくはそれらのフラグメント）にのみ（すなわち「特異的に」）ハイブリダイズする。本発明のゲノム配列のポリヌクレオチドフラグメントは、コーディング領域に独特の配列を含むのみならず、しかしまた、イントロン、調節領域および/もしくは他の非翻訳配列由来の完全長配列のフラグメントも包含する。本発明のポリヌクレオチドは、放射活性、蛍光および酵素的標識を包含するそれらの検出を可能にする様式で標識することができる。

40

50

【0039】

フラグメントポリヌクレオチドは、完全長もしくはフラグメントのMLK7ポリヌクレオチドの検出のためのプローブとしてとりわけ有用である。1種もしくはそれ以上のポリヌクレオチドを、MLK7をコードするポリヌクレオチドの存在を検出するのに使用される、もしくはMLK7をコードするポリヌクレオチド配列中の変異を検出するのに使用されるキットに包含することができる。

【0040】

本発明はまた、配列番号1のポリヌクレオチドの非コーディング鎖もしくは相補体に中程度にストリンジェントなもしくは高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするMLK7ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにも向けられる。例示的な高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は以下のとおりである。すなわち、50%ホルムアミド、1%SDS、1M NaCl、10%デキストラン硫酸を含んで成るハイブリダイゼーション溶液中42℃でのハイブリダイゼーション、ならびに、0.1xSSCおよび1%SDSを含んで成る洗浄溶液中60℃で30分間2回洗浄すること。同等なストリンジェンシーの条件はAusubelら(編)、Protocols in Molecular Biology, ジョン Wiley アンド サンズ(John Wiley & Sons)(1994), pp. 6.0.3ないし6.4.10に記述されるところの温度および緩衝液もしくは塩濃度の変動により達成することができるが、当該技術分野で理解される。ハイブリダイゼーション条件の改変は、経験的に決定することができるか、もしくはプローブの長さおよびグアノシン/シトシン(GC)塩基対形成のパーセンテージに基づいて正確に計算することができる。ハイブリダイゼーション条件は、Sambrookら(編)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press): ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1989), pp. 9.47ないし9.51(そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)に記述されたとおり計算することができる。

【0041】

本発明のポリヌクレオチドを組み込むプラスミドおよびウイルスDNAベクターのような組換え発現構築物もまた提供される。好ましくは、MLK7をコードするポリヌクレオチドは、内因性もしくは外因性のプロモーター、エンハンサー、オペレーターもしくは調節要素結合部位、またはそれらのいずれかの組合せに操作をもたらして連結される。本発明の発現構築物はまた、該構築物を担持する宿主細胞の同定を可能にする1種もしくはそれ以上の選択可能なマーカーをコードする配列も包含することができる。発現構築物はまた、宿主細胞中での相同的組換えを助長(および好ましくは促進)する配列も包含することができる。本発明の好ましい構築物は、宿主細胞中での複製に必要な配列もまた包含する。発現構築物は、好ましくはコードされるタンパク質の産生に利用されるが、しかし、MLK7をコードするポリヌクレオチド配列を増幅するのにもまた利用することができる。

【0042】

本発明の別の態様において、コードされるMLK7ポリペプチドの発現を可能にする様式で本発明のポリヌクレオチド(もしくは本発明のベクター)を含んで成る、原核生物および真核生物細胞を包含する宿主細胞が提供される。本発明のポリヌクレオチドは、プラスミドの一部として、または単離されたタンパク質コーディング領域を含んで成る直鎖状DNAもしくはウイルスベクターとして、宿主細胞に導入することができる。宿主細胞中へのDNAの導入方法は当該技術分野で公知かつ慣例に実施され、そして、形質転換、トランスフェクション、電気穿孔法、核注入、もしくはリポソーム、ミセル、ゴースト細胞およびプロトプラストのような担体との融合を包含する。本発明の発現系は、細菌、酵母、真菌、植物、昆虫、無脊椎動物、脊椎動物および哺乳動物細胞系を包含する。

【0043】

本発明の宿主細胞は、MLK7と特異的に免疫反応性である抗体の発生にMLK7ポリペ

10

20

30

40

50

プチドに基づく免疫原を提供することができる。本発明の宿主細胞はまた、細胞を適する培地中で成長させ、そして所望のポリペプチド産物を当該技術分野で既知の精製方法、例えば免疫親和性クロマトグラフィー、受容体アフィニティークロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、レクチンアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、陽イオンもしくは陰イオン交換クロマトグラフィー、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、逆相HPLCなどを包含する慣習的クロマトグラフィー法により細胞からもしくは細胞が成長された培地から単離する、MLK7ポリペプチドの大スケール製造方法においても有用である。なお他の精製方法は、所望のタンパク質を、特異的結合パートナーもしくは作用物質により認識される特異的標識（tag）、標識（label）もしくはキレート形成部分を有する融合タンパク質として発現させかつ精製する方法を包含する。精製されたタンパク質を切断して所望のタンパク質を生じさせることができるか、もしくは無傷の融合タンパク質として残すことができる。融合成分の切断は、切断過程の結果として付加的なアミノ酸残基を有する所望のタンパク質の形態を生じるかもしれない。

10

【0044】

本発明はまた、MLK7をコードするポリヌクレオチドを認識かつそれらにハイブリダイズするアンチセンスポリヌクレオチドにも向けられる。完全長およびフラグメントのアンチセンスポリヌクレオチドが提供される。本発明のフラグメントアンチセンス分子は、MLK7のRNAもしくはDNAを特異的に認識しかつそれらにハイブリダイズするものを包含する。アンチセンスポリヌクレオチドは、MLK7のmRNAを発現する細胞によるMLK7の発現を調節することにとりわけ直接的に関連する。MLK7の発現制御配列もしくはNLK7のRNAに特異的に結合することが可能なアンチセンスポリヌクレオチド（好ましくは10ないし20塩基対のオリゴヌクレオチド）を（例えばウイルスベクターもしくはリボソームのようなコロイド分散系により）細胞に導入する。ホスホロチオエートおよびメチルホスホネートアンチセンスオリゴヌクレオチドが本発明による治療的使用にとりわけ企図される。転写もしくは翻訳いずれかのレベルでのMLK7発現の抑制は、異常なMLK7発現を特徴とする疾患/病状の細胞もしくは動物モデルを生成させるのに有用である。

20

【0045】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドによりコードされる精製かつ単離された哺乳動物のMLK7ポリペプチドも提供する。好ましくは、MLK7ポリペプチドは配列番号2に示されるアミノ酸配列を含んで成る。本発明はまた、本発明の好ましいポリペプチドに対する最低99%、最低95%、最低90%、最低85%、最低80%、最低75%、最低70%、最低65%、最低60%、最低55%もしくは最低50%の同一性および/もしくは相同性を有するポリペプチドにも向けられる。本発明の好ましいポリペプチドに関してのアミノ酸配列の「同一性」パーセントは、最大の配列の同一性パーセントを達成するために双方の配列を整列しかつ必要な場合はギャップを導入した後、ならびに配列の同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮せずに、MLK7配列中の残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと本明細書で定義する。本発明の好ましいポリペプチドに関しての配列の「相同性」パーセントは、最大の配列の同一性パーセントを達成するために配列を整列しかつ必要な場合はギャップを導入した後、ならびにまた配列の同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮することなく、MLK7配列中の残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと本明細書で定義する。

30

40

【0046】

本発明のポリペプチドは、天然の細胞供給源から単離することができるか、もしくは化学的に合成することができるが、しかし、好ましくは、本発明の宿主細胞を必要とする組換え手順により製造する。哺乳動物宿主細胞の使用は、本発明の組換え発現産物に至適の生物学的活性を賦与するために必要とされるかもしれないところのこうした翻訳後修飾（例えばグリコシル化、短縮、脂質化（lipidation）およびリン酸化）を提供すると期待される。グリコシル化されたおよびグリコシル化されない形態のMLK7ポリペプ

50

チドもまた提供される。

【0047】

本発明はまた、MLK7ポリペプチド変異体もしくは類似物にも向けられる。一例において、1個もしくはそれ以上のアミノ酸残基がMLK7アミノ酸配列を補う挿入変異体が提供される。挿入はタンパク質のいずれかのもしくは双方の末端に配置されることができるか、または、MLK7アミノ酸配列の内部領域内に配置されることができる。いずれかのもしくは双方の末端に付加的な残基をもつ挿入変異体は、例えば、融合タンパク質、およびアミノ酸標識 (tag) もしくは標識 (label) を包含するタンパク質を包含することができる。挿入変異体は、1個もしくはそれ以上のアミノ酸残基がMLK7酸配列もしくはその生物学的に活性のフラグメントに付加されるMLK7ポリペプチドを包含する。本発明の変異体産物はまた、付加的なアミノ末端残基を伴いリーダーもしくはシグナル配列が除去される成熟MLK7ポリペプチドも包含する。該付加的アミノ末端残基は別のタンパク質由来であることができるか、または、特定のタンパク質由来であるとして同定可能でない1個もしくはそれ以上の残基を包含することができる。

10

【0048】

本発明はまた、特定の発現系の使用から生じる付加的アミノ酸残基を有するMLK7変異体も提供する。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合産物の一部として所望のポリペプチドを発現する商業的に入手可能なベクターの使用は、所望のポリペプチドからのGST成分の切断後に位置-1に付加的なグリシン残基を有する所望のポリペプチドを提供する。他のベクター系中での発現から生じる変異体もまた企図される。挿入変異体はまた、MLK7のアミノ末端および/もしくはカルボキシ末端が別のポリペプチドに融合される融合タンパク質も包含する。加えて、MLK7もしくはそのフラグメントを含んで成る他の融合タンパク質が本発明により企図される。多数の融合パートナータンパク質が当業者に公知である。

20

【0049】

別の局面において、本発明は、MLK7ポリペプチド中の1個もしくはそれ以上のアミノ酸残基が除去される欠失変異体を提供する。欠失は、MLK7ポリペプチドの一方もしくは双方の末端で、またはMLK7の1個もしくはそれ以上の非末端アミノ酸残基の除去で遂げることができる。欠失変異体は、従って、MLK7ポリペプチドの全部のフラグメントを包含する。

30

【0050】

本発明はまた、フラグメントがMLK7ポリペプチドの生物学的 (例えば、リガンド結合および/もしくはキナーゼ活性) または免疫学的特性を維持する配列番号2のポリペプチドフラグメントも包含する。本明細書に記述されるポリペプチドのいずれかの最低5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950もしくは1000の連続するアミノ酸を含んで成るフラグメントが本発明により企図される。好ましいポリペプチドフラグメントは、ヒトMLK7ならびにその対立遺伝子および種の相同物に独特のもしくは特異的な抗原特性を有する。所望の生物学的および免疫学的特性を有する本発明のフラグメントは、当該技術分野で公知かつ慣例に実施される方法のいずれかにより製造することができる。付加的な好ましいフラグメントは、MLK7のキナーゼドメイン (MLK7_{KD})、MLK7のロイシンジッパー領域 (MLK7_{LZ}) およびMLK7のロイシンジッパー領域に連結されるキナーゼドメイン (MLK7_{KD/LZ}) を包含する。

40

【0051】

本発明の別の局面において、MLK7ポリペプチドの置換変異体が提供される。置換変異体は、MLK7ポリペプチドの1個もしくはそれ以上のアミノ酸が除去されかつ代替残基で置き換えられるポリペプチドを包含する。一局面において、該置換は性質が保存的である。本発明は、しかしながら、非保存的でもまたある置換もまた包含する。この目的上の保存的置換は下に示されるとおり定義することができる。変異体ポリペプチドは、保存的

50

置換が本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの改変により導入されているものを包含する。保存的置換は、類似の特性を有する1アミノ酸についての別のアミノ酸の置換として当該技術分野で認識される。例示的保存的置換は、限定されるものでないが、非極性 (Gly、Ala、Pro、Ile、LeuおよびVal)、極性の荷電していない (Cys、Ser、Thr、Met、AsnおよびGln)、極性の荷電した (Asp、Glu、LysおよびArg)、芳香族 (His、Phe、TrpおよびTyr) ならびに他者 (Asn、Gln、AspおよびGlu) を挙げることができる。あるいは、保存的アミノ酸はLehninger, (Biochemistry, 第2版; ワースパブリッシャーズ インク (Worth Publishers, Inc.)), ニューヨーク州ニューヨーク (1975), pp. 71-77) に記述されるとおりグループ分けすることができ、ここで、保存的置換は、限定されるものでないが非極性 (疎水性) 1) 脂肪族: Ala、Leu、Ile、ValおよびPro; 2) 芳香族: PheおよびTrp 3) イオウ含有: Met; 4) 境界: Gly; もしくは、荷電していない極性 1) ヒドロキシル: Ser、ThrおよびTyr; 2) アミド: AsnおよびGln; 3) スルフヒドリル: Cys; 4) 境界: Gly; または正に荷電した (塩基性): Lys、ArgおよびHis; もしくは負に荷電した (酸性): AspおよびGlnを挙げることができる。なお別の代替として、例示的保存的置換は、限定されるものでないが、Ala (Val、Leu、Ile)、Arg (Lys、Gln、Asn)、Asn (Gln、His、Lys、Arg)、Asp (Glu)、Cys (Ser)、Gln (Asn)、Glu (Asp)、His (Asn、Gln、Lys、Arg)、Ile (Leu、Val、Met、Ala、Phe)、Leu (Ile、Val、Met、Ala、Phe)、Lys (Arg、Gln、Asn)、Met (Leu、Phe、Ile)、Phe (Leu、Val、Ile、Ala)、Pro (Gly)、Ser (Thr)、Thr (Ser)、Trp (Tyr)、Tyr (Trp、Phe、Thr、Ser) およびVal (Ile、Leu、Met、Phe、Ala) を挙げることができる。本発明のポリペプチドの定義は、アミノ酸残基の挿入、欠失もしくは置換以外の改変を担持するポリペプチドを包含することを意図していることが理解されるべきである。例として、改変は、性質が共有であるかもしれず、そして、例えばポリマー、脂質、他の有機物および無機部分との化学結合を包含する。

10

20

30

40

50

【0052】

関係する一態様において、本発明は本発明の精製されたポリペプチドを含んで成る組成物を提供する。好ましい組成物は、本発明のポリペプチドに加え、ベヒクル、賦形剤、担体もしくは媒体として作用する液体、半固体もしくは固体の希釈剤を含んで成る。該組成物は、本発明のポリペプチドに加えて、ベヒクル、賦形剤、担体もしくは媒体として作用する製薬学的に許容できる (すなわち無菌かつ非毒性の) 液体、半固体もしくは固体の希釈剤もまた含むことができる。限定されるものでないが水、生理的食塩水溶液、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ステアリン酸マグネシウム、メチルおよびプロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、アルギン酸塩、デンプン、乳糖、ショ糖、D-ブドウ糖、ソルビトール、マンニトール、グリセロール、リン酸カルシウム、鉱物油ならびにカカオバターを挙げることができる当該技術分野で既知のいかなる希釈剤も使用することができる。

【0053】

上述されたMLK7ヌクレオチド配列のいずれかを含んで成るポリヌクレオチドは、本明細書に提供されるヌクレオチド配列から製造されるPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCRにより合成することができる。米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号明細書を参照されたい。加えて、多数のクローン化およびインビトロ増幅の方法論が当業者に公知である。これらの技術の例は、例えば、Bergerら, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, 152, アカデミック プレス インク (Academic Press, Inc.), カリフォルニア州サンディエゴ (Berger

r) (そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)に見出される。

【0054】

本発明のポリヌクレオチドおよびそれら由来のフラグメントは、特定の障害に関連する制限断片長多形(RFLP)についてのスクリーニング、ならびに遺伝子マッピングに有用である。

【0055】

配列番号1に示されるヌクレオチド配列のアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはフラグメント、またはMLK7をコードする本発明のヌクレオチド配列由来のそれらに相補的もしくは相同な配列は、多様な組織中での遺伝子発現をプロービングするための診断ツールとして有用である。例えば、組織は、ポリヌクレオチドの天然の発現もしくはそれに関係する病理学的状態を決定するために慣習的オートラジオグラフィ技術により検出可能な基を運搬するオリゴヌクレオチドプライマーを用いてインサイチューでプロービングすることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1に示されるヌクレオチド配列の調節領域、もしくは、限定されるものでないが開始コドン、TAAボックス、エンハンサー配列、他の調節配列などを挙げることができるそれに対応するmRNAに向けられる。

10

【0056】

自動化配列決定法を使用して、MLK7ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を得るもしくは確認することができる。本発明のMLK7ポリヌクレオチド配列は100%正確であると考えられる。しかしながら、当該技術分野で既知であるとおり、自動化された方法により得られるヌクレオチド配列は若干の誤りを含有する可能性がある。自動化により決定されるヌクレオチド配列は、典型的には、所定の核酸分子の実際のヌクレオチド配列に最低約90%、より典型的には最低約95%ないし最低約99.9%同一である。実際の配列は、当該技術分野で公知である人的配列決定法を使用してより正確に決定することができる。

20

【0057】

本発明の別の局面は、上述された核酸分子のいずれかを含んで成るベクターもしくは組換え発現ベクターに向けられる。ベクターは、MLK7をコードするDNAもしくはRNAを増幅しかつ/またはMLK7をコードするDNAを発現させるのいずれかのために本明細書で使用される。好ましいベクターは、限定されるものでないが、プラスミド、ファージ、コスミド、エピソーム、ウイルス粒子もしくはウイルス、および組込み可能なDNAフラグメントを挙げることができる。好ましいウイルス粒子は、限定されるものでないが、アデノウイルス、バキュロウイルス、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、ボックスウイルス、アデノ随伴ウイルス、セムリキ森林ウイルス、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスを挙げることができる。好ましい発現ベクターは、限定されるものでないが、pcDNA3(インヴィトロジェン(Invitrogen))およびpSVL(ファルマシアバイオテック(Pharmacia Biotech))を挙げることができる。他の発現ベクターは、限定されるものでないが、pSPORTベクター、pGEMベクター(プロメガ(Promega))、pPROEXベクター(LTI、メリーランド州ベセスダ)、Bluescriptベクター(ストラタジーン(Stratagene))、pQEベクター(キアジェン(Qiagen))、pSE420(インヴィトロジェン(Invitrogen))およびpYES2(インヴィトロジェン(Invitrogen))を挙げることができる。

30

40

【0058】

好ましい発現ベクターは、MLK7をコードするポリヌクレオチド配列が適する宿主中でのMLK7の発現を遂げることが可能な適する制御配列に操作可能に連結(linked)もしくは結合(connected)される複製可能なポリヌクレオチド構築物である。一般に、制御配列は、転写プロモーター、転写を制御するための任意のオペレーター配列、適するmRNAリボソーム結合をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終止を制御する配列を包含する。好ましいベクターは、好ましくは宿主生物体により認識される

50

プロモーターを含有する。本発明のプロモーター配列は原核生物、真核生物もしくはウイルスであることができる。適する原核生物配列の例は、バクテリオファージのPRおよびPLプロモーター(The bacteriophage Lambda, Hershey, A. D. 編, コールドスプリングハーバープレス(Cold Spring Harbor Press), ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1973)) (そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる); Lambda I I, Hendrix, R. W. 編, コールドスプリングハーバープレス(Cold Spring Harbor Press), ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1980) (そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる); 大腸菌(E. coli)のtrp、recA、熱ショックおよびlacZプロモーター、
10
ならびにSV40初期プロモーター(Benoistら, Nature, 1981, 290, 304-310 (そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)) を包含する。付加的なプロモーターは、限定されるものでないが、マウス乳腺腫瘍ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスの末端反復配列、マロニーウイルス、サイトメガロウイルス前初期プロモーター、エプスタイン-バーウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン、およびヒトメタロチオネインを挙げることができる。

【0059】

付加的な調節配列もまた好ましいベクター中に包含されることができる。適する調節配列の好ましい例は、ファージMS-2のレプリカーゼ遺伝子、およびバクテリオファージ
20
の遺伝子cIIのシャイン-ダルガーノにより代表される。シャイン-ダルガーノ配列は、MLK7をコードするDNAに直接後に続かれることができ、そして成熟MLK7の発現をもたらす。さらに、適する発現ベクターは、形質転換された宿主細胞のスクリーニングを可能にする適切なマーカーを包含することができる。複製起点もまた、外因性の起点を包含するようなベクターの構築により提供されることができるか、もしくは宿主細胞の染色体複製機構により提供されることができるかのいずれかである。ベクターが宿主細胞の染色体中に組込まれる場合は後者が十分であるかもしれない。あるいは、ウイルスの複製起点を含有するベクターを使用するよりはむしろ、当業者は、選択可能なマーカーおよびMLK7 DNAでの共形質転換の方法により哺乳動物細胞を形質転換することができる。
30
適するマーカーの一例はデヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)もしくはチミジンキナーゼ(tk)である(米国特許第4,399,216号明細書を参照されたい)。哺乳動物発現ベクターの構築方法は、例えば、Okayamaら, Mol. Cell. Biol., 1983, 3, 280, Cosmanら, Mol. Immunol., 1986, 23, 935, Cosmanら, Nature, 1984, 312, 768, 欧州特許出願第EP-A-0367566号明細書および国際特許公開第WO 91/18982号明細書(それらのそれぞれはそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)に開示される。

【0060】

本発明の別の局面は、上述された核酸分子のいずれかを含んで成る発現ベクターを有する形質転換された宿主細胞に向けられる。ヌクレオチド配列の発現は、発現ベクターが適する
40
宿主細胞に導入される場合に起こる。本発明のポリペプチドの発現に適する宿主細胞は、限定されるものでないが原核生物、酵母および真核生物を挙げることができる。原核生物発現ベクターを使用する場合には、適切な宿主細胞はクローン化される配列を発現することが可能ないかなる原核生物細胞でもあることができる。適する原核生物細胞は、限定されるものでないが、エシェリキア属(Escherichia)、バチルス属(Bacillus)、サルモネラ属(Salmonella)、シュードモナス属(Pseudomonas)、ストレプトミセス属(Streptomyces)およびブドウ球菌属(Staphylococcus)を挙げることができる。

【0061】

真核生物発現ベクターを使用する場合には、適切な宿主細胞はクローン化される配列を発
50

現することが可能いかなる真核生物細胞でもあることができる。好ましくは、真核生物細胞は高等真核生物の細胞である。適する真核生物細胞は、限定されるものでないが、非ヒト哺乳動物組織培養細胞およびヒト組織培養細胞を挙げることができる。好ましい宿主細胞は、限定されるものでないが、昆虫細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、アフリカミドリザル腎細胞（COS細胞）、ヒト293細胞およびマウス3T3線維芽細胞を挙げることができる。細胞培養物中でのこうした細胞の繁殖は慣例の処置となっている（Tissue Culture, アカデミック プレス（Academic Press）, KruseとPatterson編（1973）（そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。

【0062】

10

加えて、酵母宿主を宿主細胞として使用してよい。好ましい酵母細胞は、限定されるものでないが、サッカロミセス属（*Saccharomyces*）、ピキア属（*Pichia*）およびクルベロミセス属（*Kluyveromyces*）を挙げることができる。好ましい酵母宿主はビール酵母菌（*S. cerevisiae*）およびP. パストリス（*P. pastoris*）である。好ましい酵母ベクターは、2T酵母プラスミドからの複製起点配列、自律複製配列（ARS）、プロモーター領域、ポリアデニル酸化のための配列、転写終止のための配列および選択可能なマーカー遺伝子を含むことができる。酵母および大腸菌（*E. coli*）双方での複製のためのシャトルベクターもまた本明細書に含まれる。

【0063】

20

あるいは、昆虫細胞を宿主細胞として使用してもよい。好ましい一態様において、本発明のポリペプチドはバキュロウイルス発現系を使用して発現される（Luckowら, *Bio/Technology*, 1988, 6, 47, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, O'Riellyら（編）, W.H. フリーマン アンド カンパニー（W.H. Freeman and Company）, ニューヨーク, 1992、および米国特許第4,879,236号明細書（それらのそれぞれはそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。加えて、MAXBACTM 完全バキュロウイルス発現系（インヴィトロジェン（Invitrogen））およびBAC-TO-BACTM 系（ライフ テクノロジーズ（Life Technologies））を、例えば昆虫細胞中での産生に使用することができる。

30

【0064】

好ましくはMLK7もしくはそのフラグメントに特異的な、MLK7に結合する抗体（例えばモノクローナルおよびポリクローナル抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、二機能性/二特異性抗体、人化抗体、ヒト抗体、ならびに本発明のポリペプチドを特異的に認識する相補性決定領域（CDR）配列を含む化合物を含むCDRグラフト化（grafted）抗体もまた本発明により企図される。Fab、Fab'、F（ab'）₂およびFvを含む抗体フラグメントもまた本発明により提供される。本発明の抗体を記述するのに使用される場合の「に特異的」という用語は、本発明の抗体の可変領域がMLK7ポリペプチドを独占的に認識かつ結合する（すなわち、MLK7とこうしたポリペプチドとの間の位置を突き止められた配列の同一性、相同性もしくは類似性の可能な存在にもかかわらず結合親和性の測定可能な差異によって他の既知のMLKポリペプチドとMLK7ポリペプチドを区別することが可能である）ことを示す。特異的抗体は抗体の可変領域の外側、およびとりわけ該分子の定常領域中の配列との相互作用により他のタンパク質（例えば、ELISA技術における黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）プロテインAもしくは他の抗体）ともまた相互作用するかもしれないことが理解されよう。本発明の抗体の結合特異性を決定するためのスクリーニングアッセイは当該技術分野で公知かつ慣例に実施される（Harlowら（編）, *Antibodies A Laboratory Manual*; コールド スプリング ハーバー ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）; ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（

40

50

1988), 第6章を参照されたい)。

【0065】

本発明の抗体は、(MLK7の活性を調節することによる)治療目的、MLK7を検出もしくは定量するための診断目的、およびMLK7の精製に有用である。本明細書に記述される目的のいずれかのための本発明の抗体を含んで成るキットもまた企図される。一般に、本発明のキットは、抗体が免疫特異的である対照抗原もまた包含する。

【0066】

他のヒト疾患状態もしくは異常な状態において、MLK7の発現を予防することもしくはその活性を阻害することが、疾患状態もしくは異常な状態の治療において有用であることができることが企図される。アンチセンス療法もしくは遺伝子治療が、MLK7ポリペプチドの発現もしくは活性を調節するのに適用されるかもしれないことが企図される。

10

【0067】

本発明はまた、製薬学的キットを包含するキットにも向けられる。該キットは、上述されたポリヌクレオチドのいずれか、上述されたポリペプチドのいずれか、もしくは上述されたところの本発明のポリペプチドに結合するいずれかの抗体、ならびに陰性対照を含むことができる。該キットは、好ましくは、例えば、説明書、固体支持体、定量に役立つ試薬などのような付加的な構成要素を含んで成る。

【0068】

本発明の別の局面は、上述されたポリヌクレオチドもしくは組換え発現ベクターのいずれかおよび許容できる担体もしくは希釈剤を含んで成る製薬学的組成物を包含する組成物に向けられる。好ましくは、該担体もしくは希釈剤は製薬学的に許容できる。適する担体は、この分野の標準的参照教科書、Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol (そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)の最新版に記述される。こうした担体もしくは希釈剤の好ましい例は、限定されるものでないが、水、生理的食塩水、リンゲル液、D-ブドウ糖溶液および5%ヒト血清アルブミンを挙げることができる。リポソーム、および固定油のような非水性ベヒクルもまた使用することができる。製剤は、普遍的に使用される技術により滅菌する。

20

【0069】

天然のリガンドおよび合成化合物を包含する特異的結合化合物は、単離されたもしくは組換えのMLK7産物、MLK7変異体、または、好ましくはこうした産物を発現する細胞を使用して同定もしくは発生させることができる。結合化合物は、MLK7産物を精製するために、および既知の免疫学的手順を使用する液体および組織サンプル中のMLK7産物の検出もしくは定量に有用である。結合化合物はまた、MLK7の生物学的活性、とりわけJNKストレス活性化キナーゼ経路に關与する活性の調節(すなわち封鎖、阻害もしくは刺激)においてもはっきりと有用である。従って、MLK7ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドを結合する化合物を同定することができる。

30

【0070】

本発明により提供されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの配列情報はまた、MLK7ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドが相互作用することができる結合化合物の同定も可能にする。結合化合物の同定方法は、溶液アッセイ、MLK7ポリペプチドが固定されるインビトロアッセイ、および細胞に基づくアッセイを包含する。MLK7ポリペプチドの結合化合物の同定は、正常および異常なMLK7の生物学的活性に関連する病変における治療的もしくは予防的介入に候補を提供する。

40

【0071】

本発明は、MLK7結合化合物を同定するためのいくつかのアッセイ系を包含する。溶液アッセイにおいて、本発明の方法は、i) MLK7ポリペプチドを1種もしくはそれ以上の候補結合化合物と接触させること、およびii) MLK7ポリペプチドに結合する化合物を同定することの段階を含んで成る。MLK7ポリペプチドを結合する化合物の同定は、MLK7ポリペプチド/結合化合物複合体を単離すること、および結合化合物をMLK7ポリペプチドから分離することにより達成することができる。結合化合物の物理的、生

50

物学的および／もしくは生化学的特性を特徴づけることの付加的な一段階もまた、本発明の他の態様で企図される。一局面において、MLK7ポリペプチド／結合化合物複合体を、MLK7ポリペプチドもしくは候補の結合化合物のいずれかに対し免疫特異的な抗体を使用して単離することができる。

【0072】

なお他の態様において、MLK7ポリペプチドもしくは候補の結合化合物のいずれかが、その単離を助長する標識 (label) もしくは標識 (tag) を含んで成り、そして、結合化合物の本発明の同定方法は、該標識 (label) もしくは標識 (tag) との相互作用によりMLK7ポリペプチド／結合化合物複合体を単離することの段階を包含する。この型の例示的一標識 (tag) は、そのように標識された化合物の単離を、ニッケルキレート形成を使用して可能にするポリヒスチジン配列、一般に約6個のヒスチジン残基である。当該技術分野で公知かつ慣例に使用されるFLAG^(R)標識 (tag) (イーストマン コダック (Eastman Kodak)、ニューヨーク州ロチェスター) のような他の標識 (label) および標識 (tag) が本発明により包含される。

