

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3606579号
(P3606579)

(45) 発行日 平成17年1月5日(2005.1.5)

(24) 登録日 平成16年10月15日(2004.10.15)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 45/00

C 1 2 Q 1/48

C 1 2 Q 1/48

Z

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/536

G O 1 N 33/536

請求項の数 71 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-510456
 (86) (22) 出願日 平成6年9月28日(1994.9.28)
 (65) 公表番号 特表平9-505730
 (43) 公表日 平成9年6月10日(1997.6.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1994/011067
 (87) 国際公開番号 W01995/009365
 (87) 国際公開日 平成7年4月6日(1995.4.6)
 審査請求日 平成13年9月25日(2001.9.25)
 (31) 優先権主張番号 127,922
 (32) 優先日 平成5年9月28日(1993.9.28)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 246,441
 (32) 優先日 平成6年5月20日(1994.5.20)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

ニューヨーク ユニバーシティー メディ
 カル センター
 アメリカ合衆国 10016 ニューヨー
 ク州 ニューヨーク、ファースト アベニ
 ュー 550番地

(73) 特許権者

スーゲン、インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 94063 カリフォル
 ニア州 レッドウッド シティ、ガルヴ
 エストン ドライブ 515番地

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B C R - A B L 関連白血病および他の細胞増殖性疾患の治療方法ならびに組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力について試験すべき化合物を同定する方法であって、

(a) 少なくとも1種の化合物を、プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドに、該化合物を該メンバーの機能性部分に結合させるのに十分な時間さらし、

(b) 結合しなかった化合物を取り除き、そして

(c) プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分に結合した化合物の存在を検出し、それによりプロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力について試験すべき化合物を同定する、
 ことを含んでなる方法。

【請求項2】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力のある化合物を同定する方法であって、該化合物をプロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体に該複合体を破壊させるのに十分な時間さらし、そしてプロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体の破壊を検出する、ことを含んでなる方法。

10

20

【請求項 3】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンキナーゼポリペプチドが膜貫通の受容体プロテインチロシンキナーゼポリペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンキナーゼポリペプチドが細胞内の細胞質プロテインチロシンキナーゼポリペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

細胞内の細胞質プロテインチロシンキナーゼポリペプチドがBCR/ABL細胞内の細胞質プロテインチロシンキナーゼポリペプチドである、請求項 4 に記載の方法。 10

【請求項 6】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンキナーゼポリペプチド細胞内の核プロテインチロシンキナーゼポリペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のアダプターポリペプチドがGRBポリペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

GRBポリペプチドがGRB - 2 ポリペプチドである、請求項 7 に記載の方法。 20

【請求項 9】

GRBポリペプチドがGRB - 1、GRB - 4、GRB - 7 またはGRB - 10ポリペプチドである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンキナーゼポリペプチドがBCR/ABL細胞内の細胞質プロテインチロシンキナーゼポリペプチドであり、プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のアダプターポリペプチドがGRB - 2 ポリペプチドであり、かくしてプロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体がBCR/ABLポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体となる、請求項 1 または 2 に記載の方法。 30

【請求項 11】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドが少なくとも 1 個のリン酸化チロシンアミノ酸残基を有するペプチドを含むものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 12】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドがリン酸化ドメインの機能性部分を含むものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 13】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドがSH2ドメインの機能性部分を含むものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。 40

【請求項 14】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドがSH3ドメインの機能性部分を含むものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 15】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドがSH2結合ドメインの少なくとも 4 個の連続したアミノ酸残基を含むものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。 50

【請求項 16】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドがSH3結合ドメインの機能性部分を含むものである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 17】

SH3結合ドメインの機能性部分が少なくとも4個のアミノ酸残基の鎖長を有するものである、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

SH3結合ドメインの機能性部分が少なくとも10個のアミノ酸残基の鎖長を有するものである、請求項16に記載の方法。

10

【請求項 19】

同定された化合物がさらにプロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体を破壊する能力を有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 20】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体を破壊する能力をもつ化合物がさらに、プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力を有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 21】

同定された化合物がさらにBCR/ABLポリペプチド/GRB - 2ポリペプチド複合体を破壊する能力を有する、請求項20に記載の方法。

20

【請求項 22】

BCR/ABLポリペプチド/GRB - 2ポリペプチド複合体を破壊する能力を有する化合物がさらに、BCR/ABLポリペプチド/GRB - 2ポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力を有する、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

細胞増殖性疾患が慢性骨髄性白血病である、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

細胞増殖性疾患が急性リンパ性白血病である、請求項22に記載の方法。

【請求項 25】

細胞増殖性疾患が急性骨髄性白血病である、請求項22に記載の方法。

30

【請求項 26】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力について試験すべき化合物を同定する方法であって、

(a) 少なくとも1種の化合物を、プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドに、該化合物を該メンバーの機能性部分に結合させるのに十分な時間さらし、

(b) 結合しなかった化合物を取り除き、そして

(c) プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分に結合した化合物の存在を検出し、それによりプロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力について試験すべき化合物を同定する、ことを含んでなる方法。

40

【請求項 27】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力のある化合物を同定する方法であって、該化合物をプロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体に該複合体を破壊させるのに十分な時間さらし、そしてプロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体の破壊を検出する、ことを含んでな

50

る方法。

【請求項 28】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンホスファターゼポリペプチドが膜貫通の受容体プロテインチロシンホスファターゼポリペプチドである、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 29】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンホスファターゼポリペプチドが細胞内の細胞質プロテインチロシンホスファターゼポリペプチドである、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 30】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のアダプターポリペプチドがGRBポリペプチドである、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 31】

GRBポリペプチドがGRB - 2 ポリペプチドである、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

GRBポリペプチドがGRB - 1、GRB - 4、GRB - 7 またはGRB - 10ポリペプチドである、請求項30に記載の方法。

【請求項 33】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドが少なくとも1個のリン酸化アミノ酸残基を有するペプチドを含むものである、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 34】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドがSH2ドメインの機能性部分を含むものである、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 35】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドがSH3ドメインの機能性部分を含むものである、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 36】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドがSH2結合ドメインの少なくとも4個の連続したアミノ酸残基を含むものである、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 37】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のメンバーの機能性部分を含むペプチドがSH3結合ドメインの機能性部分を含むものである、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 38】

SH3結合ドメインの機能性部分が少なくとも4個のアミノ酸残基の鎖長を有するものである、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

SH3結合ドメインの機能性部分が少なくとも10個のアミノ酸残基の鎖長を有するものである、請求項37に記載の方法。

【請求項 40】

膜貫通の受容体プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力について試験すべき化合物を同定する方法であって、

(a) 該化合物と、受容体チロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体を形成する能力がある細胞とを、受容体プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体の受容体プロテインチロシンキナーゼポリペプチドに該化合

10

20

30

40

50

物を結合させるのに十分な時間接触させ、

(b) 工程(a)の細胞に存在する受容体プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のレベルを検出し、

(c) 該化合物に接触していない工程(a)のタイプの細胞に存在する受容体プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のレベルを検出し、そして

(d) 工程(b)で検出された受容体プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のレベルと工程(c)で検出された該レベルとを比較し、その際、工程(c)で検出された該レベルが工程(b)で検出された該レベルより高い場合は、受容体プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力について試験すべき化合物が同定される

10

ことを含んでなる方法。

【請求項41】

膜貫通の受容体プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力について試験すべき化合物を同定する方法であって、

(a) 該化合物と、受容体チロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体を形成する能力がある細胞とを、受容体プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体の受容体プロテインチロシンホスファターゼポリペプチドに該化合物を結合させるのに十分な時間接触させ、

20

(b) 工程(a)の細胞に存在する受容体プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のレベルを検出し、

(c) 該化合物に接触していない工程(a)のタイプの細胞に存在する受容体プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のレベルを検出し、そして

(d) 工程(b)で検出された受容体プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のレベルと工程(c)で検出された該レベルとを比較し、その際、工程(c)で検出された該レベルが工程(b)で検出された該レベルより高い場合は、受容体プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする能力について試験すべき化合物が同定される、

30

ことを含んでなる方法。

【請求項42】

アダプターポリペプチドがGRBポリペプチドである、請求項40または41に記載の方法。

【請求項43】

GRBポリペプチドがGRB-2ポリペプチドである、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

GRBポリペプチドがGRB-1、GRB-4、GRB-7またはGRB-10ポリペプチドである、請求項42に記載の方法。

40

【請求項45】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患を *in vitro* でモジュレートする方法であって、プロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体を形成する能力がある細胞を、細胞増殖性疾患がモジュレートされるように該細胞のプロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体を破壊するのに十分な量の化合物と接触させる、ことを含んでなる方法。

【請求項46】

非ヒト哺乳動物においてプロテインチロシンキナーゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする方法であって、非ヒト哺乳

50

動物に、細胞増殖性疾患がモジュレートされるようにプロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体を破壊するのに十分な量の化合物を投与する、ことを含んでなる方法。

【請求項 4 7】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンキナーゼポリペプチドが膜貫通の受容体プロテインチロシンキナーゼポリペプチドである、請求項45または46に記載の方法。

【請求項 4 8】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンキナーゼポリペプチドが細胞内の細胞質プロテインチロシンキナーゼポリペプチドである、請求項45または46に記載の方法。