10

【0073】

インビトロアッセイの一変法において、本発明は、i) 固定されたMLK7ポリペプチドを候補の結合化合物と接触させること、およびii) MLK7ポリペプチドへの候補化合物の結合を検出すること、の段階を含んで成る方法を提供する。代替の一態様において、候補の結合化合物が固定されそしてMLK7の結合が検出される。固定は、支持体、ビーズもしくはクロマトグラフィー樹脂への共有結合、ならびに抗体結合のような非共有の高親和性相互作用、または固定される化合物がビオチン部分を包含するストレプトアビジン／ビオチン結合の使用を包含する、当該技術分野で公知の方法のいずれかを使用して達成することができる。結合の検出は、i) 固定されない化合物上の放射活性標識を使用して、ii) 固定されない化合物上の蛍光標識を使用して、iii) 固定されない化合物に対し免疫特異的な抗体を使用して、もしくはiv) 固定される化合物が結合される蛍光支持体を励起する固定されない化合物上の標識、ならびに当該技術分野で公知かつ慣例に実施される他の技術を使用して、達成することができる。

20

【0074】

本発明はまた、MLK7ポリペプチドの結合化合物を同定するための細胞に基づくアッセイも提供する。一態様において、本発明は、細胞の表面上で発現されたMLK7ポリペプチドを候補の結合化合物と接触させること、およびMLK7ポリペプチドへの候補の結合化合物の結合を検出することの段階を含んで成る方法を提供する。好ましい一態様において、検出は、化合物の結合により引き起こされるカルシウムの流れもしくは細胞中の他の生理学的事象を検出することを含んで成る。

30

【0075】

MLK7の活性もしくは発現を調節する(すなわち増大させる、減少させる、もしくは封鎖する)作用物質は、MLK7ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含有する細胞とともに推定の調節物質をインキュベートすること、およびMLK7の活性もしくは発現に対する該推定の調節物質の影響を測定することにより同定することができる。MLK7の活性を調節する化合物の選択性は、MLK7に対するその影響を他のMLK化合物に対するその影響と比較することにより評価することができる。選択的調節物質は、例えば、抗体および他のタンパク質、ペプチド、またはMLK7ポリペプチドもしくはMLK7をコードするポリヌクレオチドに特異的に結合する有機分子を包含することができる。MLK7活性の調節物質は、正常なもしくは異常なMLK7活性が関与する疾患および病理学的状態の治療で治療上有用であることができる。本明細書に記述される方法の結果として同定される化合物(結合化合物ならびに／またはMLK7ポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチドの調節物質)は、限定されるものでないが、神経変性性疾患もしくは病状および炎症性の病状もしくは疾患を挙げることができるJNKストレス活性化キナーゼ経路に関係する疾患および病状の治療で有用である可能性がある。代表的な疾患もしくは病状は、限定されるものでないが、アルツハイマー病 (Zhu, J. Neurochem

40

50

、2001、76、435-441)、ハンチントン病(Yasudaら、Genes Cells, 1999、4、743-756; Liu, J. Biol. Chem., 1998、273、28873-28877)、多発性硬化症(Bonettiら、Am. J. Pathol., 1999、155、1433-1438)、ニューロパシー疼痛(Rauschら、Neuroscience, 2000、101、767-777)、パーキンソン病(Saporitoら、J. Neurochem., 2000、75、1200-1208)、外傷性脳傷害(Raghupathiら、J. Neurotrauma, 2000、17、927-938)、慢性関節リウマチ(Schettら、Arthritis Rheum., 2000、43、2501-2512)、神経発達の中のエタノール曝露(McAlhanyら、Brain Res. Dev., 2000、119、209-216)、膵炎(Hofkenら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000、276、680-685)、腎嚢胞(Arnouldら、J. Biol. Chem., 1998、273、6013-6018)、心血管系虚血(Forceら、Circ. Res., 1996、78、947-953)、高血圧(Xuら、J. Clin. Invest., 1996、97、508-514)、化学療法に誘発される内皮アポトーシス、膠芽腫(Potapovaら、J. Biol. Chem., 2000、275、24767-24775)、タモキシフェン耐性乳癌(Schiffら、J. Natl. Cancer Inst., 2000、92、1926-1934)、糖尿病における高血糖レベルから生じる内皮細胞の影響(Hoら、Circulation, 2000、101、2618-2624)などを挙げることができる。MLK7ポリヌクレオチドおよびポリペプチド、ならびにMLK7調節物質はまた、こうした疾患もしくは病状についての診断アッセイでも使用することができる。

10

20

30

40

【0076】

本発明の別の局面は、MLK7もしくはそれをコードするポリヌクレオチドを化合物と接触させること、および該化合物がMLK7もしくはそれをコードする核酸分子を結合するかどうかを決定することを含んで成る、MLK7もしくはMLK7をコードするポリヌクレオチドのいずれかに結合する化合物の同定方法に向けられる。結合は、限定されるものでないが、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, 1999、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ(John Wiley & Sons)、ニューヨーク(そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)に記述される、ゲルシフトアッセイ、ウェスタンブロット、放射標識競争アッセイ、ファージに基づく発現クローニング、クロマトグラフィーによる共分画、共沈殿、架橋、相互作用捕捉/2ハイブリッド分析、サウスウェスタン分析、ELISAなどを挙げることができる、当業者に公知である結合アッセイにより測定することができる。スクリーニングされるべき化合物は、限定されるものでないが、細胞外、細胞内、生物学的もしくは化学的起源を挙げることができる(MLK7もしくはそれをコードする核酸分子を結合することが疑われる化合物を包含してよい)。こうした試験で使用するMLK7ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドは、溶液中で遊離、固体支持体に結合される、細胞表面上を運ばれる、もしくは細胞内に配置される、または細胞の一部と会合されるのいずれかであってよい。当業者は、例えば、MLK7と試験されている化合物との間の複合体の形成を測定することができる。あるいは、当業者は、試験されている化合物により引き起こされるMLK7とその基質との間の複合体形成の減少を検査することができる。

【0077】

本発明の別の局面は、MLK7をある化合物と接触させること、および、該化合物がMLK7の活性を改変するかどうかを決定することを含んで成る、MLK7の活性を調節する(すなわち増大もしくは減少させる)化合物の同定方法に向けられる。比較された試験の存在下での活性は、試験化合物の非存在下での活性に対する尺度である。本発明のMLK7ポリペプチドの活性は、例えばキナーゼ活性、もしくは限定されるものでないがMKK4およびMKK7を挙げることができる特定の基質をリン酸化する能力を検査することにより測定することができる。

50

【0078】

本発明の好ましい態様において、MLK7活性を調節する化合物のスクリーニング方法は、試験化合物をMLK7と接触させること、および該化合物とMLK7との間の複合体の存在についてアッセイすることを含んで成る。こうしたアッセイにおいてはリガンドが典型的に標識される。適するインキュベーション後に、遊離のリガンドを結合された形態で存在するものから分離し、そして遊離のもしくは複合体形成されない標識の量が、MLK7に結合する特定の化合物の能力の尺度である。

【0079】

本発明により企図される候補調節物質は、潜在的活性化物質もしくは潜在的阻害剤のいずれかのライブラリーから選択される化合物を包含する。i) 化学物質のライブラリー、ii) 天然産物のライブラリーおよびiii) 無作為のペプチド、オリゴヌクレオチドもしくは小有機分子より構成されるコンビナトリアルライブラリーを包含する、小分子調節物質の同定に使用される多数の多様なライブラリーが存在する。化学物質のライブラリーは無作為の化学構造よりなり、そのいくつかは、既知化合物の類似物または他の薬物発見スクリーニングにおいて「ヒット(hit)」もしくは「リード(lead)」と同定された化合物の類似物であり、そのいくつかは天然産物由来であり、そしてそのいくつかは直接的でない(non-directed)合成有機化学から生じる。天然産物のライブラリーは：i) 土壌、植物もしくは海洋微生物からの培養液の醗酵および抽出、またはii) 植物もしくは海洋生物体の抽出によりスクリーニングのための混合物を創製するのに使用される微生物、動物、植物もしくは海洋生物体の集合体である。天然産物のライブラリーは、ポリケチド、非リボソームペプチドおよびそれらの(天然に存在しない)変異体を包含する。コンビナトリアルライブラリーは、混合物としての多数のペプチド、オリゴヌクレオチドもしくは有機化合物から構成される。これらのライブラリーは伝統的な自動化合成法、PCR、クローニングもしくは占有の合成法により製造するのが相対的に容易である。非ペプチドコンビナトリアルライブラリーがとりわけ興味深い。目的の他のライブラリーは、ペプチド、タンパク質、ペプチド模倣物、多平行(multiparallel)合成集合体、リコンビナトリアル(recombinatorial)およびポリペプチドのライブラリーを包含する。本明細書に記述される多様なライブラリーの使用による調節物質の同定は、活性を調節する「ヒット」の能力を至適化するような「ヒット」(もしくは「リード」)候補の改変を可能にする。

【0080】

試験リガンドの標的タンパク質への直接結合を測定することにより標的タンパク質のリガンドを同定するアッセイ、ならびにイオンスプレー質量分析/HP LC法もしくは他の物理的および分析方法を用いる親和性限外濾過により標的タンパク質のリガンドを同定するアッセイを包含する他のアッセイを、MLK7ポリペプチドに結合するもしくはその活性を調節する化合物を同定するのに使用することができる。あるいは、こうした結合相互作用は、Fieldsら, Nature, 1989, 340, 245-246、およびFieldsら, Trends in Genetics, 1994, 10, 286-292(それらの双方はそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)に記述される酵母2ハイブリッド系を使用して間接的に評価される。

【0081】

特定の一態様において、本発明のスクリーニング方法により同定される新規化合物は低分子量有機分子であり、この場合に、組成物もしくは製薬学的組成物を経口摂取用として、例えば錠剤として調製することができる。本明細書に記述されるスクリーニング法により同定される核酸分子、ベクター、ポリペプチド、抗体および化合物を含んで成る組成物もしくは製薬学的組成物は、限定されるものでないが、経口、静脈内、皮膚、皮下、鼻、筋肉内もしくは腹腔内を挙げることをいづれかの投与経路のために製造することができる。担体もしくは他の成分の性質は、特定の投与経路、および投与されるべき本発明の特定の態様に依存することができる。この状況で有用である技術およびプロトコルの例は、とりわけ、Remington's Pharmaceutical Science

10

20

30

40

50

s, 第16版, Osol, A(編), 1980(そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)で見出される。

【0082】

これらの低分子量化合物の投薬量は、治療されるべき疾患状態もしくは病状、ならびにヒトもしくは動物の体重および病状のような他の臨床的要因、ならびに該化合物の投与経路に依存することができる。ヒトもしくは動物を治療するために、およそ0.5mg/kg体重ないし500mg/kg体重の間、およそ1.0mg/kg体重ないし100mg/kg体重の間、もしくはおよそ10mg/kg体重ないし50mg/kg体重の間の化合物を投与することができる。治療は、典型的にはより低い投薬量で投与し、そして所望の治療転帰が観察されるまで継続する。適正投薬量は、治療されている疾患の型、使用されている特定の組成物、ならびに患者の大きさおよび生理学的状態のような多様な因子に依存する。本明細書に記述される化合物の治療上有効な用量は、当初は、細胞培養物および動物のモデルから推定することができる。例えば、細胞培養物アッセイで決定されるところのIC₅₀を最初に考慮に入れる循環濃度範囲を達成するように、用量を動物モデルで処方することができる。動物モデルのデータを使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。

10

【0083】

本発明の別の局面は、MLK7、およびMLKタンパク質のいずれかを含有するヘテロ二量体に向けられる。ファミリーメンバー間のロイシンジッパー依存性のヘテロ二量体の報告が存在する。例えば、MLK3は共発現されたMLK2を共免疫沈降させることができる(Leungら, J. Biol. Chem., 1998, 273, 32408-32415)。同一細胞中での共発現は、これらのタンパク質のヘテロ二量体ならびにホモ二量体をもたらす可能性がある。ヘテロ二量体はホモ二量体に比較して独特の活性を有しかつ上述された方法でのスクリーニングのための付加的な標的を表す可能性がある。

20

【0084】

本明細書に開示される発明がより効率的に理解されることができるよう、実施例を下に提供する。これらの実施例は具体的説明の目的上のみであり、そしていかなる様式でも本発明を制限すると解釈されるべきでないことが理解されるべきである。これらの実施例を通じて、分子クローニング反応および他の標準的組換えDNA技術は、別の方法で示される場合を除き、商業的に入手可能な酵素を使用して、Manitatisら, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 第2版, コールドスプリングハーバープレス(Cold Spring Harbor Press)(1989)(下で「Manitatisら」)に記述される方法に従って実施した。下の実施例1および2は実際である。実施例3は予言的である。

30

【実施例】

【0085】

実施例1: ヒトMLK7をコードするポリヌクレオチドの単離

A. ヒトMLK7をコードするcDNAの単離

最近付加されたヒトゲノムDNA配列の調査は、混合系統キナーゼファミリーの推定の第7のメンバーを示した。MLK7と呼称されるこのヒトキナーゼは、第一染色体のq42.2-q43への完了されたゲノム配列マッピング、ジェンバンク(Genbank)受託番号AL133380で見出された。推定のキナーゼドメインの整列は、このタンパク質を、その最も近い関係物(relationships)MLK1および3に対する76%の相同性を伴い、以前に定義されたMLK1-3サブファミリーに置く。図2に示される推定のロイシンジッパー領域もまた、このタンパク質を、わずか6アミノ酸伸長により分離される4個の推定の - らせん反復を有するそのサブファミリー中に置くとみられる。完全長タンパク質はMLK1と最高の相同性を有し(44%の同一性)、これは該タンパク質の推定のNおよびC末端双方の試験的同定を可能にするのに十分であった。2個のみの最近寄託されたMLK7 ESTがジェンバンク(Genbank)に存在し(胃からの受託番号AW813675およびリンパ組織(胚中心B細胞)からのAW408639)、

40

50

このゲノム領域が発現されそして偽遺伝子でなかったことの付加的な証明を必要とした。MLK7をコードするcDNAの部分を含むクローンを、プールされたヒト副腎、成体脳、腎、肝、リンパ節、脾、前立腺および胃のcDNAライブラリー（エッジ バイオシステムズ（Edge Biosystems））のPCRスクリーニングを使用して得た。該ライブラリーをスクリーニングするのに使用されたPCRプライマーは、5' - ATG A A G A A T G C T G G C A A C A A G A C C C T C - 3'（配列番号4）および5' - A G G T A A A C T G A T T C G A T G T C C A T C T T T G - 3'（配列番号5）であった。該cDNAの中央部分をコードする1つの部分的cDNAを反復して単離した。他のクローンはゲノム配列を含むか、もしくは無関係であった。これらのデータは、このcDNAがこれらのライブラリー中で非常に低い豊富さ（abundance）のものであることと矛盾しない。この配列をその後、MLK1との相同性に基づくPCRにより5'および3'端で伸長させた。5' RACEによる伸長もまた試みたが、しかし、このcDNAの低い豊富さおよび例外的に高いGC含量により不成功であった。

10

【0086】

完全長ヒトMLK7 cDNAをpcDNA6-V5Hisプラスミド（インヴィトロジェン（Invitrogen））中に集成した。該プラスミドは、C末端エピトープおよび親和性精製融合パートナーと同じ読み枠で完全長のヒトcDNA（終止コドンに伴わない）を含むし、そしてpcDNA6-hMLK7と同定される。このプラスミド、pcDNA6-hMLK7を、受託番号ATCCのもとに2001年5月24日にアメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection）、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209への寄託のため提出した。ヒトMLK7の完全長cDNAおよび推定されるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1および2に提供する。

20

B. 混合系統キナーゼファミリーのメンバーとの構造比較

混合系統キナーゼファミリーの6メンバーのキナーゼドメインを、MLK7の推定のキナーゼドメインと整列されて示す（図1）。チロシンキナーゼ、セリン/トレオニンキナーゼもしくは双方で保存されるアミノ酸を呼称されたとおり示す（Hanksら, Meth. Enzymol., 1991, 200, 38-62からのコンセンサスアミノ酸）。MLK7は、混合系統キナーゼファミリーの他のメンバー同様、キナーゼドメインの大部分を通じてチロシンキナーゼと相同性を共有する。サブドメインVIbの触媒ドメインの配列HRDLKSRN（配列番号3）中のリシンの存在は、MLKファミリーの他のメンバー同様、これがセリン/トレオニンリン酸化を触媒するとみられることを示唆する。MegAlignプログラム（レーザーゲン（Laser gene）DNASTAR）中のクラスタル（Clustal）法（PAM250残基重み表（residue weight table）を用いる）を使用するこれらのキナーゼドメインの整列は、MLK7がMLK1-3サブファミリーのメンバーであることを予測する（図2）。MLKファミリーのキナーゼドメイン間の相同性パーセントを表1に示す。

30

【0087】

【表1】

表1

キナーゼドメイン	MLK1	MLK2	MLK3	MLK7	DLK	LZK	MLK6
MLK1	-----	75.4%	77.7%	75.4%	42.9%	41.7%	42.0%
MLK2	-----	-----	76.5%	73.1%	44.6%	42.5%	41.6%
MLK3	-----	-----	-----	76.2%	42.5%	42.5%	40.0%
MLK7	-----	-----	-----	-----	38.3%	39.2%	40.4%
DLK	-----	-----	-----	-----	-----	87.1%	37.1%
LZK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	35.4%
MLK6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

10

【0088】

完全長のMLK7タンパク質は、キナーゼドメインのものより、該ファミリーに対するより弱い相同性（上述されたと同一の分析を使用して）を示す（表2）。

【0089】

【表2】

表2

完全長	MLK1	MLK2	MLK3	MLK7	DLK	LZK	MLK6 α
MLK1	-----	49.0%	43.6%	43.1%	22.2%	19.4%	20.1%
MLK2	-----	-----	44.3%	41.8%	23.6%	19.7%	19.6%
MLK3	-----	-----	-----	44.9%	22.7%	20.3%	18.8%
MLK7	-----	-----	-----	-----	19.1%	18.6%	18.5%
DLK	-----	-----	-----	-----	-----	50.5%	18.8%
LZK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	17.6%
MLK6 α	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

30

【0090】

キナーゼドメインに対しN末端に推定のSH3ドメインが存在する。キナーゼドメインに対しC末端に推定の二重ロイシンジッパー領域、次いで数種のタンパク質からの核局在化シグナルに類似の圧倒的に優勢な塩基性アミノ酸から構成される小さい領域もまた存在する。推定のロイシンジッパー領域（図4）もまた、MLK7をMLK1-3サブファミリーに置き、わずか6アミノ酸伸長により分離される4個の推定の - らせん反復を有する。完全長のタンパク質はMLK1との高い相同性を有し（43.1%）、これは該タンパク質の推定のNおよびC末端双方の同定を可能にするのに十分であった。この相同性を使用して、完全長のMLK7 cDNAをクローン化した。MLK7のドメイン構造を図3に示す。MLK7のロイシンジッパー領域の配列を図4に示しかつ他のMLKタンパク質と比較する。

40

C. hMLK7の発現プロファイル

hMLK7の組織分布を、RapidScanTM遺伝子発現パネル（オリジン（Origene））を使用して評価した。RapidScanTMは、24種の異なる組織由来の第一鎖cDNAを使用して96穴プレートの形式での発現プロファイルを生成させるための、PCRに基づくアプローチである。これら24種のcDNAを、PCRの直線範囲内での増幅および可視化を可能にする4対数希釈で配列する。該プロトコルは、PCR反応が、遺伝子特異的プライマー対を使用しかつ増幅をアガロースゲル上で可視化する、96穴サーマルサイクラーで実施されることを必要とする。表3は、パネルの二重のスクリ

50

ーニングから得られた定性的データを示す。

【 0 0 9 1 】

【 表 3 】

表3

組織	端のプライマー対	
脳	++	
心	+	
腎	++	10
脾	-	
肝	++	
結腸	++	
肺	++	
小腸	+	
筋	+	
胃	++	
精巣	++	
胎盤	-	
唾液腺	++	
甲状腺	+	20
副腎	++	
膵	++	
卵巣	+	
子宮	-	
前立腺	+	
皮膚	-	
末梢血白血球	+	
骨髄	+	
胎児脳	+	
胎児肝	+	30

【 0 0 9 2 】

これらの実験は、プライマー対 A T G A A A G A A T G C T G G C A A C A A G A C C C T C (配列番号 4) および A G G T A A A C T G A T T C G A T G T C C A T C T T T G (配列番号 5) を利用した。この M L K 7 分析における ++ の得点は、2 種の最高の c D N A 濃度での可視的 P C R 産物を示す。組織スクリーニングの半分以上がほとんどもしくは全くない検出可能な産物を生じ、これは M L K 7 m R N A がいかなる組織中でも高い豊富さにないことを示唆した。

40

実施例 2 : 生物学的に活性の M L K 7 の組換え発現

A . 哺乳動物細胞中での完全長の M L K 7 発現による J N K 経路の活性化

哺乳動物細胞中で過剰発現される M L K ファミリーメンバーは c J u n - N H 2 末端キナーゼ (J N K) 経路を活性化する (H i r a i ら , 1 9 9 7 , J . B i o l . C h e m . , 2 7 2 , 1 5 1 6 7 ; M e r r i t t ら , 1 9 9 9 , J . B i o l . C h e m . , 2 7 4 , 1 0 1 9 5) 。完全長 M L K 7 が同一のことをなすかどうかを決定するために、C H O 細胞を、M L K 7 の構成的発現および J N K 1 の構成的発現を駆動するプラスミドでコトランスフェクトし、E L I S A によりライセート中の J N K 活性を測定した。

【 0 0 9 3 】

完全長の M L K 7 のコーディング領域を、C 末端 V 5 エピトープおよび H i s ₆ 親和性精

50

製融合パートナーと同じ読み枠で哺乳動物発現ベクター p c D N A 6 V 5 / H i s A (インヴィトロジェン (Invitrogen)) に挿入した。各プラスミドを、製造元の推奨に従って、試薬リポフェクタミンプラス (Lipofectamine PLUS) (ライフ テクノロジーズ (Life Technologies)) を使用して、6 穴皿中にプレーティングされた CHO 細胞に、JNK1 発現ベクターとともにコトランスフェクトした。二重の培養物を各条件についてトランスフェクトした。陽性対照として、MLK3 の発現ベクターを MLK7 の代わりに用い；陰性対照として、空 (empty) ベクター (タンパク質コーディング領域なし) を代わりに用いた。トランスフェクション 2 日後に、血清使用量低減培地 (DMEM および 0.5 % ウシ胎児血清) 中で、細胞を 3 濃度 (250 nM、1 μ M および 5 μ M) の CEP11004 もしくは DMSO ベヒクル対照で 6 時間処理した。この処理の終了時に、細胞を氷冷リン酸緩衝生理的食塩水で 2 回洗浄し、そして、ウェルあたり 0.1 ml の 1 % (v/v) トリトン (Triton) X-100、20 mM トリス pH 7.6、50 mM NaCl、プロテアーゼ阻害剤カクテル (1 mM ペファブロック (Pefablock) SC、10 μ M E-64、10 μ M ロイペプチン、10 μ M ペプスタチン A、1 mM EDTA) およびホスファターゼ阻害剤カクテル (25 mM - グリセロリン酸、2 mM 活性化オルトバナジン酸ナトリウム) で溶解した。トランスフェクトされた細胞のライセート中の JNK 活性を、受容体チロシンキナーゼについて記述されたところの ELISA に基づく形式 (Angelès ら, 1996, Anal. Biochem., 236, 49-55) を使用して測定した。JNK 基質 cJun (残基 1-79) の NH2 末端を GST 融合タンパク質として大腸菌 (E. coli) 中で発現させ、そして標準的グルタチオン親和性法により精製した。Smith ら, Gene, 1988, 67, 31-40。96 穴マイクロタイタープレート (フルオロヌンク (Fluoronunc) マキシソープ (Maxisorp)) を基質溶液 (トリス緩衝生理的食塩水中 10 μ g/ml の GST-cJun) で被覆し、その後洗浄緩衝液 (トリス緩衝生理的食塩水中 0.05 % トウイーン (Tween) - 20) で数回洗浄した。プレートを、ブロッキング緩衝液 (トリス緩衝生理的食塩水中 3 % BSA および 0.2 % トウイーン (Tween) - 20) で 37°C で 1 時間ブロッキングし、その後洗浄緩衝液で数回洗浄した。その後、濃縮されたアッセイ緩衝液、次いで各サンプルについて等しいタンパク質に相当するライセートを各ウェルに添加した。キナーゼ反応を、ATP を 50 μ M まで添加すること、および 37°C で 15 分間インキュベートすることにより開始した。最終アッセイ混合物 (ウェルあたり 100 μ l) は、20 mM HEPES、pH 7.4、0.02 % BSA、20 mM MgCl₂、2 mM DTT、5 mM EGTA、25 mM - グリセロリン酸、0.1 mM 活性化オルトバナジン酸ナトリウムおよび 50 μ M ATP を含有した。キナーゼ反応を、83 mM までの EDTA の添加により終了させ、そしてプレートを洗浄緩衝液で数回洗浄した。リン酸化された生成物を、抗ホスホ-cJun (Ser73) 抗体 (NEB 9164、ブロッキング緩衝液中 5000 倍) とのインキュベーション、洗浄、ヤギ抗ウサギ IgG アルカリホスファターゼ結合物 (サザン バイオテクノロジー アソシエーツ (Southern Biotechnology Associates) #4050-04; ブロッキング緩衝液中 2500 倍) とのインキュベーション、洗浄、および 37°C で 30 分間の蛍光発生性 (fluorogenic) アルカリホスファターゼ基質 4-メチルウンベリフェリルホスフェート (1.0 mM ジエタノールアミン、pH 9.6、5 mM MgCl₂ 中 0.02 mg/ml) との反応により検出した。反応を 1.0 M 二塩基性リン酸ナトリウムで停止し、そして生成物をマイクロプレートリーダー (サイトフルオル (Cytofluor)、励起 360 nm、発光 460 nm) で測定した。予備的 ELISA を実施して、直線状シグナルを生じたライセートタンパク質の最大量を決定した。この実験で、MLK3 が制限するサンプルであり、80 ng までのみのライセートタンパクが直線性を維持した。その後、アッセイを 80 ng の各ライセートで実施した。

10

20

30

40

50

【0094】

MLK7 の発現を、V5 エピトープ標識に対する抗体で細胞ライセートのウェスタンブロ

ットをブローピングすることにより確認した（データは示されない）。MLK7は120 kDaに対応する見かけの移動度で出現した（117.4 kDaと期待される）。MLK7の発現は、JNK活性を、ベクター対照を上回り上昇させた（図5）。MLK7でトランスフェクトされた細胞の、CEP11004での処理は、この処理がMLK3でトランスフェクトされた細胞になすまにそのとおりにJNK活性を部分的に低下させた。これらのデータは、MLK7が、他のMLKファミリーメンバーとまさに同様に、およびインビトロデータにより予測されるまにそのとおりに、哺乳動物細胞中でJNK経路を活性化することを確認する。

B. 組換えGST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{MD/LZ}のインビトロ活性
キナーゼドメイン（アミノ酸93-416）もしくはキナーゼドメイン/ロイシンジッパー（アミノ酸93-489）のいずれかをコードするヒトMLK7タンパク質の一部分を、標準的方法（例えば、Meyerら, J. Neurochem., 1994, 62, 825-833）を使用してSf21昆虫細胞中でNH₂末端GST融合パートナーとともに発現させ、そしてグルタチオン親和性精製法（Smithら, Gene, 1988, 67, 31-40）を使用して精製した。バキュロウイルスのヒトGST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{KD/LZ}のキナーゼ活性を、3種の異なる基質、すなわちキナーゼが死んだ（kinase-dead）形態のGST-MKK4およびGST-MKK7、ならびにミエリン塩基性タンパク質（MBP）を使用して立証した。加えて、2種のGST-MLK7の形態によるJNK経路の活性化の活性化がインビトロで示された。GST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{KD/LZ}双方が、不活性化されたMLL4をリン酸化することが可能であり、そしてこのリン酸化事象の結果として、MKK4が活性化され、そしてそのタンパク質基質GST-JNK1₁（K55A）をリン酸化することが可能であった。類似の結果が、不活性化されたMKK7をMLK7の下流の標的として使用した場合に得られた。

C. ミエリン塩基性タンパク質のリン酸化

バキュロウイルスのGST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{KD/LZ}のキナーゼ活性を、プロテインキナーゼCについて記述された（Pittら, J. Biomol. Screening, 1996, 1: 47-51）ところのミリポア（Millipore）マルチスクリーン（Multiscreen）TCA「プレート中（in-plate）」形式を使用して個別に評価した。簡潔には、各50 μlのアッセイ混合物は、20 mM Hepes, pH 7.2、5 mM EGTA、15 mM MgCl₂、1 mM DTT、25 mM -グリセロリン酸、100 μM ATP、0.25 μCi [γ-³²P]ATP、500 μg/ml ミエリン塩基性タンパク質（UBI #13-104）および0.1~5 μg/mlのバキュロウイルスのGST-MLK7_{KD}（もしくはGST-MLK7_{KD/LZ}）を含有した。サンプルを37°Cで15分間インキュベートした。氷冷50% TCAを添加することにより反応を停止し、そしてタンパク質を4°Cで30分間沈殿させた。その後、プレートを氷冷25% TCAで洗浄した。スーパーミックス（Supermix）シンチレーションカクテルを添加し、そして、プレートを、ワラック（Wallac）マイクロベータ（MicroBeta）1450 PLUSシンチレーション計数器を使用して計数する前に1~2時間平衡化させた。

【0095】

GST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{KD/LZ}双方が、包括的タンパク質キナーゼ基質、ミエリン塩基性タンパク質をリン酸化することが可能であった（図6）。形成されるリン酸化された生成物の量（放射活性カウントとして報告される）はアッセイで使用する酵素の量に依存した。バキュロウイルスのGST-KLM3_{KD}を、混合系統キナーゼファミリーのメンバーによるミエリン塩基性タンパク質のリン酸化を示すために、この分析において対照酵素として使用した。

D. キナーゼ不活性のGST-MKK4およびGST-MKK7のリン酸化

JNK経路中の2種の既知のMAPKKタンパク質のキナーゼ不活性バージョン、MKK4およびMKK7を、細菌中でN末端GST融合パートナーとともに完全長タンパク質と

して発現させ、そして標準的グルタチオン親和性精製プロトコルを使用して精製する。Smithら, Gene, 1988, 67, 31-40。これらを使用してMLK7のキナーゼドメインの活性化を評価する。

【0096】

バキュロウイルスのヒトGST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{KD/LZ}のキナーゼ活性の評価を、受容体チロシンキナーゼについて記述されたELISAに基づくアッセイ(Angellesら, Anal. Biochem., 1996, 236, 49-55)の変法を使用して実施した。96穴マイクロタイタープレート(フルオロヌンク(Fluorobond NUNC)マキシソープ(Maxisorp))を、20 µg/mlの基質溶液(トリス緩衝生理的食塩水中GST-MKK4(K113A)もしくはGST-MKK7 1(K149A))で4℃で一夜被覆した。その後、プレートをブロッキング緩衝液(0.05%トウイン(Tween)-20を含有するトリス緩衝生理的食塩水中3%BSA)で37℃で1時間ブロッキングした。20 mM Hepes、pH 7.2、50 µM ATP、15 mM MgCl₂、1 mM DTT、5 mM EGTAおよび25 mM -グリセロリン酸を含有する100 µlのアッセイ混合物をその後プレートに添加した。キナーゼ反応を、10~100 ng/mlの組換えヒトバキュロウイルスGST-MLK7_{KD}もしくはGST-MLK7_{KD/LZ}を添加することにより開始し、そしてプレートを37℃で15分間インキュベートさせた。リン酸化された産物を、ブロッキング緩衝液中5000倍希釈のホスホトレオニン抗体(NEB #226-1)を添加することにより検出した。37℃で1時間インキュベーション後に、100 µlのブロック緩衝液中20000倍希釈のユーロピウム-N1標識抗ウサギ抗体(ワラック(Wallac) #AD0105)を添加し、そしてプレートを37℃で別の1時間インキュベートした。その後、低pH増強溶液(ワラック(Wallac) #1244-105)を添加し、そしてプレートを室温で5分間穏やかに攪拌した。生じる溶液の蛍光を、ビクター(Victor) 2マルチラベル カウンター(Multilabel Counter)(モデル#1420-018)を使用して測定した。

【0097】

セリン/トレオニンタンパク質キナーゼの混合系統キナーゼサブファミリーのメンバーは、MKK4(Ranaら, J. Biol. Chem., 1996, 271, 19025-19028; Hiraら, J. Biol. Chem., 1997, 272, 15167-15173)、ならびにMKK7(Hiraら, J. Biol. Chem., 1998, 273, 7406-7412; Merrittら, J. Biol. Chem., 1999, 274, 10195-10202)をリン酸化かつ活性化することが示されている。これら2種のMKKタンパク質を、従って、バキュロウイルスのGST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{KD/LZ}の酵素活性を検査するために利用した。図7に示されるとおり、双方の形態のバキュロウイルスのGST-MLK7は、2種のMKKタンパク質基質すなわちGST-MKK4(K113A)およびGST-MKK7(K149A)のリン酸化を触媒した。生成物の形成(蛍光単位として報告される)は使用された酵素の濃度に比例した。比活性に関して、双方のGST-MLK7の形態はGST-MLK3_{KD}(対照酵素)より少なく活性であり、GST-MLK7_{KD}はGST-MLK7_{KD/LZ}より約2倍より高い活性を表した。他のMLK反応に一致して、GST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{KD/LZ}双方の活性はEDTAにより阻害され、金属イオン(Mg²⁺)に対する要件を賦与した(データは示されない)。ここで記述されるELISAに基づくアッセイはMLK7の阻害剤を同定するために潜在的に利用することができる。E. GST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{KD/LZ}によるJNK経路のインビトロ活性化

双方の形態のMLK7がインビトロでMKK4およびMKK7をリン酸化することが可能であった(図7)ため、MLK7は、MLKファミリーの他のメンバーと同様、JNK/SAPK経路を活性化することができる(Tibblesら, EMBO J., 1996, 15, 7026-7035; Hiraら, J. Biol. Chem., 1997, 27

10

20

30

40

50

2, 15167 - 15173; Hiraï, J. Biol. Chem., 1998, 273, 7406 - 7412)。MLK7がMKK4の直接活性化物質であることを立証するために、インビトロキナーゼカスケード反応を実施した。この系は、組換えGST-MLK7、不活性化されたMKK4/7、およびキナーゼ不活性のGST-JNK1-1(K55A)を利用し、そして、MKK4/7のMLK7に触媒されるリン酸化/活性化を、活性化されたMKK4/7による不活性のGST-JNK1のリン酸化に結び付けた。

【0098】

アッセイは、最初に、20mM HEPES、pH7.2、50μM ATP、15mM MgCl₂、1mM DTT、5mM EGTAおよび25mM -グリセリン酸を含有するキナーゼ反応混合物中で、不活性化されたMKK4/7をGST-MLK7_{KD}もしくはGST-MLK7_{KD/LZ}とともに37℃で15分間インキュベートすることにより実施した。GST-MLK3_{KD}は対照酵素として利用した。この混合物のアリコート(前活性化されたMKK4/7;生成物1)を、MKK4/7アッセイ混合物を含有するポリプロピレン製の未処理の96穴マイクロタイタープレートに添加した。MKK4/7反応は、キナーゼが死んだGST-JNK1-1(K55A)の添加を除き、GST-MLK7反応と同一のアッセイ緩衝液を利用した。反応を37℃で15分間進行させ、その後100mM EDTAで停止させた(生成物2)。リン酸化されたJNK1の分析を、生成物2をフルオロヌンク(Fluoronunc)マキシソープ(Maxisorp)96穴マイクロタイタープレートに移すことにより実施した。37℃で1時間インキュベーション後に、プレートをTBST中3%BSAでブロッキングした。検出抗体、ホスホ特異的JNK抗体(プロメガ(Promega)#V7931/2)を添加し、そしてプレートを37℃で1時間インキュベートした。二次抗体、Eu-N1標識抗ウサギ抗体(ワラック(Wallac)#AD0105)の添加が直ちに続き、そしてプレートを37℃で別の1時間インキュベートした。低pH増強溶液(ワラック(Wallac)#1244-105)をその後添加し、そして生じる溶液の蛍光を、ビクター(Victor)2マルチラベルカウンター(Multilabel Counter)(モデル#1420-018)を使用して測定した。

【0099】

図8(棒7および8)に示されるとおり、GST-MLK7_{KD}およびGST-MLK7_{KD/LZ}双方がMKK4をリン酸化することが可能であり、そして、このリン酸化事象の結果として、MKK4は活性化され、また、そのタンパク質基質GST-JNK1-1(K55A)をリン酸化することが可能であった。類似の結果が、MLK7の下流の標的としてのMKK7で観察された(図8、棒10および11)。MLK3(対照酵素;図8の挿入図を参照されたい)に関して、MLK7_{KD}およびMLK7_{KD/LZ}に駆動されるJNK活性化シグナルはより弱く、これらの酵素調製物の観察されたより低い比活性を反映した(図6および7)。全体として、インビトロのデータは、MLK7がMKK4/7をリン酸化かつ活性化することができ、それによりJNK/SAPK経路中でMAPKKキナーゼとして作用することを示す。

実施例3: 阻害剤についてスクリーニングするためのGST-MLK7_{KD}酵素アッセイを使用することの実行可能性

MLKの酵素活性を、MBPリン酸化アッセイでさらに評価し、そしてATPおよびMBPの見かけのミカエリス定数(K_m)を決定することができる。ATPおよびMBPの見かけのK_m値は、それぞれ約103μMおよび21μMであると期待される。これらの値をMLK1-3について得られた値と比較することができる。それらのタンパク質は、キナーゼドメイン、もしくはN末端GST融合パートナーを伴うキナーゼおよびロイシンジッパードメインのいずれかの短縮としてもまた発現される。

【0100】

MLK7活性の初期評価を、放射活性MBPリン酸化アッセイを使用して実施する。ELISAアッセイを、動的および阻害研究を実施するためにより低い酵素濃度で十分なシグナルを得るために採用する。

10

20

30

40

50

【0101】

ELISAアッセイプロトコル：アッセイは、トリス緩衝生理的食塩水（TBS）で希釈された $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のGST-MKK4（キナーゼが死んだ突然変異体）で被覆された96穴フルオロヌンク（Fluoronunc）マキシソープ（Maxisorp）ELISAプレートで実施する。被覆は、MKK4基質をウェル中で加湿チャンバー中4℃で16時間静置させることにより達成する。被覆した後に、過剰の緩衝液を吸引し、プレートを0.05%トゥイーン（Tween）20（v/v）を含有するTBSで3回洗浄し、そしてTBS-T中3%BSA（w/v）（ $200\mu\text{l}$ /ウェル）で37℃で1時間ブロッキングする。全部のその後のインキュベーションは、 $100\mu\text{l}$ /ウェルの容量を使用して加湿チャンバー中37℃で1時間実施する。ブロッキングした後にプレートをTBS-TおよびTBSでそれぞれ3回洗浄する。キナーゼ反応は、20mM HEPES、pH7.4、30 μM ATP、15mM MgCl_2 、1mM DTT、0.1mM Na_3VO_4 、5mM EGTAおよび25mM -グリセロリン酸（90 μl /ウェル）、ならびに50ng/mlのGST-MLK7_{KD}（10 μl /ウェル）中、37℃で30分間実施する。陰性対照として、0.5M EDTA（30 μl /ウェル）を、インキュベーション前に反応に添加する。プレートをTBS-Tで3回洗浄し、そしてリン酸化されたMKK4を検出するポリクローナル抗体226.1（ニューイングランドバイオラプス（New England Biolabs））を、ブロッキング緩衝液中5000倍希釈でウェルに添加する。インキュベーション後にプレートを洗浄し、そしてアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ二次抗体を、ブロッキング緩衝液中2500倍希釈で添加する。1時間のインキュベーションおよびプレート洗浄後に、4-メチルウンベリフェリルホスフェート（0.2mg/mlの最終濃度）をウェルに添加し、そして45分間発色させる。反応を0.5M Na_2HPO_4 で終了させ、そして360nmの励起波長および460nmの発光波長で蛍光プレートリーダーで読み出す。

10

20

30

【0102】

ELISAの至適化：ELISAを、基質の好みおよびコーティング濃度、一次抗体希釈ならびに蛍光発生性基質の発色時間に関して至適化する。マグネシウムイオンの要件、還元剤に対する感受性およびDMSOもまた評価することができる。MKK4およびMKK7双方の、キナーゼが死んだ突然変異体は、GST-MLK7_{KD}によるリン酸化に適する基質であり、そして増大する基質濃度とのシグナル強度の用量依存性の増大を立証すると期待される。その後の実験は基質として $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のMKK4を使用して慣例に実施する。一次抗体226.1（ニューイングランドバイオラプス（New England Biolabs））希釈物をアッセイし、そして、ELISAに使用される条件下で、5000倍希釈が至適であると決定した。

【0103】

2種の参照キナーゼ阻害剤、K252aおよびスタウロsporinを、GST-MLK7_{KD}活性を阻害するそれらの能力について検査することができる。

【0104】

本文書で引用もしくは記述される各特許、特許出願および刊行物の開示は、これによりそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる。

40

【0105】

本発明の多様な改変が、本明細書に記述されるものに加えて、前述の記述から当業者に明らかであろう。こうした改変もまた、付属として付けられる請求の範囲の範囲内にあることを意図している。

【表4】

ホリスクレオト配列(配列番号1)

ATG GCT TTG CGG GGC GCC GCG GGA GCG ACC GAC ACC CCG GTG 42	
Met Ala Leu Arg Gly Ala Ala Gly Ala Thr Asp Thr Pro Val	
TCC TCG GCC GGG GGA GCC CCC GGC GGC TCA GCG TCC TCG TCG 84	
Ser Ser Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala Ser Ser Ser	
TCC ACC TCC TCG GGC GGC TCG GCC TCG GCG GGC GCG GGG CTG 126	
Ser Thr Ser Ser Gly Gly Ser Ala Ser Ala Gly Ala Gly Leu	
TGG GCC GCG CTC TAT GAC TAC GAG GCT CGC GGC GAG GAC GAG 168	10
Trp Ala Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Glu Asp Glu	
CTG AGC CTG CGG CGC GGC CAG CTG GTG GAG GTG CTG TCG CAG 210	
Leu Ser Leu Arg Arg Gly Gln Leu Val Glu Val Leu Ser Gln	
GAC GCC GCC GTG TCG GGC GAC GAG GGC TGG TGG GCA GGC CAG 252	
Asp Ala Ala Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp Trp Ala Gly Gln	
GTG CAG CGG CGC CTC GGC ATC TTC CCC GCC AAC TAC GTG GCT 294	
Val Gln Arg Arg Leu Gly Ile Phe Pro Ala Asn Tyr Val Ala	
CCC TGC CGC CCG GCC GCC AGC CCC GCG CCG CCG CCC TCG CGG 336	20
Pro Cys Arg Pro Ala Ala Ser Pro Ala Pro Pro Pro Ser Arg	
CCC AGC TCC CCG GTA CAC GTC GCC TTC GAG CGG CTG GAG CTG 378	
Pro Ser Ser Pro Val His Val Ala Phe Glu Arg Leu Glu Leu	
AAG GAG CTC ATC GGC GCT GGG GGC TTC GGG CAG GTG TAC CGC 420	
Lys Glu Leu Ile Gly Ala Gly Gly Phe Gly Gln Val Tyr Arg	
GCC ACC TGG CAG GGC CAG GAG GTG GCC GTG AAG GCG GCG CGC 462	
Ala Thr Trp Gln Gly Gln Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg	
CAG GAC CCG GAG CAG GAC GCG GCG GCG GCT GCC GAG AGC GTG 504	
Gln Asp Pro Glu Gln Asp Ala Ala Ala Ala Ala Glu Ser Val	
CGG CGC GAG GCT CGG CTC TTC GCC ATG CTG CGG CAC CCC AAC 546	30
Arg Arg Glu Ala Arg Leu Phe Ala Met Leu Arg His Pro Asn	
ATC ATC GAG CTG CGC GGC GTG TGC CTG CAG CAG CCG CAC CTC 588	
Ile Ile Glu Leu Arg Gly Val Cys Leu Gln Gln Pro His Leu	
TGC CTG GTG CTG GAG TTC GCC CGC GGC GGA GCG CTC AAC CGA 630	
Cys Leu Val Leu Glu Phe Ala Arg Gly Gly Ala Leu Asn Arg	
GCG CTG GCC GCT GCC AAC GCC GCC CCG GAC CCG CGC GCG CCC 672	
Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Ala Pro Asp Pro Arg Ala Pro	
GGC CCC CGC CGC GCG CGC CGC ATC CCT CCG CAC GTG CTG GTC 714	40
Gly Pro Arg Arg Ala Arg Arg Ile Pro Pro His Val Leu Val	
AAC TGG GCC GTG CAG ATA GCG CGG GGC ATG CTC TAC CTG CAT 756	
Asn Trp Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Leu Tyr Leu His	

【表 5】

GAG GAG GCC TTC GTG CCC ATC CTG CAC CGG GAC CTC AAG TCC 798	
Glu Glu Ala Phe Val Pro Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Ser	
AGC AAC ATT TTG CTA CTT GAG AAG ATA GAA CAT GAT GAC ATC 840	
Ser Asn Ile Leu Leu Leu Glu Lys Ile Glu His Asp Asp Ile	
TGC AAT AAA ACT TTG AAG ATT ACA GAT TTT GGG TTG GCG AGG 882	
Cys Asn Lys Thr Leu Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg	
GAA TGG CAC AGG ACC ACC AAA ATG AGC ACA GCA GGC ACC TAT 924	
Glu Trp His Arg Thr Thr Lys Met Ser Thr Ala Gly Thr Tyr	
GCC TGG ATG GCC CCC GAA GTG ATC AAG TCT TCC TTG TTT TCT 966	10
Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Ser Leu Phe Ser	
AAG GGA AGC GAC ATC TGG AGC TAT GGA GTG CTG CTG TGG GAA 1008	
Lys Gly Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu	
CTG CTC ACC GGA GAA GTC CCC TAT CGG GGC ATT GAT GGC CTC 1050	
Leu Leu Thr Gly Glu Val Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Leu	
GCC GTG GCT TAT GGG GTA GCA GTC AAT AAA CTC ACT TTG CCC 1092	
Ala Val Ala Tyr Gly Val Ala Val Asn Lys Leu Thr Leu Pro	
ATT CCA TCC ACC TGC CCT GAG CCG TTT GCC AAG CTC ATG AAA 1134	20
Ile Pro Ser Thr Cys Pro Glu Pro Phe Ala Lys Leu Met Lys	
GAA TGC TGG CAA CAA GAC CCT CAT ATT CGT CCA TCG TTT GCC 1176	
Glu Cys Trp Gln Gln Asp Pro His Ile Arg Pro Ser Phe Ala	
TTA ATT CTC GAA CAG TTG ACT GCT ATT GAA GGG GCA GTG ATG 1218	
Leu Ile Leu Glu Gln Leu Thr Ala Ile Glu Gly Ala Val Met	
ACT GAG ATG CCT CAA GAA TCT TTT CAT TCC ATG CAA GAT GAC 1260	
Thr Glu Met Pro Gln Glu Ser Phe His Ser Met Gln Asp Asp	
TGG AAA CTA GAA ATT CAA CAA ATG TTT GAT GAG TTG AGA ACA 1302	
Trp Lys Leu Glu Ile Gln Gln Met Phe Asp Glu Leu Arg Thr	
AAG GAA AAG GAG CTG CGA TCC CGG GAA GAG GAG CTG ACT CGG 1344	30
Lys Glu Lys Glu Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Leu Thr Arg	
GCG GCT CTG CAG CAG AAG TCT CAG GAG GAG CTG CTA AAG CGG 1386	
Ala Ala Leu Gln Gln Lys Ser Gln Glu Glu Leu Leu Lys Arg	
CGT GAG CAG CAG CTG GCA GAG CGC GAG ATC GAC GTG CTG GAG 1428	
Arg Glu Gln Gln Leu Ala Glu Arg Glu Ile Asp Val Leu Glu	
CGG GAA CTT AAC ATT CTG ATA TTC CAG CTA AAC CAG GAG AAG 1470	
Arg Glu Leu Asn Ile Leu Ile Phe Gln Leu Asn Gln Glu Lys	
CCC AAG GTA AAG AAG AGG AAG GGC AAG TTT AAG AGA AGT CGT 1512	40
Pro Lys Val Lys Lys Arg Lys Gly Lys Phe Lys Arg Ser Arg	
TTA AAG CTC AAA GAT GGA CAT CGA ATC AGT TTA CCT TCA GAT 1554	
Leu Lys Leu Lys Asp Gly His Arg Ile Ser Leu Pro Ser Asp	
TTC CAG CAC AAG ATA ACC GTG CAG GCC TCT CCC AAC TTG GAC 1596	
Phe Gln His Lys Ile Thr Val Gln Ala Ser Pro Asn Leu Asp	

【表 6】

AAA CGG CGG AGC CTG AAC AGC AGC AGT TCC AGT CCC CCG AGC	1638
Lys Arg Arg Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Ser	
AGC CCC ACA ATG ATG CCC CGA CTC CGA GCC ATA CAG TTG ACT	1680
Ser Pro Thr Met Met Pro Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Thr	
TCA GAT GAA AGC AAT AAA ACT TGG GGA AGG AAC ACA GTC TTT	1722
Ser Asp Glu Ser Asn Lys Thr Trp Gly Arg Asn Thr Val Phe	
CGA CAA GAA GAA TTT GAG GAT GTA AAA AGG AAT TTT AAG AAA	1764
Arg Gln Glu Glu Phe Glu Asp Val Lys Arg Asn Phe Lys Lys	
AAA GGT TGT ACC TGG GGA CCA AAT TCC ATT CAA ATG AAA GAT	1806
Lys Gly Cys Thr Trp Gly Pro Asn Ser Ile Gln Met Lys Asp	
AGA ACA GAT TGC AAA GAA AGG ATA AGA CCT CTC TCC GAT GGC	1848
Arg Thr Asp Cys Lys Glu Arg Ile Arg Pro Leu Ser Asp Gly	
AAC AGT CCT TGG TCA ACT ATC TTA ATA AAA AAT CAG AAA ACC	1890
Asn Ser Pro Trp Ser Thr Ile Leu Ile Lys Asn Gln Lys Thr	
ATG CCC TTG GCT TCA TTG TTT GTG GAC CAG CCA GGG TCC TGT	1932
Met Pro Leu Ala Ser Leu Phe Val Asp Gln Pro Gly Ser Cys	
GAA GAG CCA AAA CTT TCC CCT GAT GGA TTA GAA CAC AGA AAA	1974
Glu Glu Pro Lys Leu Ser Pro Asp Gly Leu Glu His Arg Lys	
CCA AAA CAA ATA AAA TTG CCT AGT CAG GCC TAC ATT GAT CTA	2016
Pro Lys Gln Ile Lys Leu Pro Ser Gln Ala Tyr Ile Asp Leu	
CCT CTT GGG AAA GAT GCT CAG AGA GAG AAT CCT GCA GAA GCT	2058
Pro Leu Gly Lys Asp Ala Gln Arg Glu Asn Pro Ala Glu Ala	
GAA AGC TGG GAG GAG GCA GCC TCT GCG AAT GCT GCC ACA GTC	2100
Glu Ser Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Asn Ala Ala Thr Val	
TCC ATT GAG ATG ACT CCT ACG AAT AGT CTG AGT AGA TCC CCC	2142
Ser Ile Glu Met Thr Pro Thr Asn Ser Leu Ser Arg Ser Pro	
CAG AGA AAG AAA ACG GAG TCA GCT CTG TAT GGG TGC ACC GTC	2184
Gln Arg Lys Lys Thr Glu Ser Ala Leu Tyr Gly Cys Thr Val	
CTT CTG GCA TCG GTG GCT CTG GGA CTG GAC CTC AGA GAG CTT	2226
Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Gly Leu Asp Leu Arg Glu Leu	
CAT AAA GCA CAG GCT GCT GAA GAA CCG TTG CCC AAG GAA GAG	2268
His Lys Ala Gln Ala Ala Glu Glu Pro Leu Pro Lys Glu Glu	
AAG AAG AAA CGA GAG GGA ATC TTC CAG CGG GCT TCC AAG TCC	2310
Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ile Phe Gln Arg Ala Ser Lys Ser	
CGC AGA AGC GCC AGT CCT CCC ACA AGC CTG CCA TCC ACC TGT	2352
Arg Arg Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Leu Pro Ser Thr Cys	
GGG GAG GCC AGC AGC CCA CCC TCC CTG CCA CTG TCA AGT GCC	2394
Gly Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Leu Pro Leu Ser Ser Ala	

10

20

30

40

CTG GGC ATC CTC TCC ACA CCT TCT TTC TCC ACA AAG TGC CTG 2436
Leu Gly Ile Leu Ser Thr Pro Ser Phe Ser Thr Lys Cys Leu

CTG CAG ATG GAC AGT GAA GAT CCA CTG GTG GAC AGT GCA CCT 2478
Leu Gln Met Asp Ser Glu Asp Pro Leu Val Asp Ser Ala Pro

GTC ACT TGT GAC TCT GAG ATG CTC ACT CCG GAT TTT TGT CCC 2520
Val Thr Cys Asp Ser Glu Met Leu Thr Pro Asp Phe Cys Pro

ACT GCC CCA GGA AGT GGT CGT GAG CCA GCC CTC ATG CCA AGA 2562
Thr Ala Pro Gly Ser Gly Arg Glu Pro Ala Leu Met Pro Arg

10

CTT GAC ACT GAT TGT AGT GTA TCA AGA AAC TTG CCG TCT TCC 2604
Leu Asp Thr Asp Cys Ser Val Ser Arg Asn Leu Pro Ser Ser

TTC CTA CAG CAG ACA TGT GGG AAT GTA CCT TAC TGT GCT TCT 2646
Phe Leu Gln Gln Thr Cys Gly Asn Val Pro Tyr Cys Ala Ser

TCA AAA CAT AGA CCG TCA CAT CAC AGA CGG ACC ATG TCT GAT 2688
Ser Lys His Arg Pro Ser His His Arg Arg Thr Met Ser Asp

GGA AAT CCG ACC CCA ACT GGT GCA ACT ATT ATC TCA GCC ACT 2730
Gly Asn Pro Thr Pro Thr Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ala Thr

GGA GCC TCT GCA CTG CCA CTC TGC CCC TCA CCT GCT CCT CAC 2772
Gly Ala Ser Ala Leu Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ala Pro His

20

AGT CAT CTG CCA AGG GAG GTC TCA CCC AAG AAG CAC AGC ACT 2814
Ser His Leu Pro Arg Glu Val Ser Pro Lys Lys His Ser Thr

GTC CAC ATC GTG CCT CAG CGT CGC CCT GCC TCC CTG AGA AGC 2856
Val His Ile Val Pro Gln Arg Arg Pro Ala Ser Leu Arg Ser

CGC TCA GAT CTG CCT CAG GCT TAC CCA CAG ACA GCA GTG TCT 2898
Arg Ser Asp Leu Pro Gln Ala Tyr Pro Gln Thr Ala Val Ser

CAG CTG GCA CAG ACT GCC TGT GTA GTG GGT CGC CCA GGA CCA 2940
Gln Leu Ala Gln Thr Ala Cys Val Val Gly Arg Pro Gly Pro

30

CAT CCC ACC CAA TTC CTC GCT GCC AAG GAG AGA ACT AAA TCC 2982
His Pro Thr Gln Phe Leu Ala Ala Lys Glu Arg Thr Lys Ser

CAT GTG CCT TCA TTA CTG GAT GCT GAC GTG GAA GGT CAG AGC 3024
His Val Pro Ser Leu Leu Asp Ala Asp Val Glu Gly Gln Ser

AGG GAC TAC ACT GTG CCA CTG TGC AGA ATG AGG AGC AAA ACC 3066
Arg Asp Tyr Thr Val Pro Leu Cys Arg Met Arg Ser Lys Thr

AGC CGG CCA TCT ATA TAT GAA CTG GAG AAA GAA TTC CTG TCT 3108
Ser Arg Pro Ser Ile Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Ser

TAA 3111
Stop

40

ポリペプチド配列(配列番号2)

Met Ala Leu Arg Gly Ala Ala Gly Ala Thr Asp Thr Pro Val

Ser Ser Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala Ser Ser Ser
 Ser Thr Ser Ser Gly Gly Ser Ala Ser Ala Gly Ala Gly Leu
 Trp Ala Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Glu Asp Glu
 Leu Ser Leu Arg Arg Gly Gln Leu Val Glu Val Leu Ser Gln
 Asp Ala Ala Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp Trp Ala Gly Gln
 Val Gln Arg Arg Leu Gly Ile Phe Pro Ala Asn Tyr Val Ala
 Pro Cys Arg Pro Ala Ala Ser Pro Ala Pro Pro Pro Ser Arg
 Pro Ser Ser Pro Val His Val Ala Phe Glu Arg Leu Glu Leu
 Lys Glu Leu Ile Gly Ala Gly Gly Phe Gly Gln Val Tyr Arg
 Ala Thr Trp Gln Gly Gln Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg
 Gln Asp Pro Glu Gln Asp Ala Ala Ala Ala Glu Ser Val
 Arg Arg Glu Ala Arg Leu Phe Ala Met Leu Arg His Pro Asn
 Ile Ile Glu Leu Arg Gly Val Cys Leu Gln Gln Pro His Leu
 Cys Leu Val Leu Glu Phe Ala Arg Gly Gly Ala Leu Asn Arg
 Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Ala Pro Asp Pro Arg Ala Pro
 Gly Pro Arg Arg Ala Arg Arg Ile Pro Pro His Val Leu Val
 Asn Trp Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Leu Tyr Leu His
 Glu Glu Ala Phe Val Pro Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Ser
 Ser Asn Ile Leu Leu Leu Glu Lys Ile Glu His Asp Asp Ile
 Cys Asn Lys Thr Leu Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg
 Glu Trp His Arg Thr Thr Lys Met Ser Thr Ala Gly Thr Tyr
 Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Ser Leu Phe Ser
 Lys Gly Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu
 Leu Leu Thr Gly Glu Val Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Leu
 Ala Val Ala Tyr Gly Val Ala Val Asn Lys Leu Thr Leu Pro
 Ile Pro Ser Thr Cys Pro Glu Pro Phe Ala Lys Leu Met Lys
 Glu Cys Trp Gln Gln Asp Pro His Ile Arg Pro Ser Phe Ala

10

20

30

40

Leu Ile Leu Glu Gln Leu Thr Ala Ile Glu Gly Ala Val Met	
Thr Glu Met Pro Gln Glu Ser Phe His Ser Met Gln Asp Asp	
Trp Lys Leu Glu Ile Gln Gln Met Phe Asp Glu Leu Arg Thr	
Lys Glu Lys Glu Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Leu Thr Arg	
Ala Ala Leu Gln Gln Lys Ser Gln Glu Glu Leu Leu Lys Arg	
Arg Glu Gln Gln Leu Ala Glu Arg Glu Ile Asp Val Leu Glu	10
Arg Glu Leu Asn Ile Leu Ile Phe Gln Leu Asn Gln Glu Lys	
Pro Lys Val Lys Lys Arg Lys Gly Lys Phe Lys Arg Ser Arg	
Leu Lys Leu Lys Asp Gly His Arg Ile Ser Leu Pro Ser Asp	
Phe Gln His Lys Ile Thr Val Gln Ala Ser Pro Asn Leu Asp	
Lys Arg Arg Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Ser	
Ser Pro Thr Met Met Pro Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Thr	20
Ser Asp Glu Ser Asn Lys Thr Trp Gly Arg Asn Thr Val Phe	
Arg Gln Glu Glu Phe Glu Asp Val Lys Arg Asn Phe Lys Lys	
Lys Gly Cys Thr Trp Gly Pro Asn Ser Ile Gln Met Lys Asp	
Arg Thr Asp Cys Lys Glu Arg Ile Arg Pro Leu Ser Asp Gly	
Asn Ser Pro Trp Ser Thr Ile Leu Ile Lys Asn Gln Lys Thr	
Met Pro Leu Ala Ser Leu Phe Val Asp Gln Pro Gly Ser Cys	
Glu Glu Pro Lys Leu Ser Pro Asp Gly Leu Glu His Arg Lys	30
Pro Lys Gln Ile Lys Leu Pro Ser Gln Ala Tyr Ile Asp Leu	
Pro Leu Gly Lys Asp Ala Gln Arg Glu Asn Pro Ala Glu Ala	
Glu Ser Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Asn Ala Ala Thr Val	
Ser Ile Glu Mer Thr Pro Thr Asn Ser Leu Ser Arg Ser Pro	
Gln Arg Lys Lys Thr Glu Ser Ala Leu Tyr Gly Cys Thr Val	
Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Gly Leu Asp Leu Arg Glu Leu	40
His Lys Ala Gln Ala Ala Glu Glu Pro Leu Pro Lys Glu Glu	
Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ile Phe Gln Arg Ala Ser Lys Ser	