10

【請求項 4 9】

細胞内の細胞質プロテインチロシンキナーゼポリペプチドがBCR/ABL細胞内の細胞質プロテインチロシンキナーゼポリペプチドである、請求項48に記載の方法。

【請求項 5 0】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンキナーゼがポリペプチド細胞内の核プロテインチロシンキナーゼポリペプチドである、請求項45または46に記載の方法。

【請求項 5 1】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のアダプターポリペプチドがGRBポリペプチドである、請求項45または46に記載の方法。

20

【請求項 5 2】

GRBポリペプチドがGRB - 2 ポリペプチドである、請求項51に記載の方法。

【請求項 5 3】

GRBポリペプチドがGRB - 1、GRB - 4、GRB - 7 またはGRB - 10ポリペプチドである、請求項51に記載の方法。

【請求項 5 4】

プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンキナーゼポリペプチドがBCR/ABL細胞内の細胞質プロテインチロシンキナーゼポリペプチドであり、プロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体のアダプターポリペプチドがGRB - 2 ポリペプチドであり、かくしてプロテインチロシンキナーゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体がBCR/ABLポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体となる、請求項45または46に記載の方法。

30

【請求項 5 5】

モジュレートされる細胞増殖性疾患が慢性骨髄性白血病である、請求項54に記載の方法。

【請求項 5 6】

モジュレートされる細胞増殖性疾患が急性リンパ性白血病である、請求項54に記載の方法。

【請求項 5 7】

モジュレートされる細胞増殖性疾患が急性骨髄性白血病である、請求項54に記載の方法。

40

【請求項 5 8】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患を *in vitro* でモジュレートする方法であって、プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体を形成する能力がある細胞を、細胞増殖性疾患がモジュレートされるように該細胞のプロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体を破壊するのに十分な量の化合物と接触させる、ことを含んでなる方法。

【請求項 5 9】

非ヒト哺乳動物においてプロテインチロシンホスファターゼポリペプチド / アダプターポリペプチド複合体が関与している細胞増殖性疾患をモジュレートする方法であって、非ヒ

50

ト哺乳動物に、細胞増殖性疾患がモジュレートされるようにプロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体を破壊するのに十分な量の化合物を投与する、ことを含んでなる方法。

【請求項 6 0】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンホスファターゼポリペプチドが膜貫通の受容体プロテインチロシンホスファターゼポリペプチドである、請求項58または59に記載の方法。

【請求項 6 1】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のプロテインチロシンホスファターゼポリペプチドが細胞内の細胞質プロテインチロシンホスファターゼポリペプチドである、請求項58または59に記載の方法。

10

【請求項 6 2】

プロテインチロシンホスファターゼポリペプチド/アダプターポリペプチド複合体のアダプターポリペプチドがGRBポリペプチドである、請求項58または59に記載の方法。

【請求項 6 3】

GRBポリペプチドがGRB - 2 ポリペプチドである、請求項62に記載の方法。

【請求項 6 4】

GRBポリペプチドがGRB - 1、GRB - 4、GRB - 7 またはGRB - 10ポリペプチドである、請求項58または59に記載の方法。

【請求項 6 5】

単離されたBCR/ABLポリペプチド/GRB - 2 アダプターポリペプチド複合体。

20

【請求項 6 6】

第1の結合相手分子と第2の結合相手分子の特異的相互作用を阻止する物質を同定するためのアッセイであって、

(a) 第1の結合相手分子の結合ドメインに対応するアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチドと、第2の結合相手分子の結合ドメインに対応するアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチドとを、第1および第2の結合相手分子を結合させて結合相手分子複合体を形成させるのに十分な条件下および時間にわたり試験物質の存在下に接触させ、そして

(b) 該複合体の形成を検出し、その際、第1の結合相手と第2の結合相手との相互作用を阻止する試験物質の能力が、該試験物質の不在下で形成された複合体の量と比べたときの複合体形成の減少により示される、ことを含んでなるアッセイ。

30

【請求項 6 7】

第1の結合相手分子の結合ドメインがSH2結合ドメインであり、第2の結合相手分子の結合ドメインがSH2ドメインである、請求項66に記載のアッセイ。

【請求項 6 8】

第1の結合相手分子が活性化されたチロシンキナーゼ分子であり、第2の結合相手分子がアダプタータンパク質分子である、請求項66に記載のアッセイ。

【請求項 6 9】

活性化されたチロシンキナーゼ分子が活性化されたBCR - ABL分子であり、アダプタータンパク質分子がGRB - 2 分子である、請求項68に記載のアッセイ。

40

【請求項 7 0】

上記複合体の一方の結合相手分子が固定化されており、他方の結合相手分子がシグナル発生活性化合物で標識されている、請求項66に記載のアッセイ。

【請求項 7 1】

上記複合体の一方の結合相手分子が工程(a)の前に固定化されており、かくして工程(a)における接触が固 - 液相で行われる、請求項70に記載のアッセイ。

【発明の詳細な説明】

本発明は、1994年5月20日出願の米国出願No.08/246,441の一部継続出願であり、その全

50

体を参考文献として本明細書に含める。米国出願No.08/246,441は、1993年9月28日出願の米国出願No.08/127,922の一部継続出願である。

1. 序論

本発明は、アダプタータンパク質のSH2 - および / またはSH3ドメイン含有ファミリーのメンバーと複合体化し得るプロテインチロシンキナーゼまたはプロテインチロシンホスファターゼが関与している細胞増殖性疾患を予防および治療するための組成物ならびに方法に関する。本発明は、一部には、アダプタータンパク質GRB - 2 がin vivoで細胞内のBCR - ABLチロシンキナーゼ産物と結合し、かつBCR - ABL産物の潜在的な発がん能力の活性化にとって必要であること、およびGRB - 2 のシグナル能の破壊が細胞の形質転換された表現型を逆にし、動物での腫瘍増殖を減少させる、という驚くべき発見に基づいている。本発明はさらに、プロテインチロシンキナーゼ / アダプタータンパク質複合体ならびに該複合体のメンバー間の相互作用を破壊することができる作用物質を同定するための該複合体の使用に関する。

10

2. 背景

2.1. タンパク質のリン酸化およびシグナル形質導入

細胞は、細胞がじかに接触する環境からの刺激を受け取る手段として、かなりの部分を細胞外分子に頼っている。これらの細胞外のシグナルは、分化、収縮性、分泌、細胞分裂、接触阻止および代謝などの種々の細胞プロセスの正しい調節に必須である。例えばホルモン、成長因子、リンフォカインまたは神経伝達物質などの細胞外分子は、特定の細胞表面受容体と結合するリガンドとして作用する。これらのリガンドがそれらの受容体に結合すると、最初の刺激の増殖および上述した個々の細胞プロセスの協調の両方をもたらすカスケード反応を誘発する。正常な細胞プロセスの他に、受容体およびそれらの細胞外リガンドは、ウイルス - 受容体相互作用、炎症、およびがんの状態への細胞の形質転換などの異常または潜在的に有害なプロセスにも関与するかもしれない。

20

シグナル形質導入（最近の総説として、Posadaら、1992,Mol.Biol.Cell 3:583 - 592;Hardie,D.G.,1990,Symp.Soc.Exp.Biol.44:241 - 255）と呼ばれるこのプロセスの中心的な特徴は、ある種のタンパク質の可逆的リン酸化である。

アミノ酸残基のリン酸化または脱リン酸化は、調節されるタンパク質の生物学的特性を変える該タンパク質の立体変化を誘発する。タンパク質は、プロテインキナーゼによってリン酸化され、プロテインホスファターゼによって脱リン酸化される。プロテインキナーゼおよびホスファターゼは、それらが作用するアミノ酸残基に従って分類される。一つの種類は、セリン - トレオニンキナーゼおよびホスファターゼであって（Scottら、1992,2:289 - 295）、セリンおよびトレオニン残基に作用する。他の種類はチロシンキナーゼおよびホスファターゼであって（Fischerら、1991,Science 253:401 - 406;Schlessingerら、1992,Neuron 9:383 - 391;Ullrichら、1990,Cell 61:203 - 212）、チロシン残基に作用する。リン酸化は、競合するリン酸化および脱リン酸化反応を含む動的プロセスであり、ある瞬間のリン酸化レベルは、その瞬間において、これらの反応を触媒するプロテインキナーゼおよびホスファターゼの相対的な活性を表す。

30

タンパク質のリン酸化の大部分はセリンおよびトレオニンアミノ酸残基で生じるが、チロシン残基でのリン酸化も生じ、これは、多くのがん遺伝子産物および成長因子受容体が固有のプロテインチロシンキナーゼ活性を有するという発見以来、かなり関心が集まり始めている。成長因子のシグナル形質導入、細胞サイクルの進行および悪性形質転換におけるプロテインチロシンリン酸化の重要性は、現在、かなり確立されている（Cantleyら、1991,Cell 64:281 - 302;Hunter T.,1991,Cell 64:249 - 270;Nurse,1990,Nature 344:503 - 308;Schlessingerら、1992,Neuron 9:383 - 391;Ullrichら、1990,Cell 61:203 - 212）。発がんに導く正常な成長コントロール経路の破壊は、支配的な発がんタンパク質の大きな集団を構成するプロテインチロシンキナーゼの活性化または過発現によって引き起こされることが分かっている（Hunter,T.,1991,Cell 64:249 - 270）。

40

2.2. プロテインチロシンキナーゼ

プロテインチロシンキナーゼは、多くの成長因子受容体および潜在的ながん遺伝子を含む

50

タンパク質の大きなファミリーを含み、セリン/トレオニン特異的プロテインキナーゼと起源は共通であるが、それとは異なる (Hanksら、1998, Science 241:42 - 52)。そのプロテインキナーゼはさらに、受容体型または非受容体型として定義することができる。