Arg Arg Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Leu Pro Ser Thr Cys
 Gly Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Leu Pro Leu Ser Ser Ala
 Leu Gly Ile Leu Ser Thr Pro Ser Phe Ser Thr Lys Cys Leu
 Leu Gln Met Asp Ser Glu Asp Pro Leu Val Asp Ser Ala Pro
 Val Thr Cys Asp Ser Glu Met Leu Thr Pro Asp Phe Cys Pro
 Thr Ala Pro Gly Ser Gly Arg Glu Pro Ala Leu Met Pro Arg 10
 Leu Asp Thr Asp Cys Ser Val Ser Arg Asn Leu Pro Ser Ser
 Phe Leu Gln Gln Thr Cys Gly Asn Val Pro Tyr Cys Ala Ser
 Ser Lys His Arg Pro Ser His His Arg Arg Thr Met Ser Asp
 Gly Asn Pro Thr Pro Thr Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ala Thr
 Gly Ala Ser Ala Leu Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ala Pro His
 Ser His Leu ProArg Glu Val Ser Pro LysLys His Ser Thr 20
 Val His Ile Val Pro Gln Arg Arg Pro Ala Ser Leu Arg Ser
 Arg Ser Asp Leu Pro Gln Ala Tyr Pro Gln Thr Ala Val Ser
 Gln Leu Ala Gln Thr Ala Cys Val Val Gly Arg Pro Gly Pro
 His Pro Thr Gln Phe Leu Ala Ala Lys Glu Arg Thr Lys Ser
 His Val Pro Ser Leu Leu Asp Ala Asp Val Glu Gly Gln Ser
 Arg Asp Tyr Thr Val Pro Leu Cys Arg Met Arg Ser Lys Thr
 Ser Arg Pro Ser Ile Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Ser 30

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図1】発明にかかる、代表的キナーゼサブドメイン整列、ならびに `s d s c . e d u / K i n a s e s / p k r / p k _ c a t a l y t i c / p h _ h a n k s _ s e q _ a l i g n _ l o n g . h t m # O P K - X I` のインターネットのワールドワイドウェブからのMLK1およびMLK3の機能的ドメインを示す。他のタンパク質はPAM250残基重み表を用いるクラスタル(Clustal)法を使用するDNASTARプログラムにより整列した。太字のアミノ酸はタンパク質チロシンキナーゼで高度に保存されるアミノ酸であり；太字斜体のアミノ酸はタンパク質セリン-トレオニンキナーゼで保存され；下線を付けられる太字斜体のアミノ酸は双方で高度に保存される(Hanksら, Meth. in Enzymol., 1991, 200, 38-62)。これらのタンパク質中で変えられたチロシンキナーゼの保存されるアミノ酸を配列の上に太字で示す(保存されるものを大文字、好ましいものを小文字)。

【図2】発明にかかる、ヒト混合系統キナーゼファミリーのキナーゼドメインの代表的系統樹を描く。この分析はDNASTARプログラム(PAM250残基重み表を用いるクラスタル(Clustal)法)のMegAlign機能を使用して実施した。タンパク質は、上から下へ、MLK3、MLK7、MLK1、MLK2、DLK、LZKおよびM

L T K / M L K 6 である。この整列は、7種のタンパク質を3つのサブファミリー、すなわち M L K 1 - 3 サブファミリー (M L K 1、2、3 および 7)、D L K サブファミリー (D L K、L Z K) ならびに M L T K / M L K 6 サブファミリーに組織化する。

【図3】発明にかかる、M L K 7 ポリペプチドの代表的ドメイン構造および該ポリペプチドの予測される分子量 (M W) を示す。

【図4】発明にかかる、キナーゼドメインの後に続く推定のロイシンジッパー領域の配列を示す。7番目のアミノ酸 (1 個の - らせんターン) ごとに間隔を置かれたロイシン / イソロイシン残基を太字で示しかつ下線を付ける。この領域に先行するおよび後に続く7番目のアミノ酸は、示される配列を開始かつ終了し、このパターンが継続しないことを立証する。

10

【図5】発明にかかる、M L K 7 の過剰発現が C H O 細胞ライセート中の J N K 活性を増大させること、および C E P 1 1 0 0 4 での6時間の処理が M L K 7 により駆動される J N K 活性を部分的に阻害することを示す。

【図6】発明にかかる、放射活性マルチスクリーントリクロロ酢酸沈殿アッセイを使用するバキュロウイルスの G S T - M L K 7_{K D} (白丸) および G S T - M L K 7_{K D} / L Z (黒丸) によるミエリン塩基性タンパク質のリン酸化を具体的に説明する。陽性酵素対照 G S T - M L K 3_{K D} (黒菱形) を含有するデータの組全体を挿入図中に示す。

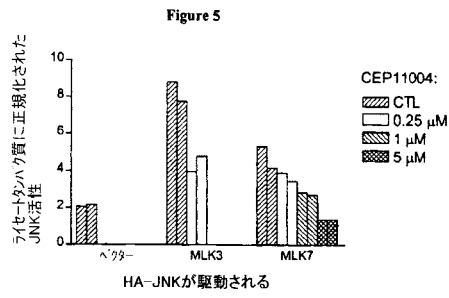
【図7】発明にかかる、時間分解型蛍光読み出しを用いる E L I S A に基づくアッセイを使用するバキュロウイルスの G S T - M L K 7_{K D} (白丸) および G S T - M L K 7_{K D} / L Z (黒丸) による (A) G S T - M K K 4 (K 1 1 3 A) および (B) G S T - M K K 7 (K 1 4 9 A) のリン酸化を示す。G S T - M L K 3_{K D} (黒菱形) を陽性酵素対照として使用した。

20

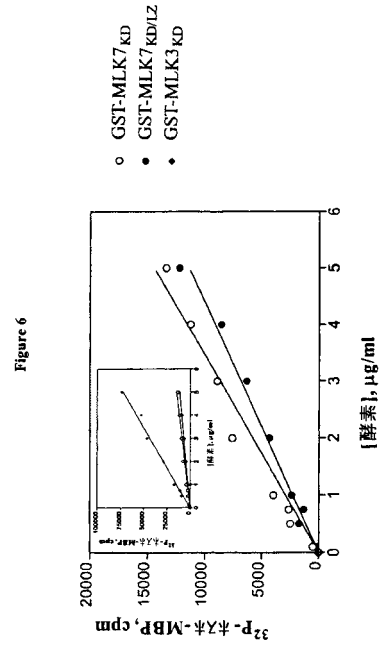
【図8】発明にかかる、バキュロウイルスの G S T - M L K 7_{K D} および G S T - M L K 7_{K D} / L Z による J N K 経路のインビトロ活性化を立証する。不活性化された形態の M K K 4 および M K K 7 を、バキュロウイルスの G S T - M L K 7_{K D} により個別にリン酸化した。その後、これら2種の M K K タンパク質を、ホスホ特異的 J N K 抗体によりプローピングされるところの G S T - J N K 1 1 (K 5 5 A) のリン酸化を触媒するように活性化しかつ進行させた。類似の結果が、異なる効率までのものの、G S T - M L K 7_{K D} / L Z および G S T - M L K 3_{K D} (酵素対照) について観察された。挿入図は対照を包含するデータの組全体を示す。

30

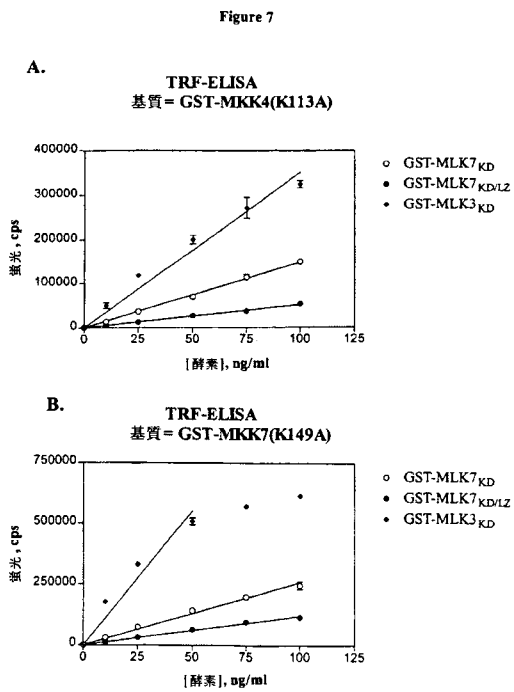
【 図 5 】



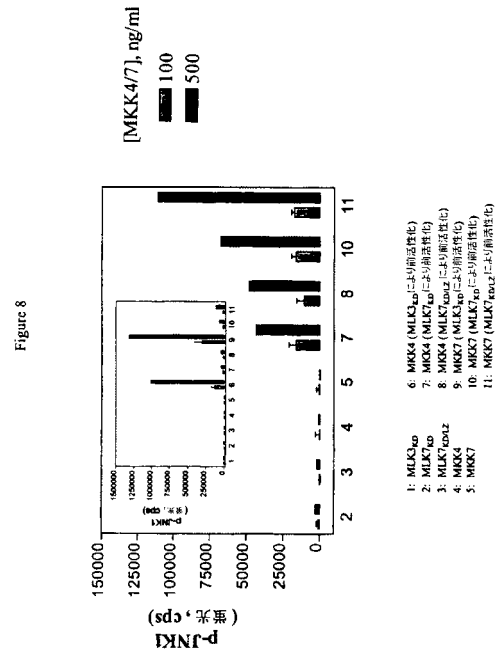
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 November 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/095017 A1(51) International Patent Classification: C12N 9/12,
15/00, 5/00, 1/20, C07H 21/04, C07K 1/00I.K., I.R., I.S., I.T., I.U., I.V., MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/US02/16387

(22) International Filing Date: 23 May 2002 (23.05.2002)

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/293,381 24 May 2001 (24.05.2001) US

Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

(71) Applicant (for all designated States except US):
CEPHALON, INC. [US/US]; 145 Brandywine Park,
West Chester, PA 19380 (US).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ANGELES,
Thelma, S. [US/US]; 1509 Grovenor Court, West Chester,
PA 19380 (US). DURKIN, John, T. [US/US]; 47 Welling-
ton Road, Ardmore, PA 19003 (US). HOLSKIN, Beverly,
P. [US/US]; Apt. 31 D, West Tower, Philadelphia, PA
19106 (US). MEYER, Sheryl, L. [US/US]; 274 Level
Road, Collegeville, PA 19426 (US). SPAIS, Chrysanthé,
M. [US/US]; 6 West Corwen Terrace, West Chester, PA
19380 (US).(74) Agents: MILLER, Suzanne, E. et al.; Woodcock Wash-
burn LLP, One Liberty Place - 46th Floor, Philadelphia, PA
19103 (US).

Published:

with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GU, HN, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/095017 A1

(54) Title: NOVEL MIXED LINEAGE KINASE (7) (MLK7) POLYPEPTIDE, POLYNUCLEOTIDES ENCODING THE SAME,
AND METHODS OF USE THEREOF(57) Abstract: The present invention provides isolated mixed lineage kinase (7) (MLK) polynucleotides, expression vectors, host
cells, isolated polypeptides, methods of producing polypeptides, isolated antibodies, compositions having the foregoing, methods
for identifying a compound that binds a polypeptide or polynucleotide, and to methods for identifying a compound that modulates
the activity of a polypeptide.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

**NOVEL MIXED LINEAGE KINASE 7 (MLK7) POLYPEPTIDE,
POLYNUCLEOTIDES ENCODING THE SAME, AND METHODS
OF USE THEREOF**

5 CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

The present application claims priority to U.S. provisional application Serial No. 60/293,381 filed May 24, 2001, which is incorporated herein by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

10 The present invention is directed, in part, to a novel mixed lineage kinase 7 (MLK7) polypeptide, polynucleotides encoding the same, methods for identifying compounds that bind to or modulate the activity of the polypeptide, and methods for assaying the enzymatic activity of MLK7.

15 BACKGROUND OF THE INVENTION

The MLK family comprises a group of enzymes in which the protein sequence of the kinase domains of the family members show homology with both tyrosine and serine/threonine protein kinases. In particular, this region contains many amino acids highly conserved among tyrosine kinases, but the homology to serine/threonine protein kinases in the catalytic domain, subdomains VIb and VIII, is consistent with the known serine/threonine kinase activity of MLK3 (Gallo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 15092-15100). In addition, all family members contain a leucine zipper, which is an α -helical structure characterized by a periodic repeat of leucine or isoleucine every seventh amino acid for a stretch of at least 22 amino acids to form a parallel coiled-coil structure

WO 02/095017

PCT/US02/16387

(Landschultz *et al.*, *Science*, **1988**, 240, 1759-1764). These kinases comprise a portion of very complex kinase cascades such as, for example, the stress-signaling cascade, which involves modulation of, *inter alia*, c-Jun N-terminal kinase (JNK), which in turn modulates, *inter alia*, transcription factors including c-Jun, ATF2 and ELK1. JNK is described in U.S. Patents 5,534,426, 5,593,884, 5,605,808, and in international publication WO 95/03324.

The MLK family consists of 6 reported family members: 1) mixed lineage kinase 1 (MLK1); 2) mixed lineage kinase 2 (MLK2); 3) mixed lineage kinase 3 (MLK3); 4) dual leucine zipper bearing kinase (DLK); 5) leucine zipper bearing kinase (LZK), and 6) MLK-like mitogen activated protein triple kinase/mixed lineage kinase 6 (MLTK/MLK6). A partial sequence has been reported for MLK1 (Dorow *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 213, 701-710). Mixed lineage kinases 1, 2 and 3 have, in addition to the features described above, a src-homology-3 (SH3) domain N-terminal to the kinase domain (Dorow *et al.*, *J. Protein Chem.*, **1994**, 13, 458-460; Dorow *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 234, 492-500; and Ing *et al.*, *Oncogene*, **1994**, 9, 1745-1750). Their leucine zipper region is just C-terminal to the kinase domain and is comprised of 2 repeats of 4 alpha helical regions separated by a small spacer region, termed a dual leucine zipper. Deletion analysis suggests a functional role of this domain in homodimerization (Leung *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 32408-32415). This domain is followed by a small region comprised of a preponderance of basic amino acids similar to nuclear localization signals from several proteins (Dorow *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 234, 492-500). Immediately adjacent to that is a Cdc42/Rac interactive binding (CRIB) domain (Burbelo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 29071-29074). The C-terminus has generally a low level of complexity, where 3 amino acids (proline, serine and glycine) comprise up to 41% (MLK3) of the primary amino acid sequence. MLK2 is also known as MST (Kato *et al.*, *Oncogene*, **1995**, 10, 1447-1451). MLK3 is also known as scr-homology 3 (SH3) domain-containing proline-rich kinase (SPRK) (Gallo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 15092-15100) and protein tyrosine kinase 1 (PTK1) (Ezoe *et al.*, *Oncogene*, **1994**, 9, 935-938).

DLK and LZK share the same general features, but do not have the SH3 and CRIB domains and their spacer region in the dual leucine zipper is about 18 amino acids longer than in MLKs 1-3 (Holtzman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 30808-30817; Sakuma *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 28622-28629). DLK is also known as leucine-

WO 02/095017

PCT/US02/16387

zipper protein kinase (ZPK) (Reddy *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, 202, 613-620) and MAPK-upstream kinase (MUK) (Hirai *et al.*, *Oncogene*, **1996**, 12, 641-650).

MLTK/MLK6 is even more divergent. They share a kinase domain and putative
 5 leucine zipper region, but like the DLK/LZK group, there is no SH3 binding domain or CRIB domain, nor is there a basic amino acid region. Rather, the two cDNA sequences diverge after the putative leucine zipper region, resulting in two different isoforms, alpha and beta. Furthermore, unlike the other family members containing the "dual" 4 + 4 repeats, the putative leucine zipper region contains six contiguous alpha-helical repeats.
 10 In addition, unlike other family members, the kinase domain is essentially at the N-terminus (Gotoh *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 4276-4286). MLTK α /MLK6 α is also known as leucine-zipper sterile alpha motif kinase (ZAK) (Liu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 274, 811-816).

Members of the MLK family are also described in, for example, U.S. Patent
 15 5,676,945; U.S. Patent 5,554,523; international publication WO 93/15201; Canadian Patent 2,148,898; Diener *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 9687-9692; DeAizpurua *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 16364-16373; Tung *et al.*, *Oncogene*, **1997**, 14, 653-659; Sells *et al.*, *Trends in Cell Biol.*, **1997**, 7, 161-167; Mata *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 16888-16896; Hirai *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 15167-15173;
 20 Fan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 24788-24793; Blouin *et al.*, *DNA and Cell Biol.*, **1996**, 15, 631-642; Pombo *et al.*, *Nature*, **1995**, 377, 750-754; Kiefer *et al.*, *EMBO J.*, **1996**, 15, 7013-7025; Hu *et al.*, *Genes & Dev.*, **1996**, 10, 2251-2264; and Su *et al.*, *EMBO J.*, **1997**, 16, 1279-1290. Portions of the kinase domain for human kinase homologs have also been reported in U.S. Patent 5,817,479. In addition, nucleotide sequences for a mixed
 25 lineage kinase mRNA have been reported in the Genbank database (*see*, Accession Numbers AF238255 and AF251441).

Due to the inadequacies of screening compounds that modulate members of the stress signaling cascade and promote either cell death or cell survival, there continues to be a need for new, selective methods of screening compounds. In addition, there
 30 continues to be a need for screening assays for therapeutics which may be useful in treating inflammation and neurodegenerative disorders. The present invention is directed to these, as well as other, important ends. In particular, the present invention describes an

WO 02/095017

PCT/US02/16387

additional member of the MLK family, a seventh family member, termed herein as MLK7, identified from human genomic sequences that encode a kinase domain 73-76% homologous to the MLK 1-3 subfamily. MLK7 contains an SH3 domain N-terminal to the kinase domain. MLK7 also contains a dual leucine zipper C-terminal to the kinase domain, followed by a small region comprised of a preponderance of basic amino acids similar to nuclear localization signals from several proteins. This was used to clone a cDNA that encodes a functional kinase protein. The novel polypeptide of the present invention can be used, for example, to phosphorylate MAP kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7, and play a role in JNK stress-activated kinase pathway activation. Thus, the polypeptide of the present invention can be used, for example, to identify inhibitors of the same and such inhibitors can be used to promote neuronal cell survival. Compounds that decrease activity of the MLK polypeptides are useful for, for example, promoting cell survival, treating neurodegenerative disorders, and treating inflammation.

15 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a novel MLK7 polypeptide and polynucleotides encoding the same.

In particular, the present invention is directed to isolated polynucleotides comprising a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1, polynucleotides homologous to SEQ ID NO:1, polynucleotides that encode a polypeptide comprising SEQ ID NO:2, and polynucleotides that encode a polypeptide comprising an amino acid sequence homologous to SEQ ID NO:2.

The present invention is also directed to polynucleotides comprising a nucleotide sequence complementary to at least a portion of SEQ ID NO:1.

25 The present invention is also directed to expression vectors comprising the polynucleotides of the invention and host cells comprising the same.

The present invention is also directed to isolated polypeptides encoded by the polynucleotides of the invention and to methods of producing polypeptides comprising SEQ ID NO:2 and polypeptides homologous thereto, by introducing a recombinant expression vector comprising a polynucleotide of the invention into a compatible host cell, growing the host cell under conditions for expression of the polypeptide, and recovering the polypeptide.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

The present invention is also directed to isolated antibodies that bind to an epitope on a polypeptide of the invention.

The present invention is also directed to compositions comprising a polynucleotide, expression vector, polypeptide, or antibody and a carrier or diluent, and to kits comprising a polynucleotide, expression vector, polypeptide, or antibody.

The present invention is also directed to methods for identifying a compound that binds a polypeptide of the invention by contacting the polypeptide with the compound and determining whether the compound binds to the polypeptide.

The present invention is also directed to methods for identifying a compound that binds a polynucleotide of the invention by contacting the polynucleotide with the compound and determining whether the compound binds the polynucleotide.

The present invention is also directed to methods for identifying a compound that modulates the activity of a polypeptide of the invention by contacting the polypeptide with the compound and determining whether the polypeptide activity has been modulated.

The present invention is also directed to compounds identified by the identification methods of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows a representative kinase subdomain alignment and functional domains for MLK1 and MLK3 from the world wide web of the internet at sdsc.edu/Kinases/pkr/pk_catalytic/pk_hanks_seq_align_long.html#OPK-XI. Other proteins aligned by DNASTar program using Clustal method with PAM250 residue weight table. Amino acids in bold are highly conserved amino acids in protein tyrosine kinases; amino acids in bold italics are conserved in protein serine-threonine kinases; amino acids in bold italics underlined are highly conserved in both (Hanks *et al.*, *Meth. in Enzymol.*, **1991**, 200, 38-62). Conserved amino acids for tyrosine kinases altered in these proteins are shown in bold above the sequence (capital letters for conserved, small letters for preferred).

Figure 2 depicts a representative phylogenetic tree of the kinase domains in the human mixed lineage kinase family. This analysis was performed using the MegAlign feature of the DNASTar program (Clustal method with PAM250 residue weight table). The proteins are, from top to bottom, MLK3, MLK7, MLK1, MLK2, DLK, LZK and

WO 02/095017

PCT/US02/16387

MLTK/MLK6. This alignment organizes the seven proteins into three subfamilies: the MLK1-3 subfamily (MLKs 1, 2, 3 and 7), the DLK subfamily (DLK, LZK) and the MLTK/MLK6 subfamily.

Figure 3 shows a representative domain structure of MLK7 polypeptide and the predicted molecular weight (MW) of the polypeptide.

Figure 4 shows the sequence of the putative leucine zipper region that follows the kinase domain. The leucine/isoleucine residues spaced every seventh amino acid (one alpha-helical turn) are shown in bold and are underlined. The seventh amino acid preceding and following this region begin and end the shown sequence to demonstrate that this pattern does not continue.

Figure 5 shows that overexpression of MLK7 increases JNK activity in CHO cell lysates, and that six-hour treatment with CEP11004 partially inhibits JNK activity driven by MLK7.

Figure 6 illustrates the phosphorylation of myelin basic protein by baculoviral GST-MLK7_{KD} (open circles) and GST-MLK7_{KD/LZ} (filled-in circles) using a radioactive multiscreen trichloroacetic acid precipitation assay. The entire data set containing the positive enzyme control GST-MLK3_{KD} (filled-in diamonds) is shown in the inset.

Figure 7 shows the phosphorylation of (A) GST-MKK4(K113A) and (B) GST-MKK7(K149A) by baculoviral GST-MLK7_{KD} (open circles) and GST-MLK7_{KD/LZ} (filled-in circles) using an ELISA-based assay with time-resolved fluorescence readout. GST-MLK3_{KD} (filled-in diamonds) was used as the positive enzyme control.

Figure 8 demonstrates the *in vitro* activation of the JNK pathway by baculoviral GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ}. Inactivated forms of MKK4 and MKK7 were separately phosphorylated by baculoviral GST-MLK7_{KD}. Subsequently, these two MKK proteins were activated and proceeded to catalyze the phosphorylation of GST-JNK1β1(K55A) as probed by a phospho-specific JNK antibody. Similar results were observed for GST-MLK7_{KD/LZ} and GST-MLK3_{KD} (enzyme control), albeit to different efficiencies. Inset shows the entire data set, including controls.

30 DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention provides purified and isolated polynucleotides (e.g., DNA sequences and RNA transcripts, chimeric RNA/DNA molecules, both sense and

WO 02/095017

PCT/US02/16387

complementary antisense strands, both single- and double-stranded, including splice variants thereof) encoding a human MLK polypeptide referred to herein as "MLK7." DNA polynucleotides of the invention include genomic DNA, cDNA, and DNA that has been chemically synthesized.

5 As used herein, "activity" means a variety of measurable indicia suggesting or revealing binding, either direct or indirect; affecting a response, such as having a measurable affect in response to some exposure or stimulus, including, for example, the affinity of a compound for directly binding a polypeptide or polynucleotide of the invention, or, for example, measurement of amounts of upstream or downstream proteins
10 (e.g. JNK) or activity thereof, or other similar functions after a stimulus or event.

As used herein, "antibody" means complete, intact antibodies, and Fab, Fab', F(ab)₂, and other fragments thereof. Complete, intact antibodies include monoclonal antibodies, chimeric antibodies, and humanized antibodies.

As used herein, "binding" means the physical or chemical interaction between
15 two polypeptides or polynucleotides or compounds or associated proteins or compounds or combinations thereof. Binding includes, but is not limited to, ionic, non-ionic, Hydrogen bonds, Van der Waals, hydrophobic interactions, etc. Binding can be either direct or indirect through or due to the effects of another protein or compound.

As used herein, "compound" means any chemical or molecule including, but not
20 limited to, small molecules, peptides, proteins or polypeptides, sugars, nucleotides, or nucleic acids, and the like. The compounds can be natural or synthetic.

As used herein, "contacting" means bringing together, either directly or indirectly, a compound into physical proximity to a polypeptide or polynucleotide of the invention. The polypeptide or polynucleotide can be in any number of buffers, salts,
25 solutions, etc. Contacting includes, but is not limited to, placing the compound into a beaker, microtiter plate, cell culture flask, or a microarray, or the like, which contains the MLK7 polypeptide or fragment thereof, polynucleotide encoding the same, or antibody binding to the same.

As used herein, "homologous nucleotide sequence," or "homologous amino acid
30 sequence," or variations thereof, means sequences characterized by a homology, at the nucleotide level or amino acid level, of at least a specified percentage. Homologous nucleotide sequences include nucleotide sequences encoding for a protein of a species

WO 02/095017

PCT/US02/16387

other than humans, including, but not limited to, mammals. Homologous nucleotide sequences also include, but are not limited to, naturally occurring allelic variations and mutations of the nucleotide sequences set forth herein. A homologous nucleotide sequence is not, however, identical to the nucleotide sequences encoding other known
5 MLK polypeptides. Homologous amino acid sequences include those amino acid sequences that encode conservative amino acid substitutions, as well as polypeptides having kinase activity. A homologous amino acid sequence is not, however, identical to the amino acid sequences encoding other known MLK polypeptides. Percent homology can be determined by, for example, the Gap program (Wisconsin Sequence Analysis
10 Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI), using default settings, which uses the algorithm of Smith and Waterman (*Adv. Appl. Math.*, 1981, 2, 482-489, which is incorporated herein by reference in its entirety).

As used herein, "modulates" or "modifies" means an increase or decrease in the
15 amount, quality, or effect of a particular activity or polypeptide.

As used herein, "treating" means to having a therapeutic effect and at least partially alleviating or abrogating an abnormal condition in an organism.

As used herein, "therapeutic effect" means inhibition or activation of factors causing or contributing to an abnormal condition. A therapeutic effect alleviates, at least
20 to some extent, one or more of the symptoms of the abnormal condition. In regard to treatment of abnormal conditions, a therapeutic effect can refer to one or more of the following: i) an increase in the proliferation, growth, and/or differentiation of cells; ii) inhibition (i.e., slowing or stopping) of cell death; iii) inhibition of degeneration; iv) relieving to some extent one or more of the symptoms associated with the abnormal
25 condition; and v) enhancing the function of the affected population of cells.

As used herein, "abnormal condition" means a function in cells or tissues of an organism that deviates from their normal functions in that organism. An abnormal condition can be any condition that is not desired by an individual. An abnormal condition can relate to cell proliferation, cell differentiation, cell signaling, or cell
30 survival. Abnormal differentiation conditions include, but are not limited to, neurodegenerative or inflammatory disorders. Abnormal cell survival conditions can also

WO 02/095017

PCT/US02/16387

relate to conditions in which programmed cell death (apoptosis) pathways are activated or abrogated.

As used herein, "administering" means a method of incorporating a compound into a cell or tissue of an organism. For cells within an organism, administration techniques include, but are not limited to, oral, intramuscular, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous, intravenous, intraarterially, intraocularly, intraventricularly, and transdermally, as well as by inhalation or suppository. For cells outside an organism, administration techniques include, but are not limited to, cell microinjection, transformation, and carrier techniques.

As used herein, "organism" means a mammal such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig or goat, more preferably a primate such as a monkey or ape, and most preferably a human.

As used herein, "stringent hybridization conditions" or "stringent conditions" means conditions under which a probe, primer, or oligonucleotide will hybridize to its target sequence, but to no other sequences. Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. Generally, stringent conditions are selected to be about 5C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. Target sequences are generally present in excess. Typically, stringent conditions will be those in which the salt concentration is less than about 1.0 M sodium ion, typically about 0.01 to 1.0 M sodium ion (or other salts) at pH 7.0 to 8.3 and the temperature is at least about 30C for short probes, primers or oligonucleotides (e.g. 10 to 50 nucleotides) and at least about 60C for longer probes, primers or oligonucleotides. Stringent conditions can also be achieved with the addition of destabilizing agents, such as formamide.

The polynucleotides of the invention can include genomic DNA which comprises the protein coding region for a polypeptide of the invention and is also intended to include allelic variants or splice variants thereof. Splice variants of the invention are encoded by the same original genomic DNA sequences but arise from distinct mRNA transcripts. Allelic variants are modified forms of a wild-type gene sequence, the modification resulting from recombination during chromosomal segregation or exposure to conditions which give rise to genetic mutation. Allelic variants, like wild-

WO 02/095017

PCT/US02/16387

type genes, are naturally occurring sequences, as opposed to non-naturally occurring variants which arise from *in vitro* manipulation.

In the present invention, a polynucleotide encoding MLK7 polypeptide is set forth in SEQ ID NO:1. A preferred polypeptide of the invention comprises a double stranded molecule. Also preferred are other polynucleotides encoding particular MLK7 polypeptides of the invention which differ in sequence from the particular polynucleotide set forth in SEQ ID NO:1 by virtue of the well-known degeneracy of the universal nuclear genetic code.

The invention is further directed to additional species homologs, preferably mammalian, of the human MLK7 polynucleotides. Species homologs, sometimes referred to as "orthologs," in general, share at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 98%, or at least 99% homology with human polynucleotides of the invention. Generally, percent sequence "homology" with respect to polynucleotides of the invention can be calculated as the percentage of nucleotide bases in the candidate sequence that are identical to nucleotides in the MLK7 sequence set forth in a particular polynucleotide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity.

Examples of related polynucleotides include human and non-human genomic sequences, including allelic variants, as well as polynucleotides encoding polypeptides homologous to MLK7 polypeptides and structurally related polypeptides sharing one or more biological, immunological, and/or physical properties of MLK7 polypeptides. Non-human species genes encoding proteins homologous to MLK7 polypeptides can also be identified by Southern and/or PCR analysis and are useful in animal models for MLK7 polypeptide disorders. Polynucleotides of the invention are also useful in hybridization assays to detect the capacity of cells to express MLK7 polypeptides. Polynucleotides of the invention can also provide a basis for diagnostic methods useful for identifying a genetic alteration(s) in an MLK7 locus that underlies a disease state or states, such information being useful both for diagnosis and for selection of therapeutic strategies.

The disclosure herein of a full-length polynucleotide encoding a MLK7 polypeptide makes readily available to the worker of ordinary skill in the art every possible fragment of the full length polynucleotide. MLK7 polynucleotides, therefore,

WO 02/095017

PCT/US02/16387

encompass fragments comprising at least 14, and preferably at least 16, 18, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 400, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, or 3000 consecutive nucleotides of a polynucleotide encoding MLK7. Preferably, fragment polynucleotides of the invention comprise sequences unique to the MLK7-encoding polynucleotide sequence, and therefore hybridize under highly stringent or moderately stringent conditions only (i.e., "specifically") to polynucleotides encoding MLK7 (or fragments thereof). Polynucleotide fragments of genomic sequences of the invention comprise not only sequences unique to the coding region, but also include fragments of the full-length sequence derived from introns, regulatory regions, and/or other non-translated sequences. Polynucleotides of the invention can be labeled in a manner that permits their detection, including radioactive, fluorescent, and enzymatic labeling.

Fragment polynucleotides are particularly useful as probes for detection of full-length or fragment MLK7 polynucleotides. One or more polynucleotides can be included in kits that are used to detect the presence of a polynucleotide encoding MLK7, or used to detect variations in a polynucleotide sequence encoding MLK7.

The invention is also directed to polynucleotides encoding MLK7 polypeptides that hybridize under moderately stringent or high stringency conditions to the non-coding strand, or complement, of the polynucleotide in SEQ ID NO:1. Exemplary highly stringent hybridization conditions are as follows: hybridization at 42C in a hybridization solution comprising 50% formamide, 1% SDS, 1 M NaCl, 10% Dextran sulfate, and washing twice for 30 minutes at 60C in a wash solution comprising 0.1 X SSC and 1% SDS. It is understood in the art that conditions of equivalent stringency can be achieved through variation of temperature and buffer, or salt concentration as described Ausubel, et al. (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994), pp. 6.0.3 to 6.4.10. Modifications in hybridization conditions can be empirically determined or precisely calculated based on the length and the percentage of guanosine/cytosine (GC) base pairing of the probe. The hybridization conditions can be calculated as described in Sambrook, et al., (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), pp. 9.47 to 9.51, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Recombinant expression constructs such as plasmids and viral DNA vectors incorporating polynucleotides of the invention are also provided. Preferably, MLK7-

WO 02/095017

PCT/US02/16387

- encoding polynucleotides are operatively linked to an endogenous or exogenous promoters, enhancers, operators, or regulatory element binding sites, or any combination thereof. Expression constructs of the invention can also include sequences encoding one or more selectable markers that permit identification of host cells bearing the construct.
- 5 Expression constructs can also include sequences that facilitate, and preferably promote, homologous recombination in a host cell. Preferred constructs of the invention also include sequences necessary for replication in a host cell. Expression constructs are preferably utilized for production of an encoded protein, but can also be utilized to amplify a MLK7-encoding polynucleotide sequence.
- 10 In another embodiment of the invention, host cells are provided, including prokaryotic and eukaryotic cells, comprising a polynucleotide of the invention (or vector of the invention) in a manner which permits expression of the encoded MLK7 polypeptide. Polynucleotides of the invention can be introduced into the host cell as part of a plasmid, or as linear DNA comprising an isolated protein coding region or a viral
- 15 vector. Methods for introducing DNA into a host cell are well known and routinely practiced in the art and include transformation, transfection, electroporation, nuclear injection, or fusion with carriers such as liposomes, micelles, ghost cells, and protoplasts. Expression systems of the invention include bacterial, yeast, fungal, plant, insect, invertebrate, vertebrate, and mammalian cells systems.
- 20 Host cells of the invention can provide immunogens based on the MLK7 polypeptide for development of antibodies that are specifically immunoreactive with MLK7. Host cells of the invention are also useful in methods for the large-scale production of MLK7 polypeptide wherein the cells are grown in a suitable culture medium and the desired polypeptide product is isolated from the cells, or from the
- 25 medium in which the cells are grown, by purification methods known in the art, e.g., conventional chromatographic methods including immunoaffinity chromatography, receptor affinity chromatography, hydrophobic interaction chromatography, lectin affinity chromatography, size exclusion filtration, cation or anion exchange chromatography, high pressure liquid chromatography (HPLC), reverse phase HPLC, and the like. Still other
- 30 methods of purification include those methods wherein the desired protein is expressed and purified as a fusion protein having a specific tag, label, or chelating moiety that is recognized by a specific binding partner or agent. The purified protein can be cleaved to

WO 02/095017

PCT/US02/16387

yield the desired protein, or can be left as an intact fusion protein. Cleavage of the fusion component may produce a form of the desired protein having additional amino acid residues as a result of the cleavage process.

The present invention is also directed to antisense polynucleotides that recognize and hybridize to polynucleotides encoding MLK7. Full-length and fragment antisense polynucleotides are provided. Fragment antisense molecules of the invention include those that specifically recognize and hybridize to MLK7 RNA or DNA. Antisense polynucleotides are particularly relevant to regulating expression of MLK7 by those cells expressing MLK7 mRNA. Antisense polynucleotides (preferably 10 to 20 base-pair oligonucleotides) capable of specifically binding to MLK7 expression control sequences or MLK7 RNA are introduced into cells (e.g., by a viral vector or colloidal dispersion system such as a liposome). Phosphorothioate and methylphosphonate antisense oligonucleotides are specifically contemplated for therapeutic use by the invention. Suppression of MLK7 expression at either the transcriptional or translational level is useful to generate cellular or animal models for diseases/conditions characterized by aberrant MLK7 expression.

The invention also provides purified and isolated mammalian MLK7 polypeptides encoded by a polynucleotide of the invention. Preferably, the MLK7 polypeptide comprises the amino acid sequence set out in SEQ ID NO:2. The present invention is also directed to polypeptides that have at least 99%, at least 95%, at least 90%, at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 65%, at least 60%, at least 55% or at least 50% identity and/or homology to the preferred polypeptide of the invention. Percent amino acid sequence "identity" with respect to the preferred polypeptide of the invention is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the residues in the MLK7 sequence after aligning both sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Percent sequence "homology" with respect to the preferred polypeptide of the invention is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the residues in the MLK7 sequence after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum

WO 02/095017

PCT/US02/16387

percent sequence identity, and also considering any conservative substitutions as part of the sequence identity.

The polypeptide of the invention can be isolated from natural cell sources or can be chemically synthesized, but is preferably produced by recombinant procedures involving host cells of the invention. Use of mammalian host cells is expected to provide for such post-translational modifications (e.g., glycosylation, truncation, lipidation, and phosphorylation) as may be needed to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the invention. Glycosylated and non-glycosylated forms of MLK7 polypeptides are also provided.

The present invention is also directed to MLK7 polypeptide variants or analogs. In one example, insertion variants are provided wherein one or more amino acid residues supplement an MLK7 amino acid sequence. Insertions can be located at either or both termini of the protein, or can be positioned within internal regions of the MLK7 amino acid sequence. Insertion variants with additional residues at either or both termini can include, for example, fusion proteins and proteins including amino acid tags or labels. Insertion variants include MLK7 polypeptides wherein one or more amino acid residues are added to a MLK7 acid sequence, or to a biologically active fragment thereof. Variant products of the invention also include mature MLK7 polypeptides wherein leader or signal sequences are removed, with additional amino terminal residues. The additional amino terminal residues can be derived from another protein, or can include one or more residues that are not identifiable as being derived from specific proteins.

The present invention also provides MLK7 variants having additional amino acid residues that result from use of specific expression systems. For example, use of commercially available vectors that express a desired polypeptide as part of a glutathione-S-transferase (GST) fusion product provides the desired polypeptide having an additional glycine residue at position -1 after cleavage of the GST component from the desired polypeptide. Variants that result from expression in other vector systems are also contemplated. Insertional variants also include fusion proteins wherein the amino terminus and/or the carboxy terminus of MLK7 is/are fused to another polypeptide. In addition, other fusion proteins comprising MLK7 or fragments thereof are contemplated by the invention. Numerous fusion partner proteins are well known to the skilled artisan.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

In another aspect, the invention provides deletion variants wherein one or more amino acid residues in a MLK7 polypeptide are removed. Deletions can be effected at one or both termini of the MLK7 polypeptide, or with removal of one or more non-terminal amino acid residues of MLK7. Deletion variants, therefore, include all fragments of an

5 MLK7 polypeptide.

The invention also embraces polypeptide fragments of SEQ ID NO:2 wherein the fragments maintain biological (e.g., ligand binding and/or kinase activity) or immunological properties of an MLK7 polypeptide. Fragments comprising at least 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650,

10 700, 750, 800, 850, 900, 950, or 1000 consecutive amino acids of any of the polypeptides described herein are contemplated by the present invention. Preferred polypeptide fragments have antigenic properties unique to, or specific for, human MLK7 and its allelic and species homologs. Fragments of the invention having the desired biological and immunological properties can be prepared by any of the methods well known and

15 routinely practiced in the art. Additional preferred fragments include the kinase domain of MLK7 (MLK7_{KD}), the leucine zipper region of MLK7 (MLK7_{LZ}), and the kinase domain linked to the leucine zipper region of MLK7 (MLK7_{KD/LZ}).

In another aspect of the present invention, substitution variants of MLK7 polypeptides are provided. Substitution variants include those polypeptides wherein one

20 or more amino acid residues of a MLK7 polypeptide are removed and replaced with alternative residues. In one aspect, the substitutions are conservative in nature. The present invention, however, also includes substitutions that are also non-conservative. Conservative substitutions for this purpose can be defined as set out below. Variant polypeptides include those wherein conservative substitutions have been introduced by

25 modification of polynucleotides encoding polypeptides of the invention. A conservative substitution is recognized in the art as a substitution of one amino acid for another amino acid that has similar properties. Exemplary conservative substitutions include, but are not limited to, non-polar (Gly, Ala, Pro, Ile, Leu, and Val), polar-uncharged (Cys, Ser, Thr, Met, Asn, and Gln), polar-charged (Asp, Glu, Lys, and Arg) aromatic (His, Phe, Trp, and

30 Tyr), and other (Asn, Gln, Asp and Glu). Alternatively, conservative amino acids can be grouped as described in Lehninger, (Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY, NY (1975), pp.71-77) wherein conservative substitutions include, but are not

WO 02/095017

PCT/US02/16387

limited to, non-polar (hydrophobic) 1) aliphatic: Ala, Leu, Ile, Val, and Pro; 2) aromatic: Phe and Trp 3) sulfur-containing: Met; 4) borderline: Gly; or uncharged-polar 1) hydroxyl: Ser, Thr, and Tyr; 2) amides: Asn and Gln; 3) sulfhydryl: Cys; 4) borderline: Gly; or positively charged (basic): Lys, Arg, and His; or negatively charged (acidic): Asp and Glu. As still another alternative, exemplary conservative substitutions include, but are not limited to, Ala (Val, Leu, Ile), Arg (Lys, Gln, Asn), Asn (Gln, His, Lys, Arg), Asp (Glu, Cys (Ser), Gln (Asn), Glu (Asp), His (Asn, Gln, Lys, Arg), Ile (Leu, Val, Met, Ala, Phe), Leu (Ile, Val, Met, Ala, Phe), Lys (Arg, Gln, Asn), Met (Leu, Phe, Ile), Phe (Leu, Val, Ile, Ala), Pro (Gly), Ser (Thr), Thr (Ser), Trp (Tyr), Tyr (Trp, Phe, Thr, Ser), and Val (Ile, Leu, Met, Phe, Ala). It should be understood that the definition of polypeptides of the invention is intended to include polypeptides bearing modifications other than insertion, deletion, or substitution of amino acid residues. By way of example, the modifications may be covalent in nature, and include for example, chemical bonding with polymers, lipids, other organic, and inorganic moieties.

In a related embodiment, the present invention provides compositions comprising purified polypeptides of the invention. Preferred compositions comprise, in addition to the polypeptide of the invention, a liquid, semisolid, or solid diluent that serves as a vehicle, excipient, carrier or medium. The compositions can also comprise, in addition to the polypeptide of the invention, a pharmaceutically acceptable (i.e., sterile and non-toxic) liquid, semisolid, or solid diluent that serves as a vehicle, excipient, carrier or medium. Any diluent known in the art can be used including, but are not limited to, water, saline solutions, polyoxyethylene sorbitan monolaurate, magnesium stearate, methyl- and propylhydroxybenzoate, talc, alginates, starches, lactose, sucrose, dextrose, sorbitol, mannitol, glycerol, calcium phosphate, mineral oil, and cocoa butter.

A polynucleotide comprising any of the MLK7 nucleotide sequences described above can be synthesized by PCR, with the PCR oligonucleotide primers produced from the nucleotide sequences provided herein. See U.S. Patents 4,683,195 and 4,683,202. In addition, numerous cloning and *in vitro* amplification methodologies are well known to those skilled in the art. Examples of these techniques are found in, for example, Berger *et al.*, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Methods in Enzymology, 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger), which is incorporated herein by reference in its entirety.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

The polynucleotides of the present invention, and fragments derived therefrom, are useful for screening for restriction fragment length polymorphism (RFLP) associated with particular disorders, as well as for genetic mapping.

Antisense oligonucleotides, or fragments of a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1, or sequences complementary or homologous thereto, derived from the nucleotide sequences of the present invention encoding MLK7 are useful as diagnostic tools for probing gene expression in various tissues. For example, tissue can be probed *in situ* with oligonucleotide probes carrying detectable groups by conventional autoradiography techniques to determine native expression of the polynucleotide or pathological conditions relating thereto. Antisense oligonucleotides are preferably directed to regulatory regions of a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1, or mRNA corresponding thereto, including, but not limited to, the initiation codon, TATA box, enhancer sequences, other regulatory sequences, and the like.

Automated sequencing methods can be used to obtain or verify the nucleotide sequence of an MLK7 polynucleotide. The MLK7 polynucleotide sequences of the present invention are believed to be 100% accurate. However, as is known in the art, nucleotide sequence obtained by automated methods can contain some errors. Nucleotide sequences determined by automation are typically at least about 90%, more typically at least about 95% to at least about 99.9% identical to the actual nucleotide sequence of a given nucleic acid molecule. The actual sequence can be more precisely determined using manual sequencing methods, which are well known in the art.

Another aspect of the present invention is directed to vectors, or recombinant expression vectors, comprising any of the nucleic acid molecules described above. Vectors are used herein either to amplify DNA or RNA encoding MLK7 and/or to express DNA which encodes MLK7. Preferred vectors include, but are not limited to, plasmids, phages, cosmids, episomes, viral particles or viruses, and integratable DNA fragments. Preferred viral particles include, but are not limited to, adenoviruses, baculoviruses, parvoviruses, herpesviruses, poxviruses, adeno-associated viruses, Semliki Forest viruses, vaccinia viruses, and retroviruses. Preferred expression vectors include, but are not limited to, pcDNA3 (Invitrogen) and pSVL (Pharmacia Biotech). Other expression vectors include, but are not limited to, pSPORT vectors, pGEM vectors (Promega),

WO 02/095017

PCT/US02/16387

pPROEX vectors (LTI, Bethesda, MD), Bluescript vectors (Stratagene), pQE vectors (Qiagen), pSE420 (Invitrogen), and pYES2 (Invitrogen).

Preferred expression vectors are replicable polynucleotide constructs in which a polynucleotide sequence encoding MLK7 is operably linked or connected to suitable control sequences capable of effecting the expression of an MLK7 in a suitable host. Generally, control sequences include a transcriptional promoter, an optional operator sequence to control transcription, a sequence encoding suitable mRNA ribosomal binding, and sequences which control the termination of transcription and translation. Preferred vectors preferably contain a promoter that is recognized by the host organism.

The promoter sequences of the present invention can be prokaryotic, eukaryotic or viral. Examples of suitable prokaryotic sequences include the PR and PL promoters of bacteriophage lambda (The bacteriophage Lambda, Hershey, A. D., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1973), which is incorporated herein by reference in its entirety; Lambda II, Hendrix, R. W., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1980), which is incorporated herein by reference in its entirety); the trp, recA, heat shock, and lacZ promoters of *E. coli* and the SV40 early promoter (Benoist *et al.*, *Nature*, **1981**, 290, 304-310, which is incorporated herein by reference in its entirety). Additional promoters include, but are not limited to, mouse mammary tumor virus, long terminal repeat of human immunodeficiency virus, maloney virus, cytomegalovirus immediate early promoter, Epstein Barr virus, rous sarcoma virus, human actin, human myosin, human hemoglobin, human muscle creatine, and human metallothionein.

Additional regulatory sequences can also be included in preferred vectors. Preferred examples of suitable regulatory sequences are represented by the Shine-Dalgarno of the replicase gene of the phage MS-2 and of the gene cII of bacteriophage lambda. The Shine-Dalgarno sequence can be directly followed by DNA encoding MLK7 and result in the expression of the mature MLK7. Moreover, suitable expression vectors can include an appropriate marker that allows the screening of the transformed host cells. An origin of replication can also be provided either by construction of the vector to include an exogenous origin or can be provided by the host cell chromosomal replication mechanism. If the vector is integrated into the host cell chromosome, the latter may be sufficient. Alternatively, rather than using vectors which contain viral origins of replication, one skilled in the art can transform mammalian cells by the method of co-

WO 02/095017

PCT/US02/16387

transformation with a selectable marker and MLK7 DNA. An example of a suitable marker is dihydrofolate reductase (DHFR) or thymidine kinase (tk) (see, U.S. Patent 4,399,216). Methods for construction of mammalian expression vectors are disclosed in, for example, Okayama *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **1983**, 3, 280, Cosman *et al.*, *Mol. Immunol.*, **1986**, 23, 935, Cosman *et al.*, *Nature*, **1984**, 312, 768, EP-A-0367566, and international publication WO 91/18982, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Another aspect of the present invention is directed to transformed host cells having an expression vector comprising any of the nucleic acid molecules described above. Expression of the nucleotide sequence occurs when the expression vector is introduced into an appropriate host cell. Suitable host cells for expression of the polypeptides of the invention include, but are not limited to, prokaryotes, yeast, and eukaryotes. If a prokaryotic expression vector is employed, then the appropriate host cell can be any prokaryotic cell capable of expressing the cloned sequences. Suitable prokaryotic cells include, but are not limited to, bacteria of the genera *Escherichia*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*.

If a eukaryotic expression vector is employed, then the appropriate host cell can be any eukaryotic cell capable of expressing the cloned sequence. Preferably, eukaryotic cells are cells of higher eukaryotes. Suitable eukaryotic cells include, but are not limited to, non-human mammalian tissue culture cells and human tissue culture cells. Preferred host cells include, but are not limited to, insect cells, HeLa cells, Chinese hamster ovary cells (CHO cells), African green monkey kidney cells (COS cells), human 293 cells, and murine 3T3 fibroblasts. Propagation of such cells in cell culture has become a routine procedure (see, *Tissue Culture*, Academic Press, Kruse and Patterson, eds. (1973), which is incorporated herein by reference in its entirety).

In addition, a yeast host may be employed as a host cell. Preferred yeast cells include, but are not limited to, the genera *Saccharomyces*, *Pichia*, and *Kluveromyces*. Preferred yeast hosts are *S. cerevisiae* and *P. pastoris*. Preferred yeast vectors can contain an origin of replication sequence from a 2T yeast plasmid, an autonomously replication sequence (ARS), a promoter region, sequences for polyadenylation, sequences for transcription termination, and a selectable marker gene. Shuttle vectors for replication in both yeast and *E. coli* are also included herein.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

Alternatively, insect cells may be used as host cells. In a preferred embodiment, the polypeptides of the invention are expressed using a baculovirus expression system (see, Luckow *et al.*, *BioTechnology*, **1988**, *6*, 47, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, O'Rielly *et al.* (Eds.), W.H. Freeman and Company, New York, 5 1992, and U.S. Patent 4,879,236, each of which is incorporated herein by reference in its entirety). In addition, the MAXBAC™ complete baculovirus expression system (Invitrogen) and the BAC-TO-BAC™ System (Life Technologies) can, for example, be used for production in insect cells.

Also comprehended by the present invention are antibodies (e.g., monoclonal 10 and polyclonal antibodies, single chain antibodies, chimeric antibodies, bifunctional/bispecific antibodies, humanized antibodies, human antibodies, and complementary determining region (CDR)-grafted antibodies, including compounds that include CDR sequences which specifically recognize a polypeptide of the invention) which bind to MLK7, preferably specific for MLK7, or fragments thereof. Antibody 15 fragments, including Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv, are also provided by the invention. The term "specific for," when used to describe antibodies of the invention, indicates that the variable regions of the antibodies of the invention recognize and bind MLK7 polypeptides exclusively (i.e., are able to distinguish MLK7 polypeptide from other known MLK polypeptides by virtue of measurable differences in binding affinity, despite the possible 20 existence of localized sequence identity, homology, or similarity between MLK7 and such polypeptides). It will be understood that specific antibodies may also interact with other proteins (for example, *S. aureus* protein A or other antibodies in ELISA techniques) through interactions with sequences outside the variable region of the antibodies, and, in particular, in the constant region of the molecule. Screening assays to determine binding 25 specificity of an antibody of the invention are well known and routinely practiced in the art (see Harlow *et al.* (Eds.), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6).

Antibodies of the invention are useful for therapeutic purposes (by modulating 30 activity of MLK7), diagnostic purposes to detect or quantitate MLK7, and purification of MLK7. Kits comprising an antibody of the invention for any of the purposes described herein are also contemplated. In general, a kit of the invention also includes a control antigen for which the antibody is immunospecific.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

It is contemplated that in other human disease states or abnormal conditions, preventing the expression of, or inhibiting the activity of, MLK7 will be useful in treating disease states or abnormal conditions. It is contemplated that antisense therapy or gene therapy may be applied to regulate the expression or activity of an MLK7 polypeptide.

5 The present invention is also directed to kits, including pharmaceutical kits. The kits can comprise any of the polynucleotides described above, any of the polypeptides described above, or any antibody which binds to a polypeptide of the invention as described above, as well as a negative control. The kit preferably comprises additional components, such as, for example, instructions, solid support, reagents helpful for
10 quantification, and the like.

Another aspect of the present invention is directed to compositions, including pharmaceutical compositions, comprising any of the polynucleotides or recombinant expression vectors described above and an acceptable carrier or diluent. Preferably, the carrier or diluent is pharmaceutically acceptable. Suitable carriers are described in the
15 most recent edition of Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, a standard reference text in this field, which is incorporated herein by reference in its entirety. Preferred examples of such carriers or diluents include, but are not limited to, water, saline, Ringer's solution, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Liposomes and non-aqueous vehicles such as fixed oils can also be used. The formulations are
20 sterilized by commonly used techniques.

Specific binding compounds, including natural ligands and synthetic compounds, can be identified or developed using isolated or recombinant MLK7 products, MLK7 variants, or preferably, cells expressing such products. Binding compounds are useful for purifying MLK7 products and detection or quantification of MLK7 products in fluid and
25 tissue samples using known immunological procedures. Binding compounds are also manifestly useful in modulating (i.e., blocking, inhibiting or stimulating) biological activities of MLK7, especially those activities involved in the JNK stress-activated kinase pathway. Thus, compounds that bind MLK7 polynucleotides or polypeptides can be identified.

30 The polynucleotide and polypeptide sequence information provided by the present invention also makes possible identification of binding compounds with which an MLK7 polypeptide or polynucleotide will interact. Methods to identify binding

WO 02/095017

PCT/US02/16387

compounds include solution assays, *in vitro* assays wherein an MLK7 polypeptide is immobilized, and cell-based assays. Identification of binding compounds of MLK7 polypeptides provides candidates for therapeutic or prophylactic intervention in pathologies associated with normal and aberrant MLK7 biological activity.

5 The invention includes several assay systems for identifying MLK7 binding compounds. In solution assays, methods of the invention comprise the steps of i) contacting an MLK7 polypeptide with one or more candidate binding compounds and ii) identifying the compounds that bind to the MLK7 polypeptide. Identification of the compounds that bind the MLK7 polypeptide can be achieved by isolating the MLK7
10 polypeptide/binding compound complex, and separating the binding compound from the MLK7 polypeptide. An additional step of characterizing the physical, biological, and/or biochemical properties of the binding compound is also contemplated in other embodiments of the invention. In one aspect, the MLK7 polypeptide/binding compound complex can be isolated using an antibody immunospecific for either the MLK7
15 polypeptide or the candidate binding compound.

In still other embodiments, either the MLK7 polypeptide or the candidate binding compound comprises a label or tag that facilitates its isolation, and methods of the invention to identify binding compounds include a step of isolating the MLK7 polypeptide/binding compound complex through interaction with the label or tag. An
20 exemplary tag of this type is a poly-histidine sequence, generally around six histidine residues, that permits isolation of a compound so labeled using nickel chelation. Other labels and tags, such as the FLAG® tag (Eastman Kodak, Rochester, NY), well known and routinely used in the art, are embraced by the invention.

In one variation of an *in vitro* assay, the invention provides a method comprising
25 the steps of i) contacting an immobilized MLK7 polypeptide with a candidate binding compound and ii) detecting binding of the candidate compound to the MLK7 polypeptide. In an alternative embodiment, the candidate binding compound is immobilized and binding of MLK7 is detected. Immobilization can be accomplished using any of the methods well known in the art, including covalent bonding to a support, a bead, or a
30 chromatographic resin, as well as non-covalent, high affinity interactions such as antibody binding, or use of streptavidin/biotin binding wherein the immobilized compound includes a biotin moiety. Detection of binding can be accomplished i) using a radioactive

WO 02/095017

PCT/US02/16387

label on the compound that is not immobilized, ii) using of a fluorescent label on the non-immobilized compound, iii) using an antibody immunospecific for the non-immobilized compound, or iv) using a label on the non-immobilized compound that excites a fluorescent support to which the immobilized compound is attached, as well as other techniques well known and routinely practiced in the art.

5 The invention also provides cell-based assays to identify binding compounds of a MLK7 polypeptide. In one embodiment, the invention provides a method comprising the steps of contacting an MLK7 polypeptide expressed on the surface of a cell with a candidate binding compound and detecting binding of the candidate binding compound to the MLK7 polypeptide. In a preferred embodiment, the detection comprises detecting a calcium flux or other physiological event in the cell caused by the binding of the compound.

Agents that modulate (i.e., increase, decrease, or block) MLK7 activity or expression can be identified by incubating a putative modulator with a cell containing a MLK7 polypeptide or polynucleotide and determining the effect of the putative modulator on MLK7 activity or expression. The selectivity of a compound that modulates the activity of MLK7 can be evaluated by comparing its effects on MLK7 to its effect on other MLK compounds. Selective modulators can include, for example, antibodies and other proteins, peptides, or organic molecules which specifically bind to an MLK7 polypeptide or an MLK7-encoding polynucleotide. Modulators of MLK7 activity will be therapeutically useful in treatment of diseases and physiological conditions in which normal or aberrant MLK7 activity is involved. Compounds identified as a result of the methods described herein (binding compounds and/or modulators of MLK7 polynucleotides and/or polypeptides) can be used in the treatment of diseases and conditions related to the JNK stress-activated kinase pathway, including, but not limited to, neurodegenerative diseases or conditions and inflammatory conditions or diseases. Representative diseases or conditions include, but are not limited to, Alzheimer's disease (Zhu *et al.*, *J. Neurochem.*, **2001**, 76, 435-441), Huntington's disease (Yasuda *et al.*, *Genes Cells*, **1999**, 4, 743-756; Liu, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 28873-28877), multiple sclerosis (Bonetti *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **1999**, 155, 1433-1438), neuropathic pain (Rausch *et al.*, *Neuroscience*, **2000**, 101, 767-777), Parkinson's disease (Saporito *et al.*, *J. Neurochem.*, **2000**, 75, 1200-1208), traumatic brain injury (Raghupathi *et al.*, *J. Neurotrauma*, **2000**,

15
20
25
30

WO 02/095017

PCT/US02/16387

17, 927-938), rheumatoid arthritis (Schett *et al.*, *Arthritis Rheum.*, **2000**, 43, 2501-2512), ethanol exposure during neural development (McAlhany *et al.*, *Brain Res. Dev.*, **2000**, 119, 209-216), pancreatitis (Hofken *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 276, 680-685), polycystic kidney disease (Arnould *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 6013-6018), cardiovascular ischaemia (Force *et al.*, *Circ. Res.*, **1996**, 78, 947-953), hypertension (Xu *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **1996**, 97, 508-514), chemotherapy-induced endothelial apoptosis, glioblastoma (Potapova *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 24767-24775), tamoxifen-resistant breast tumors (Schiff *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2000**, 92, 1926-1934), endothelial cell effects resulting from high glucose levels in diabetes mellitus (Ho *et al.*, *Circulation*, **2000**, 101, 2618-2624), and the like. MLK7 polynucleotides and polypeptides, as well as MLK7 modulators, can also be used in diagnostic assays for such diseases or conditions.