受容体型のプロテインチロシンキナーゼは膜内外トポロジーを有し、広く研究されている。受容体型プロテインチロシンキナーゼの細胞外ドメインへの特異的リガンドの結合は、受容体の二量化および自身のチロシン残基のリン酸化を誘発すると考えられる。受容体の細胞質ドメインの個々のホスホチロシン残基は、細胞質シグナル化分子の宿主と相互作用し、それによって種々のシグナル形質導入経路を活性化する特異的な結合部位として作用すると考えられる (Ullrichら、1990, Cell 61:203 - 212)。

細胞内の細胞質非受容体型プロテインチロシンキナーゼは、疎水性の膜貫通ドメインを含まないプロテインチロシンキナーゼとして広く定義することができる。この広い分類では、公知の細胞質プロテインチロシンキナーゼを4種類の異なる形態に分けることができる。すなわち、SRCファミリー (Martinezら、1987, Science 237:411 - 414; Sukegawaら、1987, Mol. Cell. Biol. 7:41 - 47; Yamanishiら、1987, 7:237 - 243; Marthら、1985, Cell 43:393 - 404; Dymeckiら、1990, Science 247:332 - 336)、FESファミリー (Ruebroekら、1985, EMBO J. 4:2897 - 2903; Haoら、1989, Mol. Cell. Biol. 9:1587 - 1593)、ABLファミリー (Shtivelmanら、1986, Cell 47:277 - 284; Kruhら、1986, Science 234:1545 - 1548) およびJAKファミリーである。それらは、全体の分子構造が異なるが、細胞質プロテインチロシンキナーゼのこれらの形態学上のファミリーの各メンバーは、触媒キナーゼドメインを共有する他に、非触媒ドメインも共有する。そのような非触媒ドメインは、SH2 (SRCホモロジドメイン2; Sadowskiら、Mol. Cell. Biol. 6:4396 - 4408; Kochら、1991, Science 252:668 - 674) ドメインおよびSH3ドメイン (Mayerら、1998, Nature 332:269 - 272) である。非触媒ドメインは、シグナル形質導入中のタンパク質 - タンパク質相互作用の調節に重要であると考えられる (Pawsonら、1992, Cell 71:359 - 362)。

細胞質プロテインチロシンキナーゼの代謝上の役割は、受容体型プロテインチロシンキナーゼに比べてあまり理解されていないが、この種の分子が関与するいくつかのプロセスの説明において、かなり進展があった。例えば、srcファミリーのメンバーであるlckおよびfynは、CD4/CD8およびT細胞受容体複合体と相互作用することが分かっており、従って、T細胞の活性化に関係があるとされている (Veilletteら、1992, TIG 8:61 - 66)。ある種の細胞質プロテインチロシンキナーゼは、ある段階の細胞サイクルに結合している (Morganら、1989, Cell 57:775 - 786; Kipreosら、1990, Science 248:217 - 220; Weaverら、1991, Mol. Cell. Biol. 11:4415 - 4422)。細胞質プロテインチロシンキナーゼは、ニューロンの発生に関係があるとされている (Maness, P., 1992, Dev. Neurosci. 14:257 - 270)。突然変異または過発現によるキナーゼ活性の規制解除は、細胞形質転換の基礎をなす十分確立された機構である (Hunterら、1985, 前出; Ullrichら、前出)。

2.3. G - タンパク質およびシグナル形質導入

Ras (Lowyら、1993, Ann. Rev. Biochem. 62:851 - 891参照) などのグアニン - ヌクレオチド - 結合タンパク質 (G - タンパク質; Simonら、1991, Science 252:802 - 808; Kaziroら、1991, Ann. Rev. Biochem. 60:349 - 400) は、受容体型チロシンキナーゼからのミトゲンシグナルの伝達において重要な役割を果たす。一例としてRasを挙げると、リガンド結合による受容体型チロシンキナーゼの活性化により、Ras分子の活性GTP結合形が蓄積する (Gibbsら、1990, J. Biol. Chem. 265:20437 - 20444; Satohら、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5993 - 5997; Liら、1992, Science 256:1456 - 1459; Budayら、1993, Mol. Cell. Biol. 13:1903 - 1910; Medemaら、1993, Mol. Cell. Biol. 13:155 - 162)。Ras活性化は、また、ウイルス性発がんチロシンキナーゼによる形質転換に対しても必要である (Smithら、1986, Nature 320:540 - 43)。

Ras活性は、GTPase - 活性化タンパク質 (GAPs) およびグアニンヌクレオチド交換因子の対立する作用によって調節され、GAPsは、Ras上でのGTP加水分解の遅い固有速度を刺激し、交換因子は、Ras上でのGTPに対するGDP交換の基底速度を刺激する。すなわち、GAPsは、Ras機能の負のレギュレータとして作用し、交換因子はRas活性化剤として作用する。

10

20

30

40

50

最近、活性化された受容体型チロシンキナーゼとRasとの間の直接の連結が確立されるとともに、1個のSH2ドメインと2個のSH3ドメインから成る26キロダルトンのタンパク質である哺乳類のGRB-2タンパク質(Lowensteinら、1992,Cell 70:431-442)が、哺乳類およびショウジョウバエにおいて、受容体型チロシンキナーゼをRas交換因子Sosに直接結合させることが発見された(Budayら、1993,Cell 73:611-620;Eganら、1993,Nature 363:45-51;Liら、1993,Nature 363:85-87;Galeら、1993,Nature 363:88-92;Rozakis-Adcockら、1993,Nature 363:83-85;Chardinら、1993,Science 260:1338-1343;Oliverら、Cell 73:179-191;Simonら、1993,Cell 73:169-177)。GRB-2 SH2ドメインは、受容体チロシンキナーゼの特定のチロシンリン酸化配列に結合し、GRB-2 SH3ドメインは、Sos交換因子に存在するプロリンが豊富な配列に結合する。従って、GRB-2の受容体キナーゼへの結合は、Rasが位置する血漿膜へのSosの補充を準備する(Schlessinger,J.,1993,TIBS 18:273-275)。

10

2.4. 白血病の発生におけるBCR-ABL

プロテインチロシンキナーゼなどの正常な細胞タンパク質の発がん能力の活性化は、タンパク質の対応する酵素活性の変化、上記第2.3.節で挙げたような他の細胞成分への不適切な結合またはその両方によって生じると考えられる。

例えば、BCR-ABLプロテインチロシンキナーゼ腫瘍タンパク質は、酵素活性の変化および/または非共有的なタンパク質-タンパク質相互作用により細胞を形質転換すると考えられる。BCR-ABL腫瘍タンパク質をコードする遺伝子は、染色体9上のcABLプロテインチロシンキナーゼから染色体22上のBCR配列へ配列を移動することにより発生するキメラがん遺伝子である(Kurzrockら、1988,N.Engl.J.Med.319:990-998およびRosenbergら、1988,Adv.in Virus Res.35:39-81)。BCR-ABLがん遺伝子は、フィラデルフィア染色体(Ph¹)陽性ヒト白血球の病因に関係があるとされている。すなわち、Ph¹染色体は、造血幹細胞の悪性形質転換から生じるクローン癌である慢性骨髄性白血病(CML)患者の少なくとも90~95%に見られ(Fialkowら、1977,Am.J.Med.63,:125-130)、また、成人の急性リンパ性白血病(ALL)患者の約20%、小児のALL患者の5%および成人の急性骨髄性白血病(AML)患者の2%に認められる(Whang-Pengら、1970,Blood 36:448-457;Look,A.T.,1985,Semin.Oncol.12:92-104)。BCR-ABL遺伝子は、二つの別のキメラタンパク質、すなわち、各々CMLおよびALLの特徴であるP210 BCR-ABLおよびP185 BCR-ABLを産生する。さらに、最近、BCR-ABL遺伝子産物がCMLの原因物質であることが直接示された(Skorskiら、

20

30

1993,J.Clin Invest.92:194-202;Snyderら、1993,Blood 82:600-605)。

CMLは、臨床的には、2段階的経過をとることを特徴とする。その病気は、成熟していない骨髄前駆細胞のプールがかなり増加することを特徴とする慢性期で始まる。最終分化が保持されるので、この結果、循環する成熟顆粒球のプールがかなり増加する。数週間~何年かの後、骨髄増殖が加速された状態が生じ、骨髄細胞は、次第に最終分化能を失う。この間に、血小板増加症、好塩基球増加症およびクローン細胞遺伝異常がしばしば現れる。これらの異常は、最終の急性転化段階のシグナルであり、その間に、未成熟芽細胞が急激に増殖し、患者の死は避けられなくなる。

以前に、BCR-ABLタンパク質は、正常なc-ABLタンパク質と比較して高まったチロシンキナーゼ能および形質転換能を示すことが分かった(Konopkaら、1984,Cell 37:1035-1042)。BCRの第一エキソン配列が、BCR-ABLのチロシンキナーゼ能および形質転換能を特異的に活性化する(Mullerら、1991,Mol.Cell.Biol.11:1785-1792;McWhirterら、1991,Mol.Cell.Biol.11:1553-1565)。BCRの第一エキソンは、ホスホチロシンとは無関係な方法でABL SH2ドメインに結合することができ(Pendergastら、1991,Cell 66:161-171)、ABL SH2-結合に必須のBCR配列の欠失は、BCR-ABLを非形質転換にする(Pendergastら、1991,Cell 66:161-171)。さらに、BCRは、in vitroで、他のタンパク質によってコードされるいくつかの他のSH2ドメインに結合することが示された(Mullerら、1992,Mol.Cell.Biol.12:5087-5093)。これらの結果から、SH2ドメインのBCRへの結合のいくつかの点、BCR-ABL腫瘍タンパク質の発がん性に関与すると推論されるが、そのようなBCR-ABL発がんが生じる機構はまだはっきりしていない。例えば、多数のSH2ドメイン含有タ