Another aspect of the present invention is directed to methods of identifying compounds that bind to either MLK7 or polynucleotides encoding MLK7, comprising contacting MLK7, or a polynucleotide encoding the same, with a compound, and determining whether the compound binds MLK7, or a nucleic acid molecule encoding the same. Binding can be determined by binding assays which are well known to the skilled artisan, including, but not limited to, gel-shift assays, Western blots, radiolabeled competition assay, phage-based expression cloning, co-fractionation by chromatography, co-precipitation, cross linking, interaction trap/two-hybrid analysis, southwestern analysis, ELISA, and the like, which are described in, for example, Current Protocols in Molecular Biology, 1999, John Wiley & Sons, NY, which is incorporated herein by reference in its entirety. The compounds to be screened include (which may include compounds which are suspected to bind MLK7, or a nucleic acid molecule encoding the same), but are not limited to, extracellular, intracellular, biologic or chemical origin. The MLK7 polypeptide or polynucleotide employed in such a test may either be free in solution, attached to a solid support, borne on a cell surface or located intracellularly or associated with a portion of a cell. One skilled in the art can, for example, measure the formation of complexes between MLK7 and the compound being tested. Alternatively, one skilled in the art can examine the diminution in complex formation between MLK7 and its substrate caused by the compound being tested.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

Another aspect of the present invention is directed to methods of identifying compounds that modulate (i.e., increase or decrease) activity of MLK7 comprising contacting MLK7 with a compound, and determining whether the compound modifies activity of MLK7. The activity in the presence of the test compound is measured to the activity in the absence of the test compound. The activity of MLK7 polypeptides of the invention can be determined by, for example, examining the kinase activity or ability to phosphorylate particular substrates including, but not limited to, MKK4 and MKK7.

In preferred embodiments of the invention, methods of screening for compounds that modulate MLK7 activity comprise contacting test compounds with MLK7 and assaying for the presence of a complex between the compound and MLK7. In such assays, the ligand is typically labeled. After suitable incubation, free ligand is separated from that present in bound form, and the amount of free or uncomplexed label is a measure of the ability of the particular compound to bind to MLK7.

Candidate modulators contemplated by the invention include compounds selected from libraries of either potential activators or potential inhibitors. There are a number of different libraries used for the identification of small molecule modulators, including: i) chemical libraries, ii) natural product libraries, and iii) combinatorial libraries comprised of random peptides, oligonucleotides or small organic molecules. Chemical libraries consist of random chemical structures, some of which are analogs of known compounds or analogs of compounds that have been identified as "hits" or "leads" in other drug discovery screens, some of which are derived from natural products, and some of which arise from non-directed synthetic organic chemistry. Natural product libraries are collections of microorganisms, animals, plants, or marine organisms which are used to create mixtures for screening by: i) fermentation and extraction of broths from soil, plant or marine microorganisms or ii) extraction of plants or marine organisms. Natural product libraries include polyketides, non-ribosomal peptides, and variants (non-naturally occurring) thereof. Combinatorial libraries are composed of large numbers of peptides, oligonucleotides, or organic compounds as a mixture. These libraries are relatively easy to prepare by traditional automated synthesis methods, PCR, cloning, or proprietary synthetic methods. Of particular interest are non-peptide combinatorial libraries. Other libraries of interest include peptide, protein, peptidomimetic, multiparallel synthetic collection, recombinatorial, and polypeptide libraries. Identification of

WO 02/095017

PCT/US02/16387

modulators through use of the various libraries described herein permits modification of the candidate "hit" (or "lead") to optimize the capacity of the "hit" to modulate activity.

Other assays can be used to identify compounds that bind to or modulate the activity of an MLK7 polypeptide, including assays that identify ligands of the target protein through measuring direct binding of test ligands to the target protein, as well as assays that identify ligands of target proteins through affinity ultrafiltration with ion spray mass spectroscopy/HPLC methods or other physical and analytical methods. Alternatively, such binding interactions are evaluated indirectly using the yeast two-hybrid system described in Fields *et al.*, *Nature*, **1989**, 340, 245-246, and Fields *et al.*, *Trends in Genetics*, **1994**, 10, 286-292, both of which are incorporated herein by reference in their entirety.

In a particular embodiment, the novel compounds identified by the screening methods according to the invention are low molecular weight organic molecules, in which case a composition or pharmaceutical composition can be prepared thereof for oral intake, such as in tablets. The compositions, or pharmaceutical compositions, comprising the nucleic acid molecules, vectors, polypeptides, antibodies and compounds identified by the screening methods described herein, can be prepared for any route of administration including, but not limited to, oral, intravenous, cutaneous, subcutaneous, nasal, intramuscular or intraperitoneal. The nature of the carrier or other ingredients will depend on the specific route of administration and particular embodiment of the invention to be administered. Examples of techniques and protocols that are useful in this context are, inter alia, found in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A (ed.), 1980, which is incorporated herein by reference in its entirety.

The dosage of these low molecular weight compounds will depend on the disease state or condition to be treated and other clinical factors such as weight and condition of the human or animal and the route of administration of the compound. For treating human or animals, between approximately 0.5 mg/kg of body weight to 500 mg/kg of body weight, between approximately 1.0 mg/kg of body weight to 100 mg/kg of body weight, or between approximately 10 mg/kg of body weight to 50 mg/kg of body weight of the compound can be administered. Therapy is typically administered at lower dosages and is continued until the desired therapeutic outcome is observed. The proper dosage depends on various factors such as the type of disease being treated, the particular

WO 02/095017

PCT/US02/16387

composition being used and the size and physiological condition of the patient. Therapeutically effective doses for the compounds described herein can be estimated initially from cell culture and animal models. For example, a dose can be formulated in animal models to achieve a circulating concentration range that initially takes into account the IC₅₀ as determined in cell culture assays. The animal model data can be used to more accurately determine useful doses in humans.

Another aspect of the present invention is directed to heterodimers containing MLK7 and any of the MLK proteins. There have been reports of leucine zipper-dependent heterodimers between family members. For example, MLK3 can co-immunoprecipitate co-expressed MLK2 (Leung *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 32408-32415). Co-expression in the same cell can result in heterodimers as well as homodimers of these proteins. Heterodimers could have a unique activity compared to the homodimers and represent an additional target for screening in the methods described above.

In order that the invention disclosed herein may be more efficiently understood, examples are provided below. It should be understood that these examples are for illustrative purposes only and are not to be construed as limiting to the invention in any manner. Throughout these examples, molecular cloning reactions, and other standard recombinant DNA techniques, were carried out according to methods described in Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) (hereinafter, "Maniatis *et al.*"), using commercially available enzymes, except where otherwise noted. Examples 1 and 2 below are actual. Example 3 is prophetic.

EXAMPLES

25 Example 1: Isolation of Polynucleotide Encoding Human MLK7

A. Isolation of cDNA Encoding Human MLK7

A survey of recently added human genomic DNA sequences revealed a putative seventh member of the mixed lineage kinase family. This human kinase, designated MLK7, was found in Genbank Accession No. AL133380, a completed genomic sequence mapping to q42.2-q43 of chromosome 1. Alignment of the putative kinase domain places this protein in the previously defined MLK1-3 subfamily, with 76% homology to its closest relatives, MLKs 1 and 3. The putative leucine zipper region shown in Figure 2

WO 02/095017

PCT/US02/16387

would also place this protein in that subfamily, having four putative alpha helical repeats separated by only a 6 amino acid stretch. The full-length protein has the highest homology with MLK1 (44% identity), which was sufficient to allow tentative identification of both the putative N- and C-termini of the protein. Only two recently-deposited MLK7 ESTs were present in Genbank (Accession No. AW813675 from stomach and AW408639 from lymph tissue (germinal center B cells)), requiring additional proof that this genomic region was expressed and not a pseudogene. Clones containing part of the cDNA encoding MLK7 were obtained using PCR screening of pooled human adrenal gland, adult brain, kidney, liver, lymph node, pancreas, prostate, and stomach cDNA libraries (Edge Biosystems). The PCR primers used to screen the libraries were 5'-ATGAAAGAATGCTGGCAACAAGACCCTC-3' (SEQ ID NO:4) and 5'-AGGTAAACTGATTGATGTCCATCTTG-3' (SEQ ID NO:5). One partial cDNA was isolated repeatedly, encoding a middle portion of the cDNA. Other clones contained genomic sequence or were unrelated. These data are consistent with this cDNA being of very low abundance in these libraries. This sequence was then extended on the 5' and 3' ends by PCR based on homology with MLK1. Extension by 5' RACE was also attempted, but was unsuccessful due to the low abundance and exceptionally high GC content of this cDNA.

The full length human MLK7 cDNA was assembled into the pcDNA6-V5His plasmid (Invitrogen). The plasmid contains the full-length human cDNA (without the stop codon) in frame with a C-terminal epitope and affinity purification fusion partner and is identified as pcDNA6-hMLK7. This plasmid, pcDNA6-hMLK7, was submitted for deposit with American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, on 24 May 2001 under Accession No. ATCC. The full length cDNA and deduced amino acid sequences of human MLK7 are provided in SEQ ID NO:1 and 2, respectively.

B. Structural Comparison to Members of the Mixed Lineage Kinase Family

The kinase domains of the six members of the mixed lineage kinase family are shown aligned to the putative kinase domain of MLK7 (Figure 1). Amino acids that are conserved in tyrosine kinases, serine/threonine kinases or both are shown as designated (consensus amino acids from Hanks *et al.*, *Meth. Enzymol.*, **1991**, 200, 38-62). MLK7,

WO 02/095017

PCT/US02/16387

like other members of the mixed lineage kinase family, shares homology throughout most of the kinase domain with tyrosine kinases. The presence of lysine in the sequence HRDLKSRN (SEQ ID NO:3) in the catalytic domain of subdomain VIb suggests that, like other members of the MLK family, this would catalyze serine/threonine phosphorylation. Alignment of these kinase domains using the Clustal method (with PAM250 residue weight table) in the MegAlign program (Lasergene DNASTar) predicts MLK7 to be a member of the MLK1-3 subfamily (Figure 2). The percent homology among the kinase domains of the MLK family is shown in Table 1.

Table 1

Kinase Domain	MLK1	MLK2	MLK3	MLK7	DLK	LZK	MLK6
MLK1	-----	75.4%	77.7%	75.4%	42.9%	41.7%	42.0%
MLK2	-----	-----	76.5%	73.1%	44.6%	42.5%	41.6%
MLK3	-----	-----	-----	76.2%	42.5%	42.5%	40.0%
MLK7	-----	-----	-----	-----	38.3%	39.2%	40.4%
DLK	-----	-----	-----	-----	-----	87.1%	37.1%
LZK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	35.4%
MLK6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

The full-length MLK7 protein shows weaker homology (using the same analysis as described above) to the family than that of the kinase domain (Table 2).

Table 2

Full Length	MLK1	MLK2	MLK3	MLK7	DLK	LZK	MLK6 α
MLK1	-----	49.0%	43.6%	43.1%	22.2%	19.4%	20.1%
MLK2	-----	-----	44.3%	41.8%	23.6%	19.7%	19.6%
MLK3	-----	-----	-----	44.9%	22.7%	20.3%	18.8%
MLK7	-----	-----	-----	-----	19.1%	18.6%	18.5%
DLK	-----	-----	-----	-----	-----	50.5%	18.8%
LZK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	17.6%
MLK6 α	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

There is a putative SH3 domain N-terminal to the kinase domain. There is also a putative dual leucine zipper region C-terminal to the kinase domain, followed by a small region comprised of a preponderance of basic amino acids similar to the nuclear localization signals from several proteins. The putative leucine zipper region (Figure 4) also places MLK7 in the MLK1-3 subfamily, having four putative alpha-helical repeats separated by

WO 02/095017

PCT/US02/16387

only a six amino acid stretch. The full-length protein has high homology with MLK1 (43.1%), which was sufficient to allow identification of both the putative N- and C-termini of the protein. This homology was used to clone the full-length MLK7 cDNA. The domain structure of MLK7 is shown in Figure 3. The sequence of the leucine zipper region of MLK7 is shown and compared to other MLK proteins in Figure 4.

C. Expression Profile of hMLK7

The tissue distribution of hMLK7 was evaluated using the Rapid Scan™ gene expression panel (Origene). Rapid Scan™ is a PCR based approach for using first strand cDNAs derived from 24 different tissues to generate an expression profile in a 96 well plate format. These 24 cDNAs are arrayed in 4-log dilutions enabling amplification and visualization within the linear range of PCR. The protocol requires PCR reactions to be carried out in a 96-well thermal cycler, using gene specific primer pairs and visualizing the amplification on agarose gels. Table 3 shows qualitative data obtained from duplicate screening of the panel.

Table 3

	<u>Tissue</u>	<u>Edge Primer Pair</u>
	brain	++
	heart	+
20	kidney	++
	spleen	-
	liver	++
	colon	++
	lung	++
25	small intestine	+
	muscle	+
	stomach	++
	testis	++
	placenta	-
30	salivary gland	++
	thyroid gland	+
	adrenal gland	++
	pancreas	++
	ovary	+
35	uterus	-
	prostate	+
	skin	-
	peripheral blood leukocytes	+
	bone marrow	+
40	fetal brain	+
	fetal liver	+

30

WO 02/095017

PCT/US02/16387

These experiments utilized the primer pair ATGAAAGAATGCTGGCAACAAGACC CTC (SEQ ID NO:4) and AGGTAAACTGATTCGATGTCCATCTTTG (SEQ ID NO:5). A score of ++ in this MLK7 analysis indicated a visible PCR product at the two highest cDNA concentrations. More than half of the tissue screen gave little or no detectable product, which suggested that MLK7 mRNA is not in high abundance in any tissue.

Example 2: Recombinant Expression of Biologically Active MLK7

A. JNK Pathway Activation by Full-Length MLK7 Expression in Mammalian Cells

MLK family members overexpressed in mammalian cells activate the cJun-NH2-terminal kinase (JNK) pathway (Hirai *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 15167; Merritt *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 10195). To determine whether full-length MLK7 does the same, CHO cells were co-transfected with plasmids that drive constitutive expression of MLK7 and constitutive expression of JNK1, determining the JNK activity in lysates by ELISA.

The coding region for full-length MLK7 was inserted into the mammalian expression vector pcDNA6V5/HisA (Invitrogen) in-frame with the C-terminal V5 epitope and His₆ affinity purification fusion partner. Each plasmid was co-transfected with a JNK1 expression vector into CHO cells plated in six-well dishes, using the reagent LipofectaminePLUS (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. Duplicate cultures were transfected for each condition. As a positive control, an expression vector for MLK3 was substituted for MLK7; as a negative control, an empty vector (no protein coding region) was substituted. Two days after transfection, the cells were treated for six hours with CEP11004 at three concentrations (250 nM, 1 μM, and 5 μM), or with DMSO vehicle control, in reduced serum medium (DMEM plus 0.5% fetal bovine serum). At the end of this treatment the cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed with 0.1 ml per well of 1% (v/v) Triton X-100, 20 mM Tris pH 7.6, 50 mM NaCl, protease inhibitor cocktail (1 mM Pefabloc SC, 10 μM E-64, 10 μM leupeptin, 10 μM pepstatin A, 1 mM EDTA), and phosphatase inhibitor cocktail (25 mM β-glycerophosphate, 2 mM activated sodium orthovanadate). The JNK activity in transfected cell lysates was measured using an ELISA-based format as described for receptor tyrosine kinases (Angeles *et al.*, 1996, *Anal. Biochem.*, 236, 49-55). The NH2-terminus of the JNK substrate cJun (residues 1-79) was expressed in *E. coli*

WO 02/095017

PCT/US02/16387

as a GST fusion protein and purified by standard glutathione affinity methods. Smith *et al.*, *Gene*, **1988**, 67, 31-40. A 96-well microtiter plate (FluoroNUNC Maxisorp) was coated with substrate solution (10 µg/ml GST-cJun in Tris-buffered saline), then washed several times with wash buffer (0.05% Tween-20 in Tris-buffered saline). The plate was

5 blocked with block buffer (3% BSA and 0.2% Tween-20 in Tris-buffered saline) for one hour at 37C, then washed several times with wash buffer. Concentrated assay buffer was then added to each well, followed by lysate corresponding to equal protein for each sample. The kinase reaction was initiated by adding ATP to 50 µM and incubating at 37C for 15 minutes. The final assay mixture (100 µl per well) contained 20 mM HEPES, pH

10 7.4, 0.02% BSA, 20 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 5 mM EGTA, 25 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM activated sodium orthovanadate, and 50 µM ATP. The kinase reaction was terminated by addition of EDTA to 83 mM, and the plate was washed several times with wash buffer. The phosphorylated product was detected by incubation with anti-phospho-cJun (Ser73) antibody (NEB 9164, 1:5000 in block buffer), washing, incubation with goat

15 anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate (Southern Biotechnology Associates #4050-04, 1:2500 dilution in block buffer), washing, and reaction with the fluorogenic alkaline phosphatase substrate 4-methylumbelliferyl phosphate (0.02 mg/ml in 1.0 M diethanolamine, pH 9.6, 5 mM MgCl₂) for 30 minutes at 37C. The reaction was stopped with 1.0 M dibasic sodium phosphate and the product measured in a microplate reader

20 (Cytofluor, 360 nm excitation, 460 nm emission). A preliminary ELISA was performed to determine the maximum amount of lysate protein that yielded a linear signal. In this experiment, the MLK3 was the limiting sample, maintaining linearity only up to 80 ng of lysate protein. Assays were then performed on 80 ng of each lysate.

Expression of MLK7 was confirmed by probing Western blots of cell lysates

25 with antibody to the V5 epitope tag (data not shown). MLK7 appeared at an apparent mobility corresponding to 120 kDa (expected 117.4 kDa). Expression of MLK7 elevated JNK activity over the vector control (Figure 5). Treatment of MLK7-transfected cells with CEP11004 partially reduced JNK activity, just as this treatment does to MLK3-transfected cells. These data confirm that MLK7 activates the JNK pathway in

30 mammalian cells, just like other MLK family members, and just as predicted by the *in vitro* data.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

B. In Vitro Activity of Recombinant GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ}

A portion of the human MLK7 protein encoding either the kinase domain (amino acids 93-416) or the kinase domain/leucine zipper (amino acids 93-489) were expressed with an NH₂-terminal GST fusion partner in Sf21 insect cells using standard methods (e.g. Meyer *et al.*, *J. Neurochem.*, **1994**, 62, 825-833) and purified using glutathione affinity purification methods (Smith *et al.*, *Gene*, **1988**, 67, 31-40). The kinase activities of baculoviral human GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ} were demonstrated using three different substrates, kinase-dead forms of GST-MKK4 and GST-MKK7, and myelin basic protein (MBP). Additionally, activation of the JNK pathway activation by the two GST-MLK7 forms was shown *in vitro*. Both GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ} were able to phosphorylate inactivated MKK4 and, as a consequence of this phosphorylation event, MKK4 was activated and was able to phosphorylate its protein substrate GST-JNK1β1(K55A). Similar results were obtained when inactivated MKK7 was used as the downstream target of MLK7.

C. Phosphorylation of Myelin Basic Protein

The kinase activity of baculoviral GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ} were assessed separately using the Millipore Multiscreen TCA "in-plate" format as described for protein kinase C (Pitt *et al.*, *J. Biomol. Screening*, **1996**, 1: 47-51). Briefly, each 50-μl assay mixture contained 20 mM Hepes, pH 7.2, 5 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 25 mM β-glycerophosphate, 100 μM ATP, 0.25 μCi [γ -³²P]ATP, 500 μg/ml myelin basic protein (UBI #13-104), and 0.1-5 μg/ml of baculoviral GST-MLK7_{KD} (or GST-MLK7_{KD/LZ}). Samples were incubated for 15 minutes at 37C. The reaction was stopped by adding ice cold 50% TCA and the proteins were allowed to precipitate for 30 minutes at 4C. The plates were then washed with ice cold 25% TCA. Supermix scintillation cocktail was added, and the plates were allowed to equilibrate for 1-2 hours prior to counting using the Wallac MicroBeta 1450 PLUS scintillation counter.

Both GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ} were able to phosphorylate myelin basic protein, a generic protein kinase substrate (Figure 6). The amount of phosphorylated product formed (reported as radioactive counts) was dependent on the amount of enzyme used in the assay. Baculoviral GST-MLK3_{KD} was used as the control enzyme in this analysis to show phosphorylation of myelin basic protein by a member of the mixed

WO 02/095017

PCT/US02/16387

lineage kinase family.

D. Phosphorylation of kinase-inactive GST-MKK4 and GST-MKK7

Kinase-inactive versions of the two known MAPKK proteins in the JNK pathway, MKK4 and MKK7, are expressed as full-length proteins with an N-terminal GST fusion partner in bacteria and purified using standard glutathione affinity purification protocols. Smith *et al.*, *Gene*, **1988**, 67, 31-40. These are used to assess the activity of the MLK7 kinase domain.

Assessment of the kinase activities of baculoviral human GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ} was carried out using a modification of the ELISA-based assay described for receptor tyrosine kinases (Angeles *et al.*, *Anal. Biochem.*, **1996**, 236, 49-55). The 96-well microtiter plate (FluoroNUNC Maxisorp) was coated overnight at 4°C with 20 µg/ml substrate solution (GST-MKK4 (K113A) or GST-MKK7β1(K149A) in Tris-buffered saline). The plate was then blocked with block buffer (3% BSA in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20) for 1 hour at 37°C. The 100-µl assay mixture containing 20 mM Hepes, pH 7.2, 50 µM ATP, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mM EGTA, and 25 mM β-glycerophosphate was then added to the plate. The kinase reaction was initiated by adding 10-100 ng/ml of recombinant human baculoviral GST-MLK7_{KD} or GST-MLK7_{KD/LZ} and the plate was allowed to incubate at 37°C for 15 minutes. The phosphorylated product was detected by adding a phospho-threonine antibody (NEB # 226-1) at a dilution of 1:5000 in block buffer. After a 1-hour incubation at 37°C, 100 µl of europium-N1 labeled anti-rabbit antibody (Wallac # AD0105) at 1:20000 dilution in block buffer was added, and the plate was incubated at 37°C for another hour. A low pH enhancement solution (Wallac # 1244-105) was then added and the plate was gently agitated for 5 minutes at room temperature. The fluorescence of the resulting solution was measured using the Victor 2 Multilabel Counter (Model # 1420-018).

Members of the mixed lineage kinase subfamily of serine/threonine protein kinases have been shown to phosphorylate and activate MKK4 (Rana *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 19025-19028; Hira *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 15167-15173) as well as MKK7 (Hira *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 7406-7412; Merritt *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 10195-10202). These two MKK proteins were, therefore, utilized to examine the enzymatic activities of baculoviral GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ}. As

WO 02/095017

PCT/US02/16387

shown in Figure 7, both forms of baculoviral GST-MLK7 catalyzed the phosphorylation of the two MKK protein substrates, GST-MKK4(K113A) and GST-MKK7(K149A). Product formation (reported as fluorescence units) was proportional to the concentration of enzyme used. In terms of specific activity, both GST-MLK7 forms were less active than GST-MLK3KD (control enzyme), with GST-MLK7_{KD} displaying about 2x higher activity than GST-MLK7_{KD/LZ}. Consistent with other MLK reactions, the activities of both GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ} were inhibited by EDTA, conferring the requirement for metal ions (Mg²⁺) (data not shown). The ELISA-based assay described here could potentially be used for identifying inhibitors of MLK7.

10

E. In Vitro Activation of JNK Pathway by GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ}

Since both forms of MLK7 were able to phosphorylate MKK4 and MKK7 *in vitro* (Figure 7), MLK7, like the other members of the MLK family, can activate the JNK/SAPK pathway (Tibbles *et al.*, *EMBO J.*, **1996**, *15*, 7026-7035; Hira *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 15167-15173; Hira *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 7406-7412). To demonstrate that MLK7 is a direct activator of the MKKs, an *in vitro* kinase cascade reaction was performed. This system utilized recombinant GST-MLK7, inactivated MKK4/7, and kinase-inactive GST-JNK1 β 1(K55A) and coupled the MLK7-catalyzed phosphorylation/ activation of MKK4/7 to the phosphorylation of inactive GST-JNK1 by activated MKK4/7.

The assay was performed by first incubating inactivated MKK4/7 with GST-MLK7_{KD} or GST-MLK7_{KD/LZ} in a kinase reaction mixture containing 20 mM Hepes, pH 7.2, 50 μ M ATP, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mM EGTA, and 25 mM β -glycerophosphate, for 15 minutes at 37C. GST-MLK3_{KD} was utilized as the control enzyme. An aliquot of this mixture (preactivated MKK4/7; Product 1) was added to a polypropylene, non-treated 96-well microtiter plate containing the MKK4/7 assay mixture. The MKK4/7 reaction utilized the same assay buffer as the GST-MLK7 reaction except for the addition of kinase-dead GST-JNK1 β 1(K55A). Reaction was allowed to proceed for 15 minutes at 37C then stopped with 100 mM EDTA (Product 2). Analysis of phosphorylated JNK1 was performed by transferring Product 2 into a FluoroNUNC Maxisorp 96-well microtiter plate. Following a 1 hour incubation at 37C, the plate was blocked with 3% BSA in TBST. The detection antibody, phospho-specific JNK antibody

WO 02/095017

PCT/US02/16387

(Promega # V7931/2), was added and the plate was incubated for an hour at 37C. Addition of the secondary antibody, Eu-N1 labeled anti-rabbit antibody (Wallac # AD0105) immediately followed, and the plate was incubated at 37C for another hour. A low pH enhancement solution (Wallac # 1244-105) was then added, and the fluorescence of the resulting solution was measured using the Victor 2 Multilabel Counter (Model # 1420-018).

As shown in Figure 8 (bars 7 and 8), both GST-MLK7_{KD} and GST-MLK7_{KD/LZ} were able to phosphorylate MKK4 and as a consequence of this phosphorylation event, MKK4 was activated and was able to phosphorylate its protein substrate GST-JNK1 β 1(K55A). Similar results were observed with MKK7 as the downstream target of MLK7 (Figure 8, bars 10 and 11). Relative to MLK3 (control enzyme; see inset in Figure 8), the MLK7_{KD}- and MLK7_{KD/LZ}-driven JNK activation signals were weaker, reflecting the observed lower specific activities of these enzyme preparations (Figures 6 and 7). Overall, the *in vitro* data indicate that MLK7 can phosphorylate and activate MKK4/7, thereby acting as a MAPKK kinase in the JNK/SAPK pathway.

Example 3: Feasibility of using GST-MLK7_{KD} enzyme assays to screen for inhibitors

The MLK enzymatic activity is further evaluated in the MBP phosphorylation assay and apparent Michaelis constants (K_m) for ATP and MBP can be determined.

The apparent K_m values for ATP and MBP are expected to be about 103 μ M and 21 μ M, respectively. These values can be compared to values obtained for MLK1-3. Those proteins are also expressed as truncations of either the kinase domain or kinase and leucine zipper domains with N-terminal GST fusion partners.

The initial evaluation of MLK7 activity is performed using the radioactive MBP phosphorylation assay. An ELISA assay is adopted in order to obtain a sufficient signal with lower enzyme concentrations in order to conduct kinetic and inhibition studies.

ELISA Assay Protocol: Assays are performed in 96 well FluoroNunc Maxisorp ELISA plates coated with 10 μ g/ml GST-MKK4 (kinase dead mutant) diluted in Tris buffered saline (TBS). Coating is achieved by allowing the MKK4 substrate to stand in the wells for 16 hours at 4C in a humidified chamber. After coating, excess buffer is aspirated, plates are washed 3 times with TBS containing 0.05% Tween 20 (v/v), and blocked with 3% BSA (w/v) in TBS-T (200 μ l/well) for 1 hour at 37C. All subsequent

WO 02/095017

PCT/US02/16387

incubations are carried out using 100 μ l/well volumes for one hour at 37C in a humidified chamber. After blocking, plates are washed 3 times in TBS-T and TBS, respectively. The kinase reaction is performed in 20 mM HEPES, pH 7.4, 30 μ M ATP, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, 5 mM EGTA, and 25 mM β -glycerophosphate (90 μ l/well) and 50 ng/ml GST-MLK7_{KD} (10 μ l/well) for 30 minutes at 37C. As a negative control, 0.5 M EDTA (30 μ l/well) is added to the reaction prior to incubation. Plates are washed 3 times in TBS-T and polyclonal antibody 226.1 (New England Biolabs), which detects phosphorylated MKK4, is added to wells at a 1/5000 dilution in blocking buffer. After incubation, plates are washed and alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit secondary antibody is added at a 1/2500 dilution in blocking buffer. Following a 1-hour incubation and plate washing, 4-methyl umbelliferyl phosphate (0.2 mg/ml final concentration) is added to wells and allowed to develop for 45 minutes. The reaction is terminated with 0.5 M Na₂HPO₄ and read on a fluorescence plate reader at 360 nm excitation wavelength and 460 nm emission wavelength.

Optimization of ELISA: The ELISA is optimized with regard to substrate preference and coating concentration, primary antibody dilution, and development time for the fluorogenic substrate. Magnesium ion requirements, sensitivity to reductants and DMSO can also be evaluated. Both MKK4 and MKK7 kinase dead mutants are suitable substrates for phosphorylation by GST-MLK7_{KD} and are expected to demonstrate a dose-dependent increase in signal strength with increasing substrate concentration. Subsequent experiments are routinely performed using 20 μ g/ml MKK4 as the substrate. Primary antibody 226.1 (New England BioLabs) dilution is assayed, and under conditions employed for the ELISA, a 1/5000 dilution was determined to be optimal.

Two reference kinase inhibitors, K252a and staurosporine, can be examined for their ability to inhibit GST-MLK7_{KD} activity.

The disclosures of each patent, patent application and publication cited or described in this document are hereby incorporated herein by reference, in their entirety.

Various modification of the invention, in addition to those described herein, will be apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are also intended to fall within the scope of the appended claims.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

Polynucleotide sequence (SEQ ID NO:1)

5 ATG GCT TTG CGG GGC GCC GCG GGA GCG ACC GAC ACC CCG GTG 42
 Met Ala Leu Arg Gly Ala Ala Gly Ala Thr Asp Thr Pro Val
 TCC TCG GCC GGG GGA GCC CCC GGC GGC TCA GCG TCC TCG TCG 84
 Ser Ser Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala Ser Ser Ser
 10 TCC ACC TCC TCG GGC GGC TCG GCC TCG GCG GGC GCG GGG CTG 126
 Ser Thr Ser Ser Gly Gly Ser Ala Ser Ala Gly Ala Gly Leu
 TGG GCC GCG CTC TAT GAC TAC GAG GCT CCG GCG GAG GAC GAG 168
 15 Trp Ala Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Glu Asp Glu
 CTG AGC CTG CGG GCG GGC CAG CTG GTG GAG GTG CTG TCG CAG 210
 Leu Ser Leu Arg Arg Gly Gln Leu Val Glu Val Leu Ser Gln
 20 GAC GCC GCC GTG TCG GGC GAC GAG GGC TGG TGG GCA GGC CAG 252
 Asp Ala Ala Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp Trp Ala Gly Gln
 GTG CAG CGG CCG CTC GGC ATC TTC CCC GCC AAC TAC GTG GCT 294
 Val Gln Arg Arg Leu Gly Ile Phe Pro Ala Asn Tyr Val Ala
 25 CCC TGC CCG CGC GCC GCC AGC CCC GCG CCG CCG CCC TCG CGG 336
 Pro Cys Arg Pro Ala Ala Ser Pro Ala Pro Pro Pro Ser Arg
 CCC AGC TCC CCG GTA CAC GTC GCC TTC GAG CGG CTG GAG CTG 378
 30 Pro Ser Ser Pro Val His Val Ala Phe Glu Arg Leu Glu Leu
 AAG GAG CTC ATC GGC GCT GGG GGC TTC GGG CAG GTG TAC CGC 420
 Lys Glu Leu Ile Gly Ala Gly Gly Phe Gly Gln Val Tyr Arg
 35 GCC ACC TGG CAG GGC CAG GAG GTG GCC GTG AAG GCG GCG CGC 462
 Ala Thr Trp Gln Gly Gln Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg
 CAG GAC CCG GAG CAG GAC GCG GCG GCG GCT GCC GAG AGC GTG 504
 40 Gln Asp Pro Glu Gln Asp Ala Ala Ala Ala Ala Glu Ser Val
 CGG CGC GAG GCT CGG CTC TTC GCC ATG CTG CGG CAC CCC AAC 546
 Arg Arg Glu Ala Arg Leu Phe Ala Met Leu Arg His Pro Asn
 45 ATC ATC CAG CTG CGC GGC GTG TGC CTG CAG CAG CCG CAC CTC 588
 Ile Ile Glu Leu Arg Gly Val Cys Leu Gln Gln Pro His Leu
 TGC CTG GTG CTG GAG TTC GCC CGC GGC GGA GCG CTC AAC CGA 630
 Cys Leu Val Leu Glu Phe Ala Arg Gly Gly Ala Leu Asn Arg
 50 GCG CTG GCC GCT GCC AAC GCC GCC CCG GAC CCG CGC GCG CCC 672
 Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Ala Pro Asp Pro Arg Ala Pro
 GGC CCC CGC CGC GCG CGC CGC ATC CCT CCG CAC GTG CTG GTC 714
 55 Gly Pro Arg Arg Ala Arg Arg Ile Pro Pro His Val Leu Val
 AAC TGG GCC GTG CAG ATA GCG CGG GGC ATG CTC TAC CTG CAT 756
 Asn Trp Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Leu Tyr Leu His

WO 02/095017

PCT/US02/16387

GAG GAG GCC TTC GTG CCC ATC CTG CAC CGG GAC CTC AAG TCC 798
 Glu Glu Ala Phe Val Pro Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Ser
 5 AGC AAC ATT TTG CTA CTT GAG AAG ATA GAA CAT GAT GAC ATC 840
 Ser Asn Ile Leu Leu Leu Glu Lys Ile Glu His Asp Asp Ile
 TGC AAT AAA ACT TTG AAG ATT ACA GAT TTT GGG TTG GCG AGG 882
 Cys Asn Lys Thr Leu Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg
 10 GAA TGG CAC AGG ACC ACC AAA ATG AGC ACA GCA GGC ACC TAT 924
 Glu Trp His Arg Thr Thr Lys Met Ser Thr Ala Gly Thr Tyr
 GCC TGG ATG GCC CCC GAA GTG ATC AAG TCT TCC TTG TTT TCT 966
 Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Ser Leu Phe Ser
 15 AAG GGA AGC GAC ATC TGG AGC TAT GGA GTG CTG CTG TGG GAA 1008
 Lys Gly Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu
 CTG CTC ACC GGA GAA GTC CCC TAT CGG GGC ATT GAT GGC CTC 1050
 20 Leu Leu Thr Gly Glu Val Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Leu
 GCC GTG GCT TAT GGG GTA GCA GTC AAT AAA CTC ACT TTG CCC 1092
 Ala Val Ala Tyr Gly Val Ala Val Asn Lys Leu Thr Leu Pro
 25 ATT CCA TCC ACC TGC CCT GAG CCG TTT GCC AAG CTC ATG AAA 1134
 Ile Pro Ser Thr Cys Pro Glu Pro Phe Ala Lys Leu Met Lys
 GAA TGC TGG CAA CAA GAC CCT CAT ATT CGT CCA TCG TTT GCC 1176
 30 Glu Cys Trp Gln Gln Asp Pro His Ile Arg Pro Ser Phe Ala
 TTA ATT CTC GAA CAG TTG ACT GCT ATT GAA GGG GCA GTG ATG 1218
 Leu Ile Leu Glu Gln Leu Thr Ala Ile Glu Gly Ala Val Met
 ACT GAG ATG CCT CAA GAA TCT TTT CAT TCC ATG CAA GAT GAC 1260
 35 Thr Glu Met Pro Gln Glu Ser Phe His Ser Met Gln Asp Asp
 TGG AAA CTA GAA ATT CAA CAA ATG TTT GAT GAG TTG AGA ACA 1302
 Trp Lys Leu Glu Ile Gln Gln Met Phe Asp Glu Leu Arg Thr
 40 AAG GAA AAG GAG CTG CGA TCC CGG GAA GAG GAG CTG ACT CGG 1344
 Lys Glu Lys Glu Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Leu Thr Arg
 GCG GCT CTG CAG CAG AAG TCT CAG GAG GAG CTG CTA AAG CGG 1386
 45 Ala Ala Leu Gln Gln Lys Ser Gln Glu Glu Leu Leu Lys Arg
 CGT GAG CAG CAG CTG GCA GAG CGC GAG ATC GAC GTG CTG GAG 1428
 Arg Glu Gln Gln Leu Ala Glu Arg Glu Ile Asp Val Leu Glu
 CGG GAA CTT AAC ATT CTG ATA TTC CAG CTA AAC CAG GAG AAG 1470
 50 Arg Glu Leu Asn Ile Leu Ile Phe Gln Leu Asn Gln Glu Lys
 CCC AAG GTA AAG AAG AGG AAG GGC AAG TTT AAG AGA AGT CGT 1512
 Pro Lys Val Lys Lys Arg Lys Gly Lys Phe Lys Arg Ser Arg
 55 TTA AAG CTC AAA GAT GGA CAT CGA ATC AGT TTA CCT TCA GAT 1554
 Leu Lys Leu Lys Asp Gly His Arg Ile Ser Leu Pro Ser Asp
 TTC CAG CAC AAG ATA ACC GTG CAG GCC TCT CCC AAC TTG GAC 1596
 Phe Gln His Lys Ile Thr Val Gln Ala Ser Pro Asn Leu Asp

WO 02/095017

PCT/US02/16387

AAA CGG CGG AGC CTG AAC AGC AGC AGT TCC AGT CCC CCG AGC 1638
 Lys Arg Arg Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Pro Pro Ser
 5 AGC CCC ACA ATG ATG CCC CGA CTC CGA GCC ATA CAG TTG ACT 1680
 Ser Pro Thr Met Met Pro Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Thr
 TCA GAT GAA AGC AAT AAA ACT TGG GGA AGG AAC ACA GTC TTT 1722
 Ser Asp Glu Ser Asn Lys Thr Trp Gly Arg Asn Thr Val Phe
 10 CGA CAA GAA GAA TTT GAG GAT GTA AAA AGG AAT TTT AAG AAA 1764
 Arg Gln Glu Glu Phe Glu Asp Val Lys Arg Asn Phe Lys Lys
 AAA GGT TGT ACC TGG GGA CCA AAT TCC ATT CAA ATG AAA GAT 1806
 15 Lys Gly Cys Thr Trp Gly Pro Asn Ser Ile Gln Met Lys Asp
 AGA ACA GAT TGC AAA GAA AGG ATA AGA CCT CTC TCC GAT GGC 1848
 Arg Thr Asp Cys Lys Glu Arg Ile Arg Pro Leu Ser Asp Gly
 20 AAC AGT CCT TGG TCA ACT ATC TTA ATA AAA AAT CAG AAA ACC 1890
 Asn Ser Pro Trp Ser Thr Ile Leu Ile Lys Asn Gln Lys Thr
 ATG CCC TTG GCT TCA TTG TTT GTG GAC CAG CCA GGG TCC TGT 1932
 25 Met Pro Leu Ala Ser Leu Phe Val Asp Gln Pro Gly Ser Cys
 GAA GAG CCA AAA CTT TCC CCT GAT GGA TTA GAA CAC AGA AAA 1974
 Glu Glu Pro Lys Leu Ser Pro Asp Gly Leu Glu His Arg Lys
 CCA AAA CAA ATA AAA TTG CCT AGT CAG GCC TAC ATT GAT CTA 2016
 30 Pro Lys Gln Ile Lys Leu Pro Ser Gln Ala Tyr Ile Asp Leu
 CCT CTT GGG AAA GAT GCT CAG AGA GAG AAT CCT GCA GAA GCT 2058
 Pro Leu Gly Lys Asp Ala Gln Arg Glu Asn Pro Ala Glu Ala
 35 GAA AGC TGG GAG GAG GCA GCC TCT GCG AAT GCT GCC ACA GTC 2100
 Glu Ser Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Asn Ala Ala Thr Val
 TCC ATT GAG ATG ACT CCT ACG AAT AGT CTG AGT AGA TCC CCC 2142
 40 Ser Ile Glu Met Thr Pro Thr Asn Ser Leu Ser Arg Ser Pro
 CAG AGA AAG AAA ACG GAG TCA GCT CTG TAT GGG TGC ACC GTC 2184
 Gln Arg Lys Lys Thr Glu Ser Ala Leu Tyr Gly Cys Thr Val
 CTT CTG GCA TCG GTG GCT CTG GGA CTG GAC CTC AGA GAG CTT 2226
 45 Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Gly Leu Asp Leu Arg Glu Leu
 CAT AAA GCA CAG GCT GCT GAA GAA CCG TTG CCC AAG GAA GAG 2268
 His Lys Ala Gln Ala Ala Glu Glu Pro Leu Pro Lys Glu Glu
 50 AAG AAG AAA CGA GAG GGA ATC TTC CAG CGG GCT TCC AAG TCC 2310
 Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ile Phe Gln Arg Ala Ser Lys Ser
 CGC AGA AGC GCC AGT CCT CCC ACA AGC CTG CCA TCC ACC TGT 2352
 Arg Arg Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Leu Pro Ser Thr Cys
 55 GGG GAG GCC AGC AGC CCA CCC TCC CTG CCA CTG TCA AGT GCC 2394
 Gly Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Leu Pro Leu Ser Ser Ala

WO 02/095017

PCT/US02/16387

CTG GGC ATC CTC TCC ACA CCT TCT TTC TCC ACA AAG TGC CTG 2436
 Leu Gly Ile Leu Ser Thr Pro Ser Phe Ser Thr Lys Cys Leu

5 CTG CAG ATG GAC AGT GAA GAT CCA CTG GTG GAC AGT GCA CCT 2478
 Leu Gln Met Asp Ser Glu Asp Pro Leu Val Asp Ser Ala Pro

GTC ACT TGT GAC TCT GAG ATG CTC ACT CCG GAT TTT TGT CCC 2520
 Val Thr Cys Asp Ser Glu Met Leu Thr Pro Asp Phe Cys Pro

10 AGT GCC CCA GGA AGT GGT CGT GAG CCA GCC CTC ATG CCA AGA 2562
 Thr Ala Pro Gly Ser Gly Arg Glu Pro Ala Leu Met Pro Arg

CTT GAC ACT GAT TGT AGT GTA TCA AGA AAC TTG CCG TCT TCC 2604
 15 Leu Asp Thr Asp Cys Ser Val Ser Arg Asn Leu Pro Ser Ser

TTC CTA CAG CAG ACA TGT GGG AAT GTA CCT TAC TGT GCT TCT 2646
 Phe Leu Gln Gln Thr Cys Gly Asn Val Pro Tyr Cys Ala Ser

20 TCA AAA CAT AGA CCG TCA CAT CAC AGA CCG ACC ATG TCT GAT 2688
 Ser Lys His Arg Pro Ser His His Arg Arg Thr Met Ser Asp

GGA AAT CCG ACC CCA ACT GGT GCA ACT ATT ATC TCA GCC ACT 2730
 Gly Asn Pro Thr Pro Thr Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ala Thr

25 GGA GCC TCT GCA CTG CCA CTC TGC CCC TCA CCT GCT CCT CAC 2772
 Gly Ala Ser Ala Leu Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ala Pro His

AGT CAT CTG CCA AGG GAG GTC TCA CCC AAG AAG CAC AGC ACT 2814
 30 Ser His Leu Pro Arg Glu Val Ser Pro Lys Lys His Ser Thr

GTC CAC ATC GTG CCT CAG CGT CGC CCT GCC TCC CTG AGA AGC 2856
 Val His Ile Val Pro Gln Arg Arg Pro Ala Ser Leu Arg Ser

35 CGC TCA GAT CTG CCT CAG GCT TAC CCA CAG ACA GCA GTG TCT 2898
 Arg Ser Asp Leu Pro Gln Ala Tyr Pro Gln Thr Ala Val Ser

CAG CTG GCA CAG ACT GCC TGT GTA GTG GGT CGC CCA GGA CCA 2940
 Gln Leu Ala Gln Thr Ala Cys Val Val Gly Arg Pro Gly Pro

40 CAT CCC ACC CAA TTC CTC GCT GCC AAG GAG AGA ACT AAA TCC 2982
 His Pro Thr Gln Phe Leu Ala Ala Lys Glu Arg Thr Lys Ser

CAT GTG CCT TCA TTA CTG GAT GCT GAC GTG GAA GGT CAG AGC 3024
 45 His Val Pro Ser Leu Leu Asp Ala Asp Val Glu Gly Gln Ser

AGG GAC TAC ACT GTG CCA CTG TGC AGA ATG AGG AGC AAA ACC 3066
 Arg Asp Tyr Thr Val Pro Leu Cys Arg Met Arg Ser Lys Thr

50 AGC CGG CCA TCT ATA TAT GAA CTG GAG AAA GAA TTC CTG TCT 3108
 Ser Arg Pro Ser Ile Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Ser

TAA 3111
 Stop

55 **Polypeptide sequence (SEQ ID NO:2)**
 Met Ala Leu Arg Gly Ala Ala Gly Ala Thr Asp Thr Pro Val

WO 02/095017

PCT/US02/16387

Ser Ser Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala Ser Ser Ser
Ser Thr Ser Ser Gly Gly Ser Ala Ser Ala Gly Ala Gly Leu
5 Trp Ala Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Gly Glu Asp Glu
Leu Ser Leu Arg Arg Gly Gln Leu Val Glu Val Leu Ser Gln
10 Asp Ala Ala Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp Trp Ala Gly Gln
Val Gln Arg Arg Leu Gly Ile Phe Pro Ala Asn Tyr Val Ala
Pro Cys Arg Pro Ala Ala Ser Pro Ala Pro Pro Pro Ser Arg
15 Pro Ser Ser Pro Val His Val Ala Phe Glu Arg Leu Glu Leu
Lys Glu Leu Ile Gly Ala Gly Gly Phe Gly Gln Val Tyr Arg
Ala Thr Trp Gln Gly Gln Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg
20 Gln Asp Pro Glu Gln Asp Ala Ala Ala Ala Glu Ser Val
Arg Arg Glu Ala Arg Leu Phe Ala Met Leu Arg His Pro Asn
25 Ile Ile Glu Leu Arg Gly Val Cys Leu Gln Gln Pro His Leu
Cys Leu Val Leu Glu Phe Ala Arg Gly Gly Ala Leu Asn Arg
Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Ala Pro Asp Pro Arg Ala Pro
30 Gly Pro Arg Arg Ala Arg Arg Ile Pro Pro His Val Leu Val
Asn Trp Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Leu Tyr Leu His
35 Glu Glu Ala Phe Val Pro Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Ser
Ser Asn Ile Leu Leu Leu Glu Lys Ile Glu His Asp Asp Ile
Cys Asn Lys Thr Leu Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg
40 Glu Trp His Arg Thr Thr Lys Met Ser Thr Ala Gly Thr Tyr
Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Ser Leu Phe Ser
45 Lys Gly Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu
Leu Leu Thr Gly Glu Val Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Leu
Ala Val Ala Tyr Gly Val Ala Val Asn Lys Leu Thr Leu Pro
50 Ile Pro Ser Thr Cys Pro Glu Pro Phe Ala Lys Leu Met Lys
Glu Cys Trp Gln Gln Asp Pro His Ile Arg Pro Ser Phe Ala

WO 02/095017

PCT/US02/16387

Leu Ile Leu Glu Gln Leu Thr Ala Ile Glu Gly Ala Val Met
Thr Glu Met Pro Gln Glu Ser Phe His Ser Met Gln Asp Asp
5 Trp Lys Leu Glu Ile Gln Gln Met Phe Asp Glu Leu Arg Thr
Lys Glu Lys Glu Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Leu Thr Arg
10 Ala Ala Leu Gln Gln Lys Ser Gln Glu Glu Leu Leu Lys Arg
Arg Glu Gln Gln Leu Ala Glu Arg Glu Ile Asp Val Leu Glu
Arg Glu Leu Asn Ile Leu Ile Phe Gln Leu Asn Gln Glu Lys
15 Pro Lys Val Lys Lys Arg Lys Gly Lys Phe Lys Arg Ser Arg
Leu Lys Leu Lys Asp Gly His Arg Ile Ser Leu Pro Ser Asp
Phe Gln His Lys Ile Thr Val Gln Ala Ser Pro Asn Leu Asp
20 Lys Arg Arg Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Ser
Ser Pro Thr Met Met Pro Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Thr
25 Ser Asp Glu Ser Asn Lys Thr Trp Gly Arg Asn Thr Val Phe
Arg Gln Glu Glu Phe Glu Asp Val Lys Arg Asn Phe Lys Lys
Lys Gly Cys Thr Trp Gly Pro Asn Ser Ile Gln Met Lys Asp
30 Arg Thr Asp Cys Lys Glu Arg Ile Arg Pro Leu Ser Asp Gly
Asn Ser Pro Trp Ser Thr Ile Leu Ile Lys Asn Gln Lys Thr
35 Met Pro Leu Ala Ser Leu Phe Val Asp Gln Pro Gly Ser Cys
Glu Glu Pro Lys Leu Ser Pro Asp Gly Leu Glu His Arg Lys
Pro Lys Gln Ile Lys Leu Pro Ser Gln Ala Tyr Ile Asp Leu
40 Pro Leu Gly Lys Asp Ala Gln Arg Glu Asn Pro Ala Glu Ala
Glu Ser Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Asn Ala Ala Thr Val
45 Ser Ile Glu Met Thr Pro Thr Asn Ser Leu Ser Arg Ser Pro
Gln Arg Lys Lys Thr Glu Ser Ala Leu Tyr Gly Cys Thr Val
Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Gly Leu Asp Leu Arg Glu Leu
50 His Lys Ala Gln Ala Ala Glu Glu Pro Leu Pro Lys Glu Glu
Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ile Phe Gln Arg Ala Ser Lys Ser

WO 02/095017

PCT/US02/16387

Arg Arg Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Leu Pro Ser Thr Cys
Gly Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Leu Pro Leu Ser Ser Ala
5 Leu Gly Ile Leu Ser Thr Pro Ser Phe Ser Thr Lys Cys Leu
Leu Gln Met Asp Ser Glu Asp Pro Leu Val Asp Ser Ala Pro
10 Val Thr Cys Asp Ser Glu Met Leu Thr Pro Asp Phe Cys Pro
Thr Ala Pro Gly Ser Gly Arg Glu Pro Ala Leu Met Pro Arg
Leu Asp Thr Asp Cys Ser Val Ser Arg Asn Leu Pro Ser Ser
15 Phe Leu Gln Gln Thr Cys Gly Asn Val Pro Tyr Cys Ala Ser
Ser Lys His Arg Pro Ser His His Arg Arg Thr Met Ser Asp
Gly Asn Pro Thr Pro Thr Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ala Thr
20 Gly Ala Ser Ala Leu Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ala Pro His
Ser His Leu ProArg Glu Val Ser Pro Lys Lys His Ser Thr
25 Val His Ile Val Pro Gln Arg Arg Pro Ala Ser Leu Arg Ser
Arg Ser Asp Leu Pro Gln Ala Tyr Pro Gln Thr Ala Val Ser
30 Gln Leu Ala Gln Thr Ala Cys Val Val Gly Arg Pro Gly Pro
His Pro Thr Gln Phe Leu Ala Ala Lys Glu Arg Thr Lys Ser
His Val Pro Ser Leu Leu Asp Ala Asp Val Glu Gly Gln Ser
35 Arg Asp Tyr Thr Val Pro Leu Cys Arg Met Arg Ser Lys Thr
Ser Arg Pro Ser Ile Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Ser

WO 02/095017

PCT/US02/16387

What is claimed is:

1. An isolated polynucleotide comprising SEQ ID NO:1.
2. An isolated polynucleotide comprising a sequence that encodes a polypeptide
5 comprising SEQ ID NO:2.
3. A polynucleotide comprising a nucleotide sequence complementary to at least a
portion of SEQ ID NO:1.
- 10 4. An expression vector comprising the polynucleotide of claim 1.
5. The expression vector of claim 4 wherein said vector is a plasmid or viral particle.
6. A host cell transformed with a vector of claim 4.
- 15 7. The transformed host cell of claim 6 wherein said cell is a bacterial cell, yeast cell,
insect cell, or mammalian cell.
8. A method of producing a polypeptide comprising SEQ ID NO:2 comprising the
20 steps of:
 - a) introducing a recombinant expression vector of claim 4 into a compatible host
cell;
 - b) growing said host cell under conditions for expression of said polypeptide; and
 - c) recovering said polypeptide.
- 25 9. A composition comprising a polynucleotide of claim 1 and a carrier or diluent.
10. A composition comprising a recombinant expression vector of claim 4 and a
carrier or diluent.
- 30 11. An isolated polypeptide encoded by a polynucleotide of claim 1.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

12. An isolated polypeptide comprising SEQ ID NO:2.
13. The polypeptide of claim 11 wherein said polypeptide comprises SEQ ID NO:2.
- 5 14. A composition comprising a polypeptide of claim 11 and a carrier or diluent.
15. A composition comprising a polypeptide of claim 12 and a carrier or diluent.
16. An isolated antibody that binds to an epitope on a polypeptide of claim 12.
- 10 17. The antibody of claim 16 wherein said antibody is a monoclonal antibody.
18. A composition comprising an antibody of claim 16 and a carrier or diluent.
- 15 19. A kit comprising an antibody that binds to a polypeptide of claim 12.
20. A kit comprising a polynucleotide of claim 1.
21. A kit comprising a polypeptide of claim 12.
- 20 22. A method of identifying a compound that binds a polypeptide of claim 12 comprising the steps of:
- a) contacting said polypeptide with a compound; and
- b) determining whether said compound binds to said polypeptide.
- 25 23. The method of claim 20 wherein binding of said compound to said polypeptide is determined by a protein binding assay.
24. The method of claim 23 wherein said protein binding assay is selected from the group consisting of a gel-shift assay, Western blot, radiolabeled competition assay, phage-based expression cloning, co-fractionation by chromatography, co-precipitation, cross linking, interaction trap/two-hybrid analysis, southwestern analysis, and ELISA.
- 30

WO 02/095017

PCT/US02/16387

25. A method of identifying a compound that binds a polynucleotide of claim 1 comprising the steps of:
- a) contacting said polynucleotide with a compound; and
 - b) determining whether said compound binds said polynucleotide.
- 5
26. The method of claim 24 wherein binding is determined by a gel-shift assay.
27. A method for identifying a compound that modulates the activity of a polypeptide of claim 12 comprising the steps of:
- a) contacting said polypeptide with a compound; and
 - b) determining whether said polypeptide activity has been modulated.
- 10
28. The method of claim 27 wherein said activity is phosphorylation of a substrate.
- 15
29. The method of claim 28 wherein said activity is JNK activation.
30. A compound identified by the method of claim 22.
31. A compound identified by the method of claim 25.
- 20
32. A compound identified by the method of claim 27.

WO 02/095017

PCT/US02/16387

1/8

		I	II
		Phosphate Anchor	ATP Binding
MLK1	144	LTLEEIIIGGGFGKVVYRAFWIG-----	DEVAVKARHDDPEDDISQ-----
MLK2	98	LQLEEITIGGGFGKVVYRALWRG-----	EVAVKARLDPEKDAV-----
PK1	117	LRLEEVIIGGGFGKVVYRGSWRG-----	ELVAVKARQDPDEDISV-----
MLK7	124	LELKELIIGGGFGKVVYRATWQG-----	QEVAVKARQDPEDQAAA-----
DLK	125	ILDLOWVSSGAQGAFLGRFPHG-----	EEVAVKVRDLKETDI-----
L2K	168	ISELCWLGSGAQGAFLGKFR-----	EEVAVKVRREQNETDI-----
MLK6	16	LQFFENCGGGSGSVYRAKWIS-----	QDKEVAVKLLK-----
		III	IV
MLK1		TIENVROEAKLFAML-----KHPNIIALRGVCLKE-----	PNLCVMEFARG-----
MLK2		TAEQVCCARLFGAL-----QHPNIIALRGACLN-----	PHLCVMEYARG-----
MLK3		TAESVROEAKLFAML-----AHPNIIALKAVCLEE-----	PNLCVMEYARG-----
MLK7		AAESVROEAKLFAML-----RHPNIIELRGVCLQG-----	PHLCVMEFARG-----
DLK		-----KHLRKL-----KHPNIIITFKGVCTQA-----	PCYCIIMEFCAQ-----
L2K		-----KHLRKL-----KHPNIIITFKGVCTQA-----	PCYCIIMEYCAH-----
MLK6		-----IEKPAELSVL-----SHRNIIQFYGVILEP-----	PNYGVITEYASL-----
		V	Via
MLK1		GLLRVRL-SC-----KRIPPD-----LVNWAVQIARGMNYLHDEAIV	
MLK2		GLLRVRL-AG-----RRVPPHV-----LVNWAVQIARGMNYLHDEAIV	
MLK3		GLLRVRL-AG-----RRVPPHV-----LVNWAVQIARGMNYLHDEAIV	
MLK7		GLLRVRL-AG-----AANAAPDPRAFGPRRA-----RRVPPHV-----LVNWAVQIARGMNYLHDEAIV	
DLK		GLLYEVLKAG-----REVTFSL-----LVNWSMCIAGGMNYLH-----LH	
L2K		GLLYEVLKAG-----RKITFRL-----LVNWSMCIAGGMNYLH-----LH	
MLK6		GLLYDYINNS-----RSEEMDMHMTWATDVAKGMNYLHMEAFV	
		Vib	VII
		Catalytic Domain	Activation Loop
MLK1		-----PIIHRDLKSNITLLIQKVENGDLSNK-ILKITDFGLAREW-HRT-----	TKMSAA
MLK2		-----PIIHRDLKSNITLLIEAIEHNHNAOT-VLKITDFGLAREW-HKT-----	TKMSAA
MLK3		-----PVIHRDLKSNITLLIQPIESDDMEHK-TLKITDFGLAREY-HKT-----	TKMSAA
MLK7		-----PILHRDLKSNITLLLEKIEHDDICNK-TLKITDFGLAREW-HRT-----	TKMSTA
DLK		-----KIIHRDLKSNITLLITV-----DD-VVKISDFGTSKELSDKS-----	TKMSFA
L2K		-----KIIHRDLKSNITLLITV-----DD-VVKISDFGTSKELSDKS-----	TKMSFA
MLK6		-----KVIHRDLKSNITLVIA-----ADG-VLKICDFGTSKELSDKS-FRNHT-----	TKMSLV
		VIII	IX
		P+1 Loop	
MLK1		-----GTAVMAPEVI-----RSMFSK-GSDVNSYGV-LLWELLT-GEVPPRGI-----	
MLK2		-----GTAVMAPEVI-----RLSLFSK-GSDVNSYGV-LLWELLT-GEVPPRGI-----	
MLK3		-----GTAVMAPEVI-----KASTFSK-GSDVNSYGV-LLWELLT-GEVPPRGI-----	
MLK7		-----GTAVMAPEVI-----KSSLFSK-GSDVNSYGV-LLWELLT-GEVPPRGI-----	
DLK		-----GTAVMAPEVI-----RNEPVSE-KVDIWSYGV-VLWELLT-GEIPYKDV-----	
L2K		-----GTAVMAPEVI-----RNEPVSE-KVDIWSYGV-VLWELLT-GEIPYKDV-----	
MLK6		-----GTFPMMAPEVI-----QSLPVSE-TCDTYSYGV-VLWELLT-REVPPKGL-----	
		X	XI
		G	
MLK1		DGLRVAYGVAMNKLALDIPST-----CPEPFAR-LMEDCWNPDPHSPPSFTNI-----LDQL	
MLK2		DGLRVAYGVAMNKLALDIPST-----CPEPFAR-LLEECWDFDPHSPDPSGI-----LKRL	
MLK3		DGLRVAYGVAMNKLALDIPST-----CPEPFAR-LMAOCWQDPHSPDPSGI-----LDQL	
MLK7		DGLRVAYGVAMNKLALDIPST-----CPEPFAR-LMKECWQDPHSPDPSGI-----LDQL	
DLK		DSSAIINGVGSNSLHLPVPS-----CPDGFKI-LLRQCWNQSKPRNPPSFRQI-----LLHL	
L2K		DSSAIINGVGSNSLHLPVPS-----CPDGFKI-LMKQWQSKPRNPPSFRQI-----LMHL	
MLK6		EGIQVAVLVVEKNERLTIPSS-----CPRSFAR-LLHQCWEADAKKPPSFRQI-----ISIL	

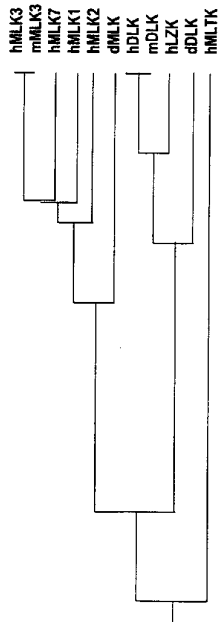
Figure 1

WO 02/095017

PCT/US02/16387

2/8

Figure 2

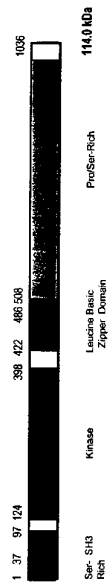


WO 02/095017

PCT/US02/16387

3/8

Figure 3



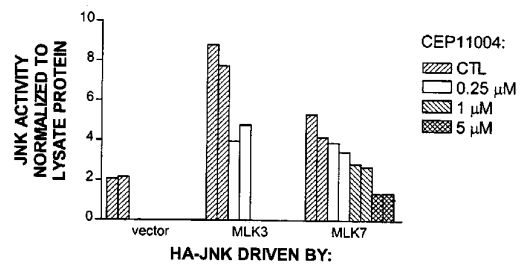
[illegible]

WO 02/095017

PCT/US02/16387

5/8

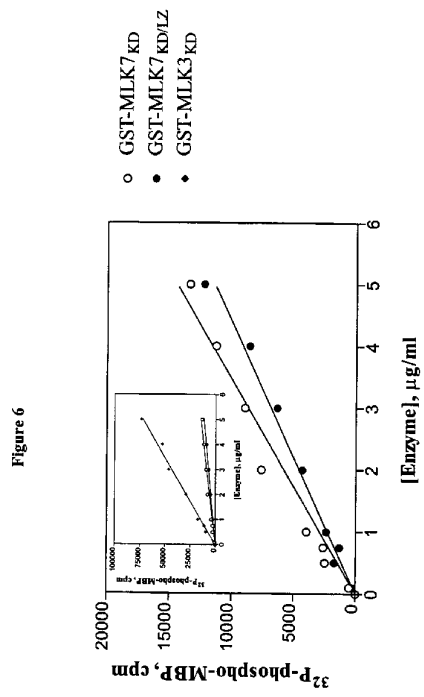
Figure 5



WO 02/095017

PCT/US02/16387

6/8



WO 02/095017

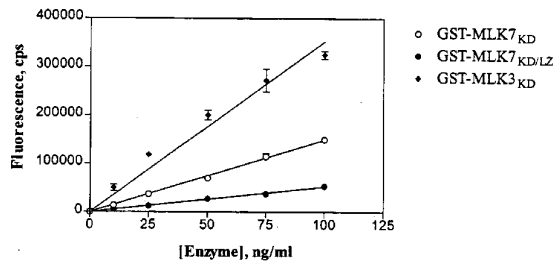
PCT/US02/16387

7/8

Figure 7

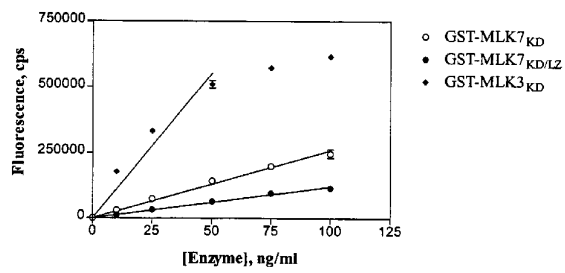
A.