40

50

ンパク質の存在が知られており、BCR - ABLエフェクターの同定はさらにはかなりの研究が必要である。

3. 発明の要旨

本発明は、アダプタータンパク質のSH2 - および / またはSH3ドメイン含有ファミリーのメンバーと複合体化し得るプロテインチロシンキナーゼまたはプロテインチロシンホスファターゼが関与している細胞増殖性疾患を予防および治療するための組成物ならびに方法に関する。本発明はさらに、プロテインチロシンキナーゼ / アダプタータンパク質複合体、プロテインチロシンホスファターゼ / アダプタータンパク質複合体ならびに該複合体の成分間の相互作用を破壊することができる作用物質を同定するための該複合体の使用に関する。

10

「プロテインチロシンキナーゼ」は、本明細書では「PTK」と略称し、「プロテインチロシンホスファターゼ」は、本明細書では「PTP」と略称する。理解されるように、「PTK」は、特に断らない限り、膜貫通の受容体型プロテインチロシンキナーゼまたは細胞質プロテインチロシンキナーゼを意味し、同様に、「PTP」は、特に断らない限り、膜貫通の受容体型プロテインチロシンホスファターゼまたは細胞質プロテインチロシンホスファターゼを意味する。

本発明は、一部には、アダプタータンパク質GRB - 2 がin vivoで細胞内のBCR - ABL PTK産物と結合し、かつBCR - ABL産物の潜在的な発がん能力の活性化にとって必要である、という驚くべき発見に基づいている。本発明者らは、第一に、シグナル形質導入経路のメンバー間の相互作用の生理的関連性を、一部には、このシグナル形質導入の破壊により、細胞の形質転換された表現型が逆転し、動物におけるがんの増殖が抑制されることを示すことにより説明する。この発見を表すデータは、以下の第6～14節の実施例に示す。従って、本発明は、最初の例で、タンパク質のSH2 - および / またはSH3ドメイン含有アダプターファミリー、特にタンパク質のGRBサブファミリーのGRB - 2 メンバーが細胞増殖 / 活性化の発生および維持に関係あることを表し、本明細書では、発がん、形質転換プロセスおよびヒトのがんの発生に関与する異常な細胞増殖に対して説明する。さらに、BCR - ABL形質転換に関して、本発明は、BCR - ABL産物に対する第一エフェクター（すなわち、GRB - 2）を開示する。

20

3.1. 略号

下記表に、タンパク質化学者の間で一般に使用され、本明細書で使用する一文字および三文字の略号を示す。

30

アミノ酸	一文字表記	三文字表記	
アラニン	A	A l a	
アルギニン	R	A r g	
アスパラギン	N	A s n	
アスパラギン酸	D	A s p	
システイン	C	C y s	10
グルタミン酸	E	G l u	
グルタミン	Q	G l n	
グリシン	G	G l y	
ヒスチジン	H	H i s	
イソロイシン	I	I l e	
ロイシン	L	L e u	
リジン	K	L y s	20
メチオニン	M	M e t	
フェニルアラニン	F	P h e	
プロリン	P	P r o	
セリン	S	S e r	
トレオニン	T	T h r	
トリプトファン	W	T r p	
チロシン	Y	T y r	30
バリン	V	V a l	
不特定	X		

4. 図の記載

図1:BCR - ABL ~ Rasによる転写活性の刺激は、BCRの第一エキソンにチロシン177が存在することが必要である。NIH 3T3細胞に、1 μ g のpB4X - CATリポータープラスミドとともに、0.5 μ g の指示したBCR - ABL cDNA + / - 5 μ g のH - Ras (17N) cDNAをトランスフェクションさせた。48時間トランスフェクションを行った後、細胞を採取し、下記の第9.1.1.節で概説するようにCAT活性のアッセイを行った。データを任意の単位で記録した。基底シグナルは、リポーターの活性による。

図2:BCR - ABL ~ Rasによる転写活性の刺激は、GRB2 SH3ドメインの存在を必要とする。p210 BCR/ABL細胞を発現するRat1細胞に、1 μ g のpB4X - CATリポータープラスミドとともに、GRB2欠失変異株のいずれかをトランスフェクションさせた。48時間トランスフェクションを行った後、細胞を採取し、下記の第9.1.1.節で概説するようにCAT活性のアッセイを行った。レーン1:RAT1;レーン2:RAT1/p210/pCENベクター;レーン3:RAT1/p210/pCEN GRB2 Δ N';レーン4:RAT1/p210/pCEN GRB2 Δ C'。データは、RAT1を1に規格化して、任意の単位で記録した。基底シグナルは、リポーターの活性による。値は、重複 + / - 範囲の平均である。

図3:野生型および変異体GRB2タンパク質を発現するK562中のヘモグロビン含量。細胞溶解産物を調製し、記載されたベンジジン染色を使用してヘモグロビン含量を測定した(Feinsteinら、1992,Oncogene 7:1853 - 1857)。3個のサンプルの各細胞集団を分析した。データは、指示した構成体でトランスフェクションした全細胞タンパク質1 μ gに対するヘモグロビンの量を表す。

5.発明の詳細な説明

以下に、タンパク質のアダプターファミリーのSH2 - および / またはSH3ドメイン含有メンバーと複合体化し得るプロテインチロシンキナーゼまたはプロテインチロシンホスファターゼが関与している細胞増殖性疾患を予防および治療するための組成物ならびに方法を記載する。さらに、プロテインチロシンホスファターゼ / アダプタータンパク質複合体、プロテインチロシンホスファターゼ / アダプタータンパク質複合体、このような複合体の製造法およびこれらの複合体の使用をここに記載する。そのような使用としては、それらに限定されないが、該複合体の成分間の相互作用を破壊することができる作用物質の同定が挙げられる。

本発明は、一部には、アダプタータンパク質GRB - 2 がin vivoで細胞内のBCR - ABL産物と結合し、かつBCR - ABL産物の潜在的な発がん能力の活性化にとって必要であること、およびGRB - 2 シグナル形質導入の破壊が細胞の形質転換された表現型を逆にし、動物での腫瘍増殖を減少させる、という驚くべき発見に基づいている。この発現を表すデータは、下記の第6 ~ 14節の実施例に示す。

5.1.プロテインチロシンキナーゼ / アダプタータンパク質複合体

本発明のPTK/アダプタータンパク質複合体は、後述するように、タンパク質のPTKファミリーの少なくとも1つのメンバーおよびタンパク質のアダプターファミリーの少なくとも1つのメンバーを含む。標準的な生理的条件下では、該複合体の成分は、他のPTK/アダプタータンパク質複合体成分の1個以上とともに、安定して非共有的な結合を形成することができる。

本発明のPTK/アダプタータンパク質複合体のPTK成分は、細胞内細胞質非受容体型PTKs、細胞内核非受容体型PTKsまたは膜貫通受容体型PTKのいずれかであり、それらは各々、1個以上の特徴的なペプチドドメインを含む。そのようなドメインは1個以上の触媒ドメインを含むことができ、それらに限定されないが、チロシンキナーゼドメインが挙げられる。チロシンキナーゼ触媒ドメインの長さは、一般に、約250 ~ 約300アミノ酸の範囲であり、これは約30kDaの分子量に相当する。チロシンキナーゼ触媒ドメインの位置は、固定されていないが、一般に、タンパク質のカルボキシ末端付近である。チロシンキナーゼドメイン内に、短く、保存されたアミノ酸残基の範囲が存在してもよい。それは、高レベルの保存性を示さない、長さが可変のアミノ酸残基の範囲と順次交互に現れる。最も硬度に保存されたチロシンキナーゼ触媒ドメインアミノ酸残基に対応するコンセンサス配列が収集されており、当業者には周知である。例えば、Hanksら、(Hanksら、1991,Science 241:42 - 52) およびWilks (Wilks,A.F.,1990,Prog.Growth Factor Res.2:97 - 111) 参照(それらの全体を参考文献として本明細書に含める。)。該コンセンサス配列は、PTKに特異的な配列であるD - L - R - A - A - NまたはD - L - A - A - R - N、およびP - I/V - K / R - W - T/M - A - P - Eである。さらに、該配列モチーフの別の例として、Wilks,A.F., 1990,Progress in Growth Factor Res.2:97 - 111参照。

本発明のPTK/アダプタータンパク質複合体のPTK成分は、さらに、1個以上の非触媒ドメインを含むことができ、例えば、それらに限定されないが、1個以上のSH2および / または1個以上のSH3ドメイン、1個以上のSH2結合および / または1個以上のSH3結合ペプチドドメイン、および / または(受容体型PTKの場合)疎水性膜貫通ドメインが挙げられる。SH2(すなわち、srcホモロジー2)非触媒ドメインは、一般に、長さが約100アミノ酸残基である。そのようなSH2ドメインは、いくつかの、好ましくは5個の十分保存されたアミノ酸配列モチーフ内に、高度に保存された、または不変の多数のアミノ酸残基を含むことができ、それらは、当業者には周知である。例えば、Kochら、(Kochら、1991,Science 252:668 - 674)(その全体を参考文献として本明細書に含める。)参照。例えば、ア

10

20

30

40

50

ミノ酸コンセンサス配列としては、それらに限定されないが、F - L - I - R - E - S および F - L - V - R - E - S が挙げられる。これらのコンセンサス配列の R 残基は、SH2 ドメイン間で不変である。そのような十分保存されたアミノ酸配列モチーフは、可変であるけれども、一般には 1 個以上の G または P 残基を含む、より可変のアミノ酸配列要素の範囲によって分離される。

SH3 (すなわち、src ホモロジー 3) 非触媒ドメインは、一般に、長さが約 50 アミノ酸残基である。SH3 ドメイン内のアミノ酸配列は可変であってもよいが、そのドメインの三次元構造は十分保存される。そのような SH3 三次元構造は、当業者には周知である。例えば、Koyama ら、(Koyama ら、1993, Cell 72:945 - 952) (その全体を参考文献として本明細書に含める。) 参照。

SH2 - 結合ペプチドドメインは周知である。例えば、Songyang ら、(Songyang ら、1993, Cell 72:767 - 778)、Rotin ら、(Rotin ら、EMBO J. 11:559 - 567) および Skolnick ら、(Skolnick ら、1993, EMBO J. 12:1929 - 1936) (これらは、その全体を参考文献として本明細書に含める。) 参照。SH2 ドメインは、ある SH2 - 結合ドメインに対して特異性を示す。例えば、SH2 - 結合ペプチドドメインとしては、それらに限定されないが、ホスホ Tyr - 疎水性 - 疎水性 - Ile/Pro アミノ酸配列モチーフ (一般に、該配列モチーフは、例えば src、fyn、lck、fgr、abl、crk および nck タンパク質に見られる型の SH2 ドメインに対して好ましい。)、およびホスホ Tyr - 疎水性 - X - 疎水性 および / または - ホスホ Tyr - Met - X - Met (一般に、該配列モチーフは、例えば p85、ホスホリパーゼ C - γ および SHPTP2 タンパク質に見られる型の SH2 ドメインに対して好ましい。) が挙げられる。さらに、GRB - 2 タンパク質の SH2 ドメインを結合するいくつかのタンパク質のドメインの分析から明らかにされたコンセンサス配列は、X - P - X - Y - V/I - N - V/I であると決定された。さらに、SH2 - 結合ペプチドドメインは、Ser および Thr 残基 (それらのいくつかまたは全部はリン酸化されている) に富む領域を含むことができる (Pendergast ら、1991, Cell 66:161 - 171)。

SH3 - 結合ペプチドドメインもまた当業者に周知である。例えば、Ren ら (Ren ら、1993, Science 259:1157 - 1161) および Cicchetti ら (Cicchetti ら、1992, Science 257:803 - 806) を参照されたい。これらは、参照としてその全体をここに組み入れてある。そのような SH3 - 結合ペプチドドメインは、プロリン以外の他のアミノ酸残基もまた SH3 結合にとって重要ではあるが、一般にアミノ酸残基プロリンに富んでいる。SH3 - 結合ドメインの考える 1 つの共通配列は、X - P - X - X - P - P - P - 疎水性残基 - X - P である。さらに、GRB - 2 の SH3 ドメインは、SOS タンパク質に見いだされるアミノ酸配列モチーフである P - P - P - V - P - P - R - R であることが確定している (Li ら、1993, Nature 363:858 8; Schlessinger、1993, TIBS、18:273 - 275)。

本発明の PTK/アダプタータンパク質複合体の細胞内の細胞質 PTK 成分は、例えば、Src ファミリーのメンバー (src、yes、fgr、fyn、lyn、hck、lck および blk 等の分子); Fes ファミリーのメンバー (fes および fer 等); Abl ファミリーのメンバー (abl および arg 等); および Jak ファミリーのメンバー (jak1 および jak2 等) を含む。本発明の好ましい態様において、PTK/アダプタータンパク質複合体の PTK 成分は、BCR - ABL 遺伝子の細胞内 PTK 産物である。本発明の PTK/アダプタータンパク質複合体の膜貫通の受容体 PTK 成分は、例えば、増殖因子受容体の FGF 受容体、セブンレス (Sevenless) / ROS、インスリン受容体、PDGF 受容体、EGF 受容体ファミリーのメンバー等の分子、または he アダプタータンパク質に関連する他の任意の分子を含む (例えば、Lowenstein ら、1992, Cell 70:431 - 442 参照)。

本発明の PTK/アダプタータンパク質複合体のアダプタータンパク質成分は、1 つ以上の SH2 および / または 1 つ以上の SH3 非触媒ドメインを含む。アダプタータンパク質の一部でありうる SH2 および SH3 ドメインは、上記のように、PTK 成分のためのものである。本発明の PTK/アダプタータンパク質複合体の成分でありうるアダプタータンパク質は、例えば、p85、c - Crk、SHC、Nck、ISGF3 α 、グアニントリホスファターゼ活性化タンパク質 (GAP)、およびタンパク質の GRB サブファミリーのメンバー (GRB1、GRB - 2、GRB - 3、GRB - 4、GRB - 7 および GRB - 10 等) を含む。好ましい態様において、本発明の PTK/アダプタ

10

20

30

40

50

ータンパク質複合体はBCR - ABL遺伝子のPTK産物およびGRB - 2タンパク質を含む。

本発明の複合体および/または該複合体の個々の成分は、後述の第5.3.1.節に記載の方法を用いて実質的に精製することができる。さらに、本発明の複合体のPTKおよび/またはアダプター成分は、化学的合成または後述の第5.3.2.節に記載の組換えDNA技法を含むが、これらに限定されない種々の方法を用いて作成することができる。

5.2. プロテインチロシンホスファターゼ/アダプタータンパク質複合体

本発明のPTP/アダプタータンパク質複合体は、タンパク質のPTPファミリーの少なくとも1つのメンバーおよびタンパク質のアダプターファミリーの少なくとも1つのメンバーを含む。標準的な生理的条件のもとで、このような複合体の諸成分は一以上の他のPTP/アダプタータンパク質複合体成分との安定した、非共有結合を形成することが可能である。

本発明のPTP/アダプタータンパク質複合体のPTP成分は、細胞質、細胞内、非受容体PTP、または膜貫通、受容体型PTPであって、これらはそれぞれ1つ以上の特徴的なペプチドドメインを含む。そのようなドメインは、チロシンホスファターゼドメインを含むが、これらだけに限定されない1つ以上の触媒ドメインを含みうる。一般に、チロシンホスファターゼ触媒ドメインは長さが約230アミノ酸である。触媒ホスファターゼドメインのアミノ酸残基の約40は高度に保存されており、そしてこれらのうちには、共通配列I/V - H - C - X - A - G - X - X - R - S/T - Gを有する11アミノ酸残基からなる非常に高度に保存されている分節が一般に存在する。非受容体PTPは一般にそのような触媒ドメインを1個含有し、他方、膜貫通受容体PTPは長さ約58アミノ酸残基のペプチド分節によって分けられているそのような触媒ドメイン2個を一般に含有している。

本発明のPTP/アダプタータンパク質複合体のPTP成分は、さらに、1つ以上のSH2ドメイン、1つ以上のSH3ドメイン、1つ以上のSH2 - 結合ドメイン、および/または1つ以上のSH3 - 結合ドメインを含むがこれらだけに限定されない、1つ以上の非触媒ドメインを含みうる。これら非触媒ドメインのそれぞれは、第5.2.節に記載のものでありうる。

本発明のPTP/アダプタータンパク質複合体の膜貫通の受容体PTP成分は、例えば、CD45、LAR、RPTP α 、RPTP β 、RPTP χ およびRPTP κ を含みうる。本発明のPTP/アダプタータンパク質複合体の細胞内の細胞質PTP成分は、例えばPTP1C、PTP1Dおよびコルクスクリュー (corkscrew) を含みうる。

5.3. PTK/アダプター複合体およびPTP/アダプター複合体の精製ならびに作製

5.3.1. 精製法

本発明のPTK/アダプター複合体およびPTP/アダプター複合体を実質的に精製する、すなわち、それが関連する他のタンパク質、糖タンパク質、および他の巨大分子から少なくとも90% (重量に基づいて)、そして所望であれば少なくとも99%精製することができる。そのような精製は、当業者に周知の種々の手順を用いて達成することが可能である。例えば、PTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体を含有する細胞、組織または流体を標準的方法の組合せ (例えば、硫酸アンモニウム沈殿法、分子ふるいクロマトグラフィー、および/またはイオン交換クロマトグラフィー) に付す、等である。別な方法として、もしくはそれらに加えて、PTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体の1つ以上の成分と結合可能な抗体を固定化した免疫吸着カラムを使用したイムノアフィニティークロマトグラフィーによって、PTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体を精製することができる。そのような抗体は、起源がモノクローナルであっても、ポリクローナルであってもよい。PTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体のための他の有用な種類のアフィニティークロマトグラフィーは、例えば、触媒ドメイン (すなわち、PTKのキナーゼドメインまたはPTPのホスファターゼドメイン) に結合する固相基質、または複合体を分断しないような様式で結合する複合体のPTK、PTPおよび/またはアダプター成分の非触媒ドメインの固定化結合部位を利用しうる。

本発明のPTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体は、種々の細胞または組織の供給源より生化学的に精製することができる。天然に存在するPTK/アダプター複合体を精製するためには、細胞の供給源は、例えばバキュロウイルス感染SF9細胞、A - 431、CHOおよび/または3T3細胞を含みうる。本発明の好ましい態様において、PTK/アダプター複

合体はBCR - ABL PTKおよびGRB2タンパク質を含む。このようなPTK/GRB - 2 複合体の精製のための供給源は、K562、NMG - 01およびALL - 1 細胞系を含みうるが、これらに限定されない。