TRF-ELISA
Substrate = GST-MKK4(K113A)



B.

TRF-ELISA
Substrate = GST-MKK7(K149A)

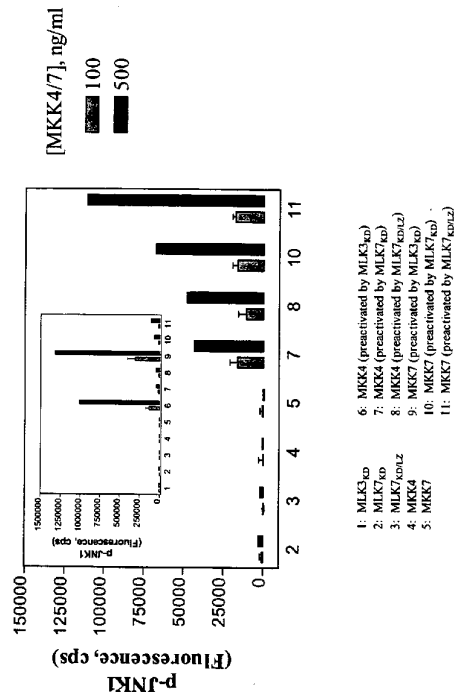


WO 02/095017

PCT/US02/16387

8/8

Figure 8



WO 02/095017

PCT/US02/16387

SEQUENCE LISTING

<110> Cephalon, Inc.
 Angeles, Thelma S.
 Durkin, John T.
 Holtskin, Beverly P.
 Meyer, Sheryl L.
 Spais, Chrysanthé M.

<120> Novel Mixed Lineage Kinase 7 (MLK7) Polypeptide, Polynucleotides Encoding The Same, And Methods Of Use Thereof

<130> CEPH1805

<150> 60/293,381
 <151> 2001-05-24

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 3111
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(3108)
 <223>

<400> 1
 atg gct ttg cgg ggc gcc gcg gga gcg acc gac acc cgg gtg tcc tgg 48
 Met Ala Leu Arg Gly Ala Ala Gly Ala Thr Asp Thr Pro Val Ser Ser
 1 5 10 15
 gcc ggg gga gcc ccc ggc ggc tca gcg tcc tgg tgg tcc acc tcc tgg 96
 Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala Ser Ser Ser Thr Ser Ser
 20 25 30
 gcc ggc tgg gcc tgg gcg ggc gcg ggg ctg tgg gcc gcg ctc tat gac 144
 Gly Gly Ser Ala Ser Ala Gly Ala Gly Leu Trp Ala Ala Leu Tyr Asp
 35 40 45
 tac gag gct cgc ggc gag gac gag ctg agc ctg cgg cgc gcc cag ctg 192
 Tyr Glu Ala Arg Gly Glu Asp Glu Leu Ser Leu Arg Arg Gly Gln Leu
 50 55 60
 gtg gag gtg ctg tgg cag gac gcc gcc gtg tgg gcc gac gag ggc tgg 240
 Val Glu Val Leu Ser Gln Asp Ala Ala Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp
 65 70 75 80
 tgg gca gcc cag gtg cag cgg cgc ctc gcc atc ttc ccc gcc aac tac 288
 Trp Ala Gly Gln Val Gln Arg Arg Leu Gly Ile Phe Pro Ala Asn Tyr
 85 90 95
 gtg gct ccc tag cgc ccg gcc gcc agc ccc gcg ccg ccg tcc cgg 336
 Val Ala Pro Cys Arg Pro Ala Ala Ser Pro Ala Pro Pro Ser Arg
 100 105 110
 ccc agc tcc ccg gta cac gtc gcc ttc gag cgg ctg gag ctg aag gag 384
 Pro Ser Ser Pro Val His Val Ala Phe Glu Arg Leu Glu Leu Lys Glu
 115 120 125
 ctc atc gcc gct ggg ggc ttc ggg cag gtg tac cgc gcc acc tgg cag 432
 Leu Ile Gly Ala Gly Gly Phe Gly Gln Val Tyr Arg Ala Thr Trp Gln
 130 135 140
 gcc cag gag gtg gcc gtg aag gcg gcg cgc cag gac ccg gag cag gac 480
 Gly Gln Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg Gln Asp Pro Glu Gln Asp

WO 02/095017		PCT/US02/16387	
145	150	155	160
gcg gcg gcg gct gcc gag agc gtg cgg cgc gag gct cgc ctc ttc gcc			
Ala Ala Ala Ala Ala Glu Ser Val Arg Arg Arg Glu Ala Arg Leu Phe Ala			
165	170	175	
atg ctg cgg cac ccc aac atc atc gag ctg cgc gcc gtg tgc ctg cag			
Met Leu Arg His Pro Asn Ile Ile Glu Leu Arg Gly Val Cys Leu Gln			
180	185	190	
cag cgg cac ctc tgc ctg gtg ctg gag ttc gcc cgc gcc gga gcg ctc			
Gln Pro His Leu Cys Leu Val Leu Glu Phe Ala Arg Gly Gly Ala Leu			
195	200	205	
aac cga gcg ctg gcc gct gcc aac gcc gcc cgg gac cgc cgc gcc ccc			
Asn Arg Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Ala Pro Asp Pro Arg Ala Pro			
210	215	220	
ggc ccc cgc cgc gcg cgc cgc atc cct ccg cac gtg ctg gtc aac tgg			
Gly Pro Arg Arg Ala Arg Arg Ile Pro Pro His Val Leu Val Asn Trp			
225	230	235	240
gcc gtg cag ata gcg cgg gcc atg ctc tac ctg cat gag gag gcc ttc			
Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Leu Tyr Leu His Glu Glu Ala Phe			
245	250	255	
gtg ccc atc ctg cac cgg gac ctc aag tcc agc aac att ttg cta ctt			
Val Pro Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Leu Leu			
260	265	270	
gag aag ata gaa cat gat gac atc tgc aat aaa act ttg aag att aca			
Glu Lys Ile Glu His Asp Asp Ile Cys Asn Lys Thr Leu Lys Ile Thr			
275	280	285	
gat ttt ggg ttg gcg agg gaa tgg cac agg acc acc aaa atg agc aca			
Asp Phe Gly Leu Ala Arg Glu Trp His Arg Thr Thr Lys Met Ser Thr			
290	295	300	
gca gcc acc tat gcc tgg atg gcc ccc gaa gtg atc aag tct tcc ttg			
Ala Gly Thr Tyr Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Ser Leu			
305	310	315	320
ttt tct aag gga agc gac atc tgg agc tat gga gtg ctg ctg tgg gaa			
Phe Ser Lys Gly Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu			
325	330	335	
ctg ctc acc gga gaa gtc ccc tat cgg gcc att gat gcc ctc gcc gtg			
Leu Leu Thr Gly Glu Val Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Leu Ala Val			
340	345	350	
gct tat ggg gta goa gtc aat aaa ctc act ttg ccc att cca tcc acc			
Ala Tyr Gly Val Ala Val Asn Lys Leu Thr Leu Pro Ile Pro Ser Thr			
355	360	365	
tgc cct gag ccg ttt gcc aag ctc atg aaa gaa tgc tgg caa caa gac			
Cys Pro Glu Pro Phe Ala Lys Leu Met Lys Glu Cys Trp Gln Gln Asp			
370	375	380	
cct cat att cgt cca tcg ttt gcc tta att ctc gaa cag ttg act gct			
Pro His Ile Arg Pro Ser Phe Ala Leu Ile Leu Glu Gln Leu Thr Ala			
385	390	395	400
att gaa ggg gca gtg atg act gag atg cct caa gaa tct ttt cat tcc			
Ile Glu Gly Ala Val Met Thr Glu Met Pro Gln Glu Ser Phe His Ser			
405	410	415	
atg caa gat gac tgg aaa cta gaa att caa caa atg ttt gat gag ttg			
Met Gln Asp Asp Trp Lys Leu Glu Ile Gln Gln Met Phe Asp Glu Leu			
420	425	430	
aga aca aag gaa aag gag ctg cga tcc cgg gaa gag gag ctg act cgg			
1344			

WO 02/095017

Arg Thr Lys Glu Lys Glu Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Leu Thr Arg
435 440 445

gcg gct ctg cag cag aag tct cag gag gag ctg cta aag cgg cgt gag 1392
Ala Ala Leu Gln Gln Lys Ser Gln Glu Glu Leu Leu Lys Arg Arg Glu
450 455 460

cag cag ctg gca gag cgc gag atc gac gtg ctg gag cgg gaa ctt aac 1440
Gln Gln Leu Ala Glu Arg Glu Ile Asp Val Leu Arg Glu Leu Asn
465 470 475 480

att ctg ata ttc cag cta aac cag gag aag ccc aag gta aag aag agg 1488
Ile Leu Ile Phe Gln Leu Asn Gln Glu Lys Pro Lys Val Lys Lys Arg
485 490 495

aag ggc aag ttt aag aga agt cgt tta aag ctc aaa gat gga cat cga 1536
Lys Gly Lys Phe Lys Arg Ser Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly His Arg
500 505 510

atc agt tta cct tca gat ttc cag cac aag ata acc gtg cag gcc tct 1584
Ile Ser Leu Pro Ser Asp Phe Gln His Lys Ile Thr Val Gln Ala Ser
515 520 525

ccc aac ttg gac aaa cgg cgg agc ctg aac agc agc agt tcc agt ccc 1632
Pro Asn Leu Asp Lys Arg Arg Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Pro
530 535 540

cgg agc agc ccc aca atg atg ccc cga ctc cga gcc ata cag ttg act 1680
Pro Ser Ser Pro Thr Met Met Pro Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Thr
545 550 555 560

tca gat gaa agc aat aaa act tgg gga agg aac aca gtc ttt cga caa 1728
Ser Asp Glu Ser Asn Lys Thr Trp Gly Arg Asn Thr Val Phe Arg Gln
565 570 575

gaa gaa ttt gag gat gta aaa agg aat ttt aag aaa aaa ggt tgt acc 1776
Glu Glu Phe Glu Asp Val Lys Arg Asn Phe Lys Lys Lys Gly Cys Thr
580 585 590

tgg gga cca aat tcc att caa atg aaa gat aga aca gat tgc aaa gaa 1824
Trp Gly Pro Asn Ser Ile Gln Met Lys Asp Arg Thr Asp Cys Lys Glu
595 600 605

agg ata aga cct ctc tcc gat gcc aac agt cct tgg tca act atc tta 1872
Arg Ile Arg Pro Leu Ser Asp Gly Asn Ser Pro Trp Ser Thr Ile Leu
610 615 620

ata aaa aat cag aaa acc atg ccc ttg gct tca ttg ttt gtg gac cag 1920
Ile Lys Asn Gln Lys Thr Met Pro Leu Ala Ser Leu Phe Val Asp Gln
625 630 635 640

cca ggg tcc tgt gaa gag cca aaa ctt tcc cct gat gga tta gaa cac 1968
Pro Gly Ser Cys Glu Glu Pro Lys Leu Ser Pro Asp Gly Leu Glu His
645 650 655

aga aaa cca aaa caa ata aaa ttg cct agt cag gcc tac att gat cta 2016
Arg Lys Pro Lys Gln Ile Lys Leu Pro Ser Gln Ala Tyr Ile Asp Leu
660 665 670

cct ctt ggg aaa gat gct cag aga gag aat cct gca gaa gct gaa agc 2064
Pro Leu Gly Lys Asp Ala Gln Arg Glu Asn Pro Ala Glu Ala Glu Ser
675 680 685

tgg gag gag gca gcc tct gcg aat gct gcc sca gtc tcc att gag atg 2112
Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Asn Ala Ala Thr Val Ser Ile Glu Met
690 695 700

act cct acg aat agt ctg agt aga tcc ccc cag aga aag aaa acg gag 2160
Thr Pro Thr Asn Ser Leu Ser Arg Ser Pro Gln Arg Lys Lys Thr Glu
705 710 715 720

PCT/US02/16387

WO 02/095017

tca gct ctg tat ggg tgc acc gtc ctt ctg gca tgc gtg gct ctg gga 2208
 Ser Ala Leu Tyr Gly Cys Thr Val Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Gly
 725 730 735

ctg gac ctc aga gag ctt cat aaa gca cag gct gct gaa gaa ccg ttg 2256
 Leu Asp Leu Arg Glu Leu His Lys Ala Gln Ala Ala Glu Glu Pro Leu
 740 745 750

ccc aag gaa gag aag aag aaa cga gag gga atc ttc cag cgg gct tcc 2304
 Pro Lys Glu Glu Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ile Phe Gln Arg Ala Ser
 755 760 765

aag ttc cgc aga agc gcc agt cct ccc acc agc ctg cca tcc acc tgt 2352
 Lys Ser Arg Arg Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Leu Pro Ser Thr Cys
 770 775 780

ggg gag gcc agc agc cca ccc tcc ctg cca ctg tca agt gcc ctg ggc 2400
 Gly Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Leu Leu Ser Ser Ala Leu Gly
 785 790 795 800

atc ctc tcc aca cct tct ttc tcc aca aag tgc ctg ctg cag atg gac 2448
 Ile Leu Ser Thr Pro Ser Phe Ser Thr Lys Cys Leu Leu Gln Met Asp
 805 810 815

agt gaa gat cca ctg gtg gac agt cca cct gtc act tgt gac tct gag 2496
 Ser Glu Asp Pro Leu Val Asp Ser Ala Pro Val Thr Cys Asp Ser Glu
 820 825 830

atg ctc act ccg gat ttt tgt ccc act gcc cca gga agt ggt cgt gag 2544
 Met Leu Thr Pro Asp Phe Cys Pro Thr Ala Pro Gly Ser Gly Arg Glu
 835 840 845

cca gcc ctc atg cca aga ctt gac act gat tgt agt gta tca aga aac 2592
 Pro Ala Leu Met Pro Arg Leu Asp Thr Asp Cys Ser Val Ser Arg Asn
 850 855 860

tgg ccg tct tcc ttc cta cag cag aca tgt ggg aat gta cct tac tgt 2640
 Leu Pro Ser Ser Phe Leu Gln Gln Thr Cys Gly Asn Val Pro Tyr Cys
 865 870 875 880

gct tct tca aaa cat aga ccg tca cat cnc aga cgg acc atg tct gat 2688
 Ala Ser Ser Lys His Arg Pro Ser His His Arg Arg Thr Met Ser Asp
 885 890 895

gga aat ccg acc cca act ggt gca act att atc tca gcc act gga gcc 2736
 Gly Asn Pro Thr Pro Thr Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ala Thr Gly Ala
 900 905 910

tct gca ctg cca ctc tgc ccc tca cct gct cct cac agt cat ctg cca 2784
 Ser Ala Leu Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ala Pro His Ser His Leu Pro
 915 920 925

agg gag gtc tca ccc aag aag cac agc act gtc cac atc gtg cct cag 2832
 Arg Glu Val Ser Pro Lys Lys His Ser Thr Val His Ile Val Pro Gln
 930 935 940

cgt cgc cct gcc tcc ctg aga agc cgc tca gat ctg cct cag gct tac 2880
 Arg Arg Pro Ala Ser Leu Arg Ser Arg Ser Asp Leu Pro Gln Ala Tyr
 945 950 955 960

cca cag aca gca gtg tct cag ctg gca cag act gcc tgt gta gtg ggt 2928
 Pro Gln Thr Ala Val Ser Gln Leu Ala Gln Thr Ala Cys Val Val Gly
 965 970 975

cgc cca gga cca cat ccc acc caa ttc ctc gct gcc aag gag aga act 2976
 Arg Pro Gly Pro His Pro Thr Gln Phe Leu Ala Ala Lys Glu Arg Thr
 980 985 990

aaa tcc cat gtg cct tca tta ctg gat gct gac gtg gaa ggt cag agc 3024
 Lys Ser His Val Pro Ser Leu Leu Asp Ala Asp Val Glu Gly Gln Ser
 995 1000 1005

WO 02/095017

PCT/US02/16387

agg gac tac act gtg cca ctg tgc aga atg agg agc aaa acc agc 3069
 Arg Asp Tyr Thr Val Pro Leu Cys Arg Met Arg Ser Lys Thr Ser
 1010 1015 1020

cgg cca tct ata tat gaa ctg gag aaa gaa ttc ctg tct taa 3111
 Arg Pro Ser Ile Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Ser
 1025 1030 1035

<210> 2
 <211> 1036
 <212> FRZ
 <213> homo sapiens

<400> 2

Met Ala Leu Arg Gly Ala Ala Gly Ala Thr Asp Thr Pro Val Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala Ser Ser Ser Thr Ser Ser
 20 25 30

Gly Gly Ser Ala Ser Ala Gly Ala Gly Leu Trp Ala Ala Leu Tyr Asp
 35 40 45

Tyr Glu Ala Arg Gly Glu Asp Glu Leu Ser Leu Arg Arg Gly Gln Leu
 50 55 60

Val Glu Val Leu Ser Gln Asp Ala Ala Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp
 65 70 75 80

Trp Ala Gly Gln Val Gln Arg Arg Leu Gly Ile Phe Pro Ala Asn Tyr
 85 90 95

Val Ala Pro Cys Arg Pro Ala Ala Ser Pro Ala Pro Pro Ser Arg
 100 105 110

Pro Ser Ser Pro Val His Val Ala Phe Glu Arg Leu Glu Leu Lys Glu
 115 120 125

Leu Ile Gly Ala Gly Gly Phe Gly Gln Val Tyr Arg Ala Thr Trp Gln
 130 135 140

Gly Gln Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg Gln Asp Pro Glu Gln Asp
 145 150 155 160

Ala Ala Ala Ala Ala Glu Ser Val Arg Arg Glu Ala Arg Leu Phe Ala
 165 170 175

Met Leu Arg His Pro Asn Ile Ile Glu Leu Arg Gly Val Cys Leu Gln
 180 185 190

Gln Pro His Leu Cys Leu Val Leu Glu Phe Ala Arg Gly Gly Ala Leu
 195 200 205

Asn Arg Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Ala Pro Asp Pro Arg Ala Pro
 210 215 220

WO 02/095017

PCT/US02/16387

Gly Pro Arg Arg Ala Arg Arg Ile Pro Pro His Val Leu Val Asn Trp
 225 230 235 240
 Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Leu Tyr Leu His Glu Glu Ala Phe
 245 250 255
 Val Pro Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Leu Leu
 260 265 270
 Glu Lys Ile Glu His Asp Asp Ile Cys Asn Lys Thr Leu Lys Ile Thr
 275 280 285
 Asp Phe Gly Leu Ala Arg Glu Trp His Arg Thr Thr Lys Met Ser Thr
 290 295 300
 Ala Gly Thr Tyr Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Ser Lys Gly Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu
 325 330 335
 Leu Leu Thr Gly Glu Val Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Leu Ala Val
 340 345 350
 Ala Tyr Gly Val Ala Val Asn Lys Leu Thr Leu Pro Ile Pro Ser Thr
 355 360 365
 Cys Pro Glu Pro Phe Ala Lys Leu Met Lys Glu Cys Trp Gln Gln Asp
 370 375 380
 Pro His Ile Arg Pro Ser Phe Ala Leu Ile Leu Glu Gln Leu Thr Ala
 385 390 395 400
 Ile Glu Gly Ala Val Met Thr Glu Met Pro Gln Glu Ser Phe His Ser
 405 410 415
 Met Gln Asp Asp Trp Lys Leu Glu Ile Gln Gln Met Phe Asp Glu Leu
 420 425 430
 Arg Thr Lys Glu Lys Glu Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Leu Thr Arg
 435 440 445
 Ala Ala Leu Gln Gln Lys Ser Gln Glu Glu Leu Leu Lys Arg Arg Glu
 450 455 460
 Gln Gln Leu Ala Glu Arg Glu Ile Asp Val Leu Glu Arg Glu Leu Asn
 465 470 475 480
 Ile Leu Ile Phe Gln Leu Asn Gln Glu Lys Pro Lys Val Lys Lys Arg
 485 490 495
 Lys Gly Lys Phe Lys Arg Ser Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly His Arg
 6

WO 02/095017

PCT/US02/16387

500 505 510
Ile Ser Leu Pro Ser Asp Phe Gln His Lys Ile Thr Val Gln Ala Ser
515 520 525
Pro Asn Leu Asp Lys Arg Arg Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Pro
530 535 540
Pro Ser Ser Pro Thr Met Met Pro Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Thr
545 550 555 560
Ser Asp Glu Ser Asn Lys Thr Trp Gly Arg Asn Thr Val Phe Arg Gln
565 570 575
Glu Glu Phe Glu Asp Val Lys Arg Asn Phe Lys Lys Lys Gly Cys Thr
580 585 590
Trp Gly Pro Asn Ser Ile Gln Met Lys Asp Arg Thr Asp Cys Lys Glu
595 600 605
Arg Ile Arg Pro Leu Ser Asp Gly Asn Ser Pro Trp Ser Thr Ile Leu
610 615 620
Ile Lys Asn Gln Lys Thr Met Pro Leu Ala Ser Leu Phe Val Asp Gln
625 630 635 640
Pro Gly Ser Cys Glu Glu Pro Lys Leu Ser Pro Asp Gly Leu Glu His
645 650 655
Arg Lys Pro Lys Gln Ile Lys Leu Pro Ser Gln Ala Tyr Ile Asp Leu
660 665 670
Pro Leu Gly Lys Asp Ala Gln Arg Glu Asn Pro Ala Glu Ala Glu Ser
675 680 685
Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Asn Ala Ala Thr Val Ser Ile Glu Met
690 695 700
Thr Pro Thr Asn Ser Leu Ser Arg Ser Pro Gln Arg Lys Lys Thr Glu
705 710 715 720
Ser Ala Leu Tyr Gly Cys Thr Val Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Gly
725 730 735
Leu Asp Leu Arg Glu Leu His Lys Ala Gln Ala Ala Glu Glu Pro Leu
740 745 750
Pro Lys Glu Glu Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ile Phe Gln Arg Ala Ser
755 760 765
Lys Ser Arg Arg Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Leu Pro Ser Thr Cys
770 775 780

WO 02/095017

PCT/US02/16387

Gly Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Leu Pro Leu Ser Ser Ala Leu Gly
 785 790 795 800
 Ile Leu Ser Thr Pro Ser Phe Ser Thr Lys Cys Leu Leu Gln Met Asp
 805 810 815
 Ser Glu Asp Pro Leu Val Asp Ser Ala Pro Val Thr Cys Asp Ser Glu
 820 825 830
 Met Leu Thr Pro Asp Phe Cys Pro Thr Ala Pro Gly Ser Gly Arg Glu
 835 840 845
 Pro Ala Leu Met Pro Arg Leu Asp Thr Asp Cys Ser Val Ser Arg Asn
 850 855 860
 Leu Pro Ser Ser Phe Leu Gln Gln Thr Cys Gly Asn Val Pro Tyr Cys
 865 870 875 880
 Ala Ser Ser Lys His Arg Pro Ser His His Arg Arg Thr Met Ser Asp
 885 890 895
 Gly Asn Pro Thr Pro Thr Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ala Thr Gly Ala
 900 905 910
 Ser Ala Leu Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ala Pro His Ser His Leu Pro
 915 920 925
 Arg Glu Val Ser Pro Lys Lys His Ser Thr Val His Ile Val Pro Gln
 930 935 940
 Arg Arg Pro Ala Ser Leu Arg Ser Arg Ser Asp Leu Pro Gln Ala Tyr
 945 950 955 960
 Pro Gln Thr Ala Val Ser Gln Leu Ala Gln Thr Ala Cys Val Val Gly
 965 970 975
 Arg Pro Gly Pro His Pro Thr Gln Phe Leu Ala Ala Lys Glu Arg Thr
 980 985 990
 Lys Ser His Val Pro Ser Leu Leu Asp Ala Asp Val Glu Gly Gln Ser
 995 1000 1005
 Arg Asp Tyr Thr Val Pro Leu Cys Arg Met Arg Ser Lys Thr Ser
 1010 1015 1020
 Arg Pro Ser Ile Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Ser
 1025 1030 1035

<210> 3
 <211> 8
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic polypeptide sequence

WO 02/095017

PCT/US02/16387

<400> 3

His Arg Asp Leu Lys Ser Arg Asn
1 5

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primers

<400> 4

atgaagaat gctggcaaca agaccctc

28

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primers

<400> 5

aggtaaaactg attcgatgtc catctttg

28

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/16387
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 9/12, 15/00, 5/00, 1/20; C07H 21/04; C07K 1/00 US CL : 435/194, 252.3, 325, 320.1; 530/350; 536/23.2 According to International Patent Classification (IPC) or in both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/194, 252.3, 325, 320.1; 530/350; 536/23.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE EMBASE BIOSIS BIOTECHDS SCISEARCH HCAPLUS NTIS LIFESCI BRS/EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DOROW et al. Complete nucleotide sequence, expression, and chromosomal localisation of human mixed linkages kinase 2. Eur. J. Biochem. November 1995, Vol. 234, pages 492-500, see attached alignment.	3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "C" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 September 2002 (28.09.2002)		Date of mailing of the international search report 10/11/2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Maryam Monshipour Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/16387
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/> Claim Nos. : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	<input type="checkbox"/> Claim Nos. : because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	<input type="checkbox"/> Claim Nos. : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	<input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/16387

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-15, 20-21, drawn to isolated polynucleotides encoding mixed linkage kinase 7 (MLK7), vectors and host cells comprising said polynucleotides, compositions and kits comprising said polynucleotides and said vectors, methods of expressing said polynucleotides, their expression products and compositions comprising said expression products.

Group II, claim(s) 16-19, drawn to antibodies which specifically bind said kinase and compositions comprising said antibodies.

Group III, claim(s) 22-29, drawn to methods of identifying modulators of said kinase.

Group IV, claim(s) 30-32, drawn to modulators of said kinase.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I-IV are DNA, antibodies, kinase and modulators, respectively, which are products of unrelated chemical structure function.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/40	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/12	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 N 9/12	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/52	

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

U N I X

(72)発明者 ホルスキン, ビバリー・ピー
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 6 フィラデルフィア・ウエストタワー・アパートメント
3 1 デイ

(72)発明者 マイヤー, シェリル・エル
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 2 6 カレッツビル・レベルロード 2 7 4

(72)発明者 スパイス, クリサンテ・エム
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 8 0 ウェストチエスター・ウェストコーエンテラス 6

F ターム(参考) 2G045 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 FB01
FB02 FB03 FB05 FB06
4B024 AA01 AA11 BA10 CA04 CA05 CA11 DA02 EA02 HA11 HA17
4B050 CC03 DD11 LL01
4B063 QA18 QQ44 QR32 QS11
4B065 AA90X AA93Y AB01 CA29 CA44 CA46
4C084 AA01 AA06 AA07 DC25 NA14 ZA02 ZA18 ZB11 ZB21
4H045 AA11 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74