5.3.2. 合成法

本発明のPTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体の成分として作用しうるポリペプチドまたはその断片の合成法は、当業者に周知である。例えば、参照としてここに全体を組み入れるCreighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman and Co., NYを参照されたい。別々に合成された、または組換えによって作製されたPTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体の成分を、当業者に周知の標準的生化学技法により再構成して、複合体を形成することができる。例えば、PTK/アダプター複合体の諸成分を含有する複数のサンプルを、約150mM以上のNaClを用いて緩衝化した溶液中で、7の範囲内の生理的pHで、室温で組み合わせることができる。例えば、20mM Tris - HCl、pH7.4、137mM NaCl、10%グリセリン、1 % Triton X - 100、0.1% SDS、0.5% デオキシコール酸および2mM EDTAを含む緩衝液が使用可能であろう。このような手順は、PTP/アダプター複合体の再構成にも使用できる。

PTK、PTPおよび/またはアダプタータンパク質をコードする核酸を発現させることによる、本発明のPTK/アダプター複合体の成分の調製方法は本明細書に記述されている。当業者に周知の方法を用いて、PTK、PTPおよび/またはアダプタータンパク質のコード配列および適切な転写 / 翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、例えば、in vitro組換えDNA技法、合成技法およびin vivo組換え / 遺伝子組換えを含む。DNAおよびRNAの合成は、さらに自動合成機を用いて行なうこともできる。例えば、Maniatisら, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. および Ausubelら, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates および Wiley Interscience N.Y. に記載の技法を参照されたい。

本発明のPTK/アダプター、PTP/アダプター複合体の成分のコード配列を発現させるため、種々の宿主 - 発現ベクター系が使用できる。これらの系は以下のものを含むがそれらだけに限定されない。すなわち、PTK、PTPまたはアダプタータンパク質のコード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターによって形質転換された細菌（例、大腸菌、枯草菌）等の微生物；PTK、PTPおよび/またはアダプタータンパク質のコード配列を含有する組換え酵母発現ベクターによって形質転換された酵母〔例、サッカロミセス（*Saccharomyces*）、ピヒア（*Pichia*）〕；PTK、PTPおよび/またはアダプタータンパク質のコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；PTK、PTPおよび/またはアダプタータンパク質のコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）に感染させた、または、組換えプラスミド発現ベクター（例、Tiプラスミド）によって形質転換させた植物細胞系；または、哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系である。

細菌系においては、PTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体発現の意図された使用によって、多数の発現ベクターが有利に選択できる。例えば、抗体作製のため、またはペプチドライブラリーのスクリーニングのため、大量のPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体を生産する場合は、容易に精製できる融合タンパク質産物の高レベルな発現を引き出すベクターが望ましい。そのようなベクターには以下のものが含まれるが、それらだけに限定されない。すなわち、融合タンパク質が産生されるように、PTK、PTPおよび/またはアダプタータンパク質のコード配列がlac Zコード領域の枠に合わせて個々にベクターに連結されうる大腸菌発現ベクターpUR278（Rutherら, 1983, *EMBO J.* 2:1791）；pINベクター（Inouyeら, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101 - 3109；Van Heekeら, 1989, *J. Biol. Chem.* 264:5503 - 5509）等である。pGEXベクターもまた、外来ポリペプチドをグルタチオンS - トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現させるために使用でき

10

20

30

40

50

る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性で、グルタチオン - アガロースビーズに吸着させ、次に遊離のグルタチオンの存在下で溶出させることにより、溶解した細胞から容易に精製できる。pGEXベクターは、クローン化PTKおよび/またはアダプタータンパク質がGST部分から解放されうるように、トロンピンまたは因子Xaプロテアーゼ開裂部位を含むように設計されている。

昆虫系においては、オートグラフ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) が、外来遺伝子を発現するベクターとして使用される。このウイルスは、スポドプラテ・フルジペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞中で増殖する。PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の成分のコード配列を、このウイルスの非必須領域〔例えば、ポリヒドリン (polyhedrin) 遺伝子〕に個別にクローン化し、そしてAcNPVプロモーター (例えば、ポリヒドリンプロモーター) の制御下に置くことができる。コード配列の上首尾な挿入は、ポリヒドリン遺伝子の不活性化および非閉鎖組換えウイルス (すなわち、ポリヒドリン遺伝子によってコードされるタンパク質外被を欠くウイルス) の産生をもたらす。次に、これらの組換えウイルスを用いて、挿入遺伝子が発現されているスポドプラテ・フルジペルダ細胞を感染させる (例えば、Smithら, 1983, J. Virol. 46:584; Smith, 米国特許第4,215,051号参照)。

哺乳動物宿主細胞においては、ウイルスに基づく多数の発現系が使用できる。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合は、PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の成分のコード配列を、アデノウイルス転写/翻訳調節複合体、例えば後期プロモーターおよび三部分リーダー配列、に連結することができる。次に、このキメラ遺伝子を *in vitro* または *in vivo* 組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、領域E1またはE3) への挿入は、生存可能で、かつ感染宿主中でPTK、PTPおよび/またはアダプタータンパク質を発現可能な組換えウイルスをもたらす (例えば、Loganら, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:3655 - 3659参照)。挿入されたPTK、PTPおよび/またはアダプターコード配列の効率的な翻訳のためには、特異的開始シグナルもまた必要とされる。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接配列を含む。自身の開始コドンおよび隣接配列を含む完全なPTK、PTPまたはアダプタータンパク質遺伝子が適切な発現ベクターに挿入される場合は、付加的翻訳制御シグナルは何ら必要ではない。しかし、PTK、PTPまたはアダプターコード配列の一部分のみが挿入される場合は、ATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルを備えていなければならない。さらに、全挿入配列の翻訳を確実にするために、開始コドンは所望のコード配列の読み枠と一致していなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の種々の起源のものでありうる。適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター、等を含めることにより、発現の効率を増大させることができる (Bittnerら, 1987, Methods in Enzymol. 153:516 - 544参照)。

さらに、所望の特定の様式で挿入配列の発現をモジュレートする、または遺伝子産物を修飾およびプロセスする、宿主細胞株を選択することができる。遺伝子産物のそのような修飾 (例えばグリコシル化) およびプロセッシング (例えば開裂) は、タンパク質の機能にとって重要でありうる。異なる宿主細胞は、タンパク質の転写後プロセッシングおよび修飾のための特徴的で、かつ特異的な作用機構を有する。発現された外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために、適切な細胞系または宿主系を選択することができる。この目的のため、適切な一次転写産物のプロセッシング、グリコシル化、および遺伝子産物のリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞が使用できる。そのような哺乳動物宿主細胞は、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3 WI38、等を含むが、これらだけに限定されない。組換えタンパク質の長期間の高収量生産のためには、安定した発現が好ましい。例えば、PTKおよびアダプタータンパク質、またはPTPおよびアダプタータンパク質の両方を安定的に同時発現する細胞系を遺伝子工学的に作出することができる。ウイルス複製起点を含有する発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現制御要素 (例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、等) によってそれぞれ独立して、または整合的に制御されている、PTKおよびアダプ

10

20

30

40

50

タータンパク質DNA、またはPTPおよびアダプタータンパク質DNAならびに選択マーカーを用いて宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAの導入後、遺伝子工学的に作出した細胞を富化培地で1～2日間増殖させることができる。そして次にこれらの細胞を選択培地に移す。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、そして細胞を安定的にプラスミドを染色体中に組み入れ、増殖してフォーカスを形成することを可能とする。次に、これらのフォーカスをクローン化し、細胞系に発展させることが可能である。この方法は、PTKおよびアダプタータンパク質、またはPTPおよびアダプタータンパク質の両方を同時発現する細胞系を遺伝子工学的に作出するのに有利に使用できる。このような遺伝子工学的に作出された細胞系は、本発明の複合体によって媒介されるシグナルに影響を与える化合物のスクリーニングおよび評価に特に有用である。

以下のものを含むが、それらだけに限定されない多数の選択系が使用できる。すなわち、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら, 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスフォリボシルトランスフェラーゼ (Szybalskaら, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48:2026) およびアデニンホスフォリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら, 1980, Cell 22:817) 遺伝子が、それぞれtk-、hgrt-、またはaprt-細胞に使用できる。また、代謝拮抗物質耐性も、メトトレキサートへの耐性を付与するdhfr遺伝子 (Wiglerら, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hareら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1527); ミコフェノール酸 (mycophenolic acid) への耐性を付与するgpt遺伝子 (Mulliganら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2072); アミノグリコシドG-418への耐性を付与するneo遺伝子 (Colberre-Garapinら, 1981, J. Mol. Biol. 150:1); およびハイグロマイシンへの耐性を付与するhygro遺伝子 (Santerreら, 1984, Gene 30:147) の選択の基礎として使用できる。

本発明の複合体を形成することのできる、PTK、PTPおよび/またはアダプタータンパク質ファミリーの新規なメンバーは、当技術分野で周知の分子生物学的技法によって同定および単離することが可能である。例えば、PTK、PTPまたはアダプタータンパク質ファミリーのメンバーに共通なドメイン内にある高度に保存された配列に基づいて設計した2つの縮重したオリゴヌクレオチドプライマープールを用いてポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) を実施することにより、以前には知られていなかったPTK、PTPまたはアダプタータンパク質の遺伝子を単離することができる。PCR反応の鋳型は、PTK/アダプター複合体および/またはPTP/アダプター複合体を発現することが知られている細胞系または組織より調製したmRNAの逆転写によって得たcDNAであってよい。増幅された配列がPTK、PTPまたはアダプターサブファミリーのメンバーの配列を表していることを確実にするため、PCR産物をサブクローン化し、配列決定することができる。次に、PCR断片を使用して、増幅された断片を放射標識し、バクテリオファージcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、全長PTK、PTPまたはアダプタータンパク質cDNAクローンを単離することができる。または、標識化断片を用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることができる。使用できるクローニング戦略の総論については、例えば、Maniatisら, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press, N.Y.; およびAusubelら, 1989, Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing AssociatesおよびWiley Interscience, N.Y.) を参照されたい。

それまで未知であったアダプタータンパク質をクローン化する一般的な方法は、Skolnick (Skolnick, E.Y., 1991, Cell 65:75) およびSkolnickら (米国特許出願第07/643,237号) によって記述されている。これらは、参照として全体をここに組み入れてある。簡単に述べると、タンパク質のアダプターファミリーの新しいメンバーは、アダプター-タンパク質-結合領域を含むチロシンリン酸化ペプチドの少なくとも一部分に特異的に結合する能力によって同定することができる。そのような領域は、SH2-結合ドメインを含みうるが、これだけに限定されない。

5.4. PTK/アダプター複合体およびPTP/アダプター複合体の誘導体

本明細書にはまた、PTK/アダプター複合体およびPTP/アダプター複合体の機能性誘導体が提供される。「機能性誘導体」という用語は、PTK/アダプター複合体およびPTP/アダプタ

10

20

30

40

50

一複合体の「化学的誘導体」、「断片」、「変異体」、「キメラ」または「ハイブリッド」を意味する。これらの用語は以下に定義される。機能性誘導体は、その誘導体に本発明による有用性を与える、PTK、PTPまたはアダプタータンパク質の機能の少なくとも一部を保持する。この機能とは、例えば、PTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体に特異的な抗体との反応性、非触媒ドメインによって媒介されるPTKまたはPTPの酵素活性または結合活性、等である。

PTK/アダプター複合体またはPTP/アダプター複合体の「化学的誘導体」は、通常は該タンパク質の一部ではない付加的化学部分を含有する。上記タンパク質複合体またはペプチドの共有結合修飾は、本発明の範囲に含まれる。ペプチドの標的アミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と下記のように反応することができる有機誘導体化剤と反応させることにより、そのような修飾を分子に導入することができる。

10

最も一般的には、システイニル残基をクロロ酢酸またはクロロアセトアミド等の α -ハロアセテート（および対応するアミン）と反応させ、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生じさせる。システイニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 α -プロモ- β （5-イミダゾイル）プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロメルクリベンゾエート、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応により誘導体化される。

ヒスチジル残基は、pH5.5~7.0でジエチルプロカーボネートとの反応により誘導体化される。なぜなら、この作用物質はヒスチジル側鎖に比較的特異的だからである。パラ-ブロモフェナシルブロマイド（para-bromophenacyl bromide）もまた有用である。その反応は、好ましくは0.1Mカコジル酸ナトリウム中で、pH6.0で実施される。

20

リシニルおよびアミノ末端残基は、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの作用物質を用いた誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆にする効果を有する。 α -アミノ-含有残基を誘導体化するのに適する他の試薬は、メチルピコリニミデート等のイミドエステル；ピリドキサルホスフェート；ピリドキサル；クロロポロヒドリド；トリニトロベンゼンスルホン酸；0-メチルイソ尿素；2,4-ペンタンジオン；およびトランスアミナーゼによって触媒されるグリオキシル酸との反応を含む。

アルギニル残基は、1種、または数種の通常の試薬との反応によって修飾される。それらの試薬には、フェニルグリオキサル、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオンおよびニンヒドリンが含まれる。アルギニン残基の誘導体は、グアニジン官能基の高い pK_a のため、反応をアルカリ性状態で実施することが必要である。さらに、これらの試薬はアルギニンの ϵ -アミノ基はもとよりリシンの基とも反応しうる。

30

チロシル残基は、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によりスペクトル標識を導入するための修飾の、周知の標的である。最も一般的には、N-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを用いて、O-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体をそれぞれ形成する。

カルボキシル側の基（アスパルチルまたはグルタミル）は、1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリニル（4-エチル）カルボジイミドまたは1-エチル-3-（4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル）カルボジイミド等のカルボジイミド（ $R'-N-C-N-R'$ ）との反応により選択的に修飾される。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によりアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換される。グルタミニルおよびアスパラギニル残基は頻繁に脱アミド化されて、対応するグルタミルおよびアスパルチル残基になる。あるいは、これらの残基は弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のどちらの形態も、本発明の範囲内に入る。

40

二官能作用物質を用いた誘導体化は、例えば、PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の成分ペプチドを相互に架橋させるのに、またはPTK/アダプター受容体複合体を水に不溶性の支持マトリックスあるいは他の巨大分子キャリアーに架橋させるのに有用である。一般に用いられる架橋剤は、例えば、1,1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタ

50

ン、グルタルアルデヒド、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むN-ヒドロキシスクシンアミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸を有するエステル、ホモ二官能イミドエステル、ならびにビス-N-マレイミド-1、8-オクタン等の二官能マレイミドを含む。メチル-3-(p-アジドフェニル)ジチオールプロピオイミデート等の誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化可能な中間をもたらす。または、臭化シアン活性化炭水化物等の反応性で水に不溶性なマトリックス、および米国特許第3,969,287号;3,691,016号;4,195,128号;4,247,642号;4,229,537号;および4,330,440号に記載の反応性基質がタンパク質固定化のために使用される。

上記以外の修飾は、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基の水酸基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化(Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79 - 86 (1983))、N-末端アミンのアセチル化、および、ある場合にはC-末端カルボキシル基のアミド化を含む。

そのように誘導体化された部分は、安定性、溶解性、吸収、生物学的半減期、等を改善することができる。または、これらの部分はタンパク質複合体等の望ましくない副作用を除去または軽減することができる。そのような効果を媒介可能な部分は、例えば、Remington 著の *Pharmaceutical Sciences*, 1990, 18版, Mack Publishing Co., Easton, PAに開示されている。

「断片」という用語は、PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体のPTK、PTPまたはアダプタータンパク質のアミノ酸配列から得られるポリペプチドであって、それが由来する全長ポリペプチドよりも長さの短いポリペプチドを示すのに使われている。そのような断片は、例えば、全長タンパク質のタンパク質加水分解開裂によって作成することができる。好ましくは、この断片はPTK、PTPまたはアダプタータンパク質をコードするDNA配列を適切に修飾して1個以上のアミノ酸をC-末端、N-末端、および/または天然の配列内で1つ以上の部位において欠失させることにより、組換えによって得られる。天然に存在するPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体に似た複合体中に存在する場合、PTK、PTPまたはアダプタータンパク質の断片は、下記のようにシグナル伝達をモジュレートするように作用する化合物をスクリーニングするのに有用である。そのような断片は、複合体中に存在する場合、天然のPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の特徴的部分を1つ以上保持することができる」と理解される。このように保持される特徴の例は、触媒活性; 基質特異性; 完全な細胞内におけるたの分子との相互作用; 調節機能; または天然のPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体に特異的な抗体、またはその抗原決定基との結合を含む。

本発明の範囲内に含まれる別の機能性誘導体は、天然のポリペプチドに関して1またはそれ以上のアミノ酸が欠けているか、付加されているか、または置換されている、少なくとも1つの「変異型」ポリペプチド(例えば、PTK、PTP、またはアダプター)を含むPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体である。変異型は、C末端、N末端、および/または天然の配列の内部の1以上の部位で、1以上のアミノ酸のコドンが付加、除去、および/または修飾するために、PTK、PTP、および/またはアダプタータンパク質DNAコード配列を適当に修飾することによって、天然に存在しているPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体成分に由来するものであってもよい。付加されたアミノ酸、置換されたアミノ酸および/または追加のアミノ酸を有するこのような変異型は、上記の天然のPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の1以上の特徴をあらわしている部分を保持していると理解される。

アミノ酸残基の欠失、挿入、および/または置換を有するPTK、PTP、および/またはアダプタータンパク質を含むPTK/アダプターまたはPTP/アダプターの複合体の機能性誘導体は、当業者に公知の標準的な技術を用いて調製することができる。例えば、機能性誘導体の修飾された成分は、部位特異的突然変異技術を用いて産生してもよく(Adelman et al., 1983, DNA 2:183で例示されているように)、DNAコーディング配列中のヌクレオチドは修飾

10

20

30

40

50

されたコーディング配列が修飾されるように修飾され、その後この組換えDNAを、上述のような技術を用いて、宿主である原核細胞または真核細胞中で発現させる。代替として、欠失、挿入および/または置換を有するPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の機能性誘導体の成分は、当業者に公知の方法を用いて、直接的に化学合成することによって、簡便に調製してもよい。PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の機能性誘導体は、典型的には、天然の複合体と同質の生物学的活性を示す。

5.5 PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体に対する抗体

本発明は、さらに、PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体またはそれらのエピトープを特異的に認識する抗体、またはPTK、PTP、またはアダプター成分がPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体と離れて個別に存在しているときは抗体によって認識されないはずである複合体のPTK、PTP、またはアダプター成分のいずれかのエピトープを特異的に認識する抗体に関する。このような抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (mAbs)、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、FAB発現ライブラリーで産生される断片、抗イディオタイプ (抗-Id) 抗体、および上記いずれかのエピトープ結合性断片を含むが、これらに限定されない。このような抗体は、例えば、生体試料中のPTK/アダプター複合体の検出に使用してもよく、または、代替として、PTK/アダプター複合体形成の阻害のための方法として使用してもよく、こうして細胞増殖障害の進行を阻害する。

ポリクローナル抗体は、PTK/アダプター複合体、またはそれらの抗原性のある機能性誘導体などの抗原で免疫された動物の血清に由来する抗体分子の均一でない集団である。ポリクローナル抗体の産生のために、種々の宿主動物がPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の注射によって免疫され、これらの動物は、ウサギ、マウス、ラット等が含まれるが、これらに限定されるものではない。宿主の種に応じて、免疫応答を増強するために、種々のアジュバントが使用され、フロイントのアジュバント (完全、不完全)、リゾレシチンなどの鉱物ゲル、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンベットヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびBCG (bacille Calmette - Guerin) などの潜在的に有用なヒトアジュバントおよびコリネバクテリウム

パルバム (Corynebacterium parvum) 等を含むが、これらに限定されるものではない。モノクローナル抗体は、特定の抗原に対する抗体の実質的に均一な集団であり、細胞株の連続的培養によって抗体分子を産生するいかなる方法によっても得ることができる。これらは、Kohlerらのハイブリドーマ技術 (Kohler et al., Nature 256:495 - 497 (1975) および米国特許番号4,376,110)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kosher et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026 - 2030)、およびEBV - ハイブリドーマ技術 (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan, R. Liss., Inc. pp 77 - 96) を含むが、これらに限定されるものではない。こうした抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそれらのサブクラスをも含んでもよい。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitro、in vivoのいずれで培養してもよい。in vivoでの高力価のmAbsの産生は、これを目下好適な産生方法にする。

加えて、適当な抗原特異性を有するマウス抗体分子からの遺伝子と適当な生物学的活性を有するヒト抗体からの遺伝子とをいっしょにスプライスすることによる「キメラ抗体」の産生のために開発された方法 (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851 - 6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604 - 608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452 - 454) を用いることができる。キメラ抗体は、例えばマウスのmAbsに由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有するような、異なる動物種に由来する異なる部分を含む分子である。

代替として、一本鎖抗体の産生のために記載された方法 (米国特許4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423 - 426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879 - 5883; およびWard et al., 1989, Nature 334:544 - 546) をPTK/アダプター複合体特異的一本鎖抗体またはPTP/アダプター複合体特異的一本鎖抗体の産生に適用することができる。一本鎖抗体は、アミノ酸結合を介するFv領域の重鎖および軽鎖断片をつなぐことによって形成され

10

20

30

40

50

、一本鎖ポリペプチドを生じる。

PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の特異的結合部位を含む抗体断片を、既知の方法で形成させてもよい。例えば、下記の断片が含まれるが、これらに限定されるものではない：抗体分子のペプシン消化によって産生され得る $F(ab')_2$ 断片、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド結合を還元することによって生じ得るFab断片。代替として、Fab発現ライブラリーは、PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体に対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の速やかで簡便な同定を可能にするために構築してもよい (Hus et al., 1989, Science 246:1275 - 1281)。

5.6 PTK/アダプタータンパク質およびPTP/アダプタータンパク質関連細胞増殖障害

本発明は、最初に、アダプタータンパク質のSH2 - および / またはSH3 - ドメインを含むファミリーのメンバーの結合が発がんおよびトランスフォーメーションの過程において必須のステップであることを証明する。より詳細には、以下の6～12節における実施例で示されたデータは、アダプタータンパク質のGRBサブファミリーのGRB2のメンバーのヒトBCR - ABL遺伝子の細胞内PTK産物への結合を詳述する。

この節においては、このようなPTKおよびアダプタータンパク質および / またはPTPおよびアダプタータンパク質の結合がこのような複合体を包含する細胞の増殖障害の治療のために使用され得る様々な使用のいくつかが記載されている。ここで記載された使用は、こうした複合体を破壊する (すなわち、複合体におけるPTKまたはPTPの成分とアダプターメンバーとの間の相互作用を減少させるか、または阻害する) ことができる薬剤、およびアダプタータンパク質のSH2 - および / またはSH3 - を含むファミリーのメンバーと複合体を形成することができるPTKおよびPTPを含む細胞増殖障害の治療のためのこうした化合物の利用に焦点が絞られているが、これらに限定されるものではない。ここで使用されている「破壊する」という用語は、こうした複合体が、物理的に形成可能のままに残存するか否かにかかわらず、タンパク質複合体成分の物理的な解離のみならず、複合体の活性の攪乱をも意味する。ここで使用されている「活性」は、このような複合体が形成される細胞中のシグナル伝達カスケードにおけるタンパク質複合体の機能を意味し、すなわち、細胞中への細胞外のシグナルの伝達を効率的にするか阻害することにおける複合体の機能を意味する。このような細胞増殖障害の例は、例えば、乾せんやアテローム硬化のみならず、慢性骨髄性白血病および急性リンパ性白血病などのガン性障害を含むが、これらに限定されるものではない。本発明の複合体はまた、こうした細胞の活性化、分化、および生存といった細胞過程においても含まれる。

個々のPTK/アダプタータンパク質複合体またはPTP/アダプタータンパク質複合体に依存しつつ、このような複合体の成分メンバー間の相互作用を破壊することは、包含されるシグナルの伝達イベント上における異なるモジュレート効果を有するかもしれない、すなわち、複合体破壊の該効果により、細胞内に正常に伝達されるシグナルを活性化するか、減少させるか、ブロックするかもしれない。細胞増殖障害に依存するのと同様に、細胞へ正常に導入されるシグナルの活性化、還元、またはブロックは、障害の治療のために望ましい。例えば、BCR - ABL PTKとGRB - 2 アダプタータンパク質の複合体形成の1つの効果は、Rasシグナリング経路の活性化をひき起こすことである (下記8節の実施例を参照せよ)。こうして、BCR - ABL PTK/GRB - 2 アダプタータンパク質複合体の破壊は、異常なシグナルの伝達を阻害し、Ras経路の活性化を妨げる。代替として、例えば、PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体を含む細胞増殖障害は、こうした複合体が正常なシグナル伝達イベントの異常型の阻害を引き起こすために、進行するかもしれない。こうした場合、複合体の破壊は、通常のシグナル伝達イベントを回復させるはずである。さらに、異常型の複合体は、変更されたサブ細胞アダプタータンパク質の局在化を引き起こす可能性があり、このことは、アダプタータンパク質のGRBサブファミリーのGRB - 2 メンバーの場合にあったように、例えば、細胞骨格の再構成といった機能不全性細胞イベントを生じさせる可能性がある。この場合にPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の阻害は、正常な細胞の構造を回復させるはずである。さらにまた、PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の破壊の原因となる1つまたは複数の薬剤は、このような複合体の他の強力な成分の間の

10

20

30

40

50

相互作用の破壊を引き起こすかもしれない。こうした成分は、SOSタンパク質を含むが、これらに限定されるものではない。

複合体のPTKまたはPTP成分が膜貫通であって、受容体型PTKまたはPTP分子であるPTK/アダプタータンパク質複合体およびPTP/アダプタータンパク質複合体を考える場合、該受容体またはそれらのリガンドを、細胞の増殖障害の進行を導くシグナル伝達イベントをモジュレートするために、直接使用してもよい。例えば、PTK、可溶性PTK、細胞外PTKドメインを示すペプチド、またはリガンドに結合することが知られている細胞外PTKドメインの部分を示すペプチドは、有用なリガンドに対して内因性膜貫通PTK受容体分子と競合的に作用することのできる目的のPTK発現細胞に暴露されるとき、当業者に公知の方法を用いて投与してもよく、こうして、内因性PTKへのリガンドの結合を低下させるか、阻害する。10
このような操作の結果、PTK分子のためのアダプタータンパク質の親和性を順番に低下させることができるPTKの自己リン酸化をできる限り阻害することによって、PTKとアダプタータンパク質との間の相互作用の低下または阻害を生じさせることができるはずである。同様な状況は、PTPの場合でも保持される。

加えて、受容体型PTKを考えるときは、そのようなPTKに結合することができる細胞外分子であって、PTKへの結合により活性化しない該分子を当業者に公知の方法を用いて投与してもよい。この型の細胞外分子は、例えば、受容体結合は未だ生じていてもよいが、キナーゼの活性化が生じていないといった、目的のPTKのための天然のリガンドの修飾された形態を含んでもよい。このような設計の分子は、可溶性PTKの投与と同様に作用するはずであり、これらの手順はPTK/アダプタータンパク質複合体形成の低下または阻害という最終的効果を有するはずである。再び、同様の状況はPTPの場合においても生じる。20

さらにまた、本発明のPTK/アダプター複合体の受容体PTKまたはPTP/アダプター複合体の受容体PTPの天然リガンドに結合できる分子を、当業者の公知の方法を用いて投与してもよい。このクラスの分子は、リガンドの対応する受容体への結合能を阻害するために作用するはずであり、こうしてPTK/アダプターまたはPTP/アダプタータンパク質複合体の形成を低下させるか阻害する最終効果を有するはずである。

治療される特別の条件に応じて、このような薬剤は製剤化され、全身的にまたは局所的に投与される。製剤化および投与の方法は、"Remington's Pharmaceutical Science", 1990, 18版、Mack Publishing Co., Easton, PAに中に見出される。好適な経路は、経口、直腸内、口内粘膜、または小腸内投与を含む；非経口的投与は、2、3の例を挙げれば、硬膜下、直接心室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注射と同様に、筋肉内、皮下、骨髓内注射を含む。投与のためには、薬剤を水溶液中、好ましくは、ハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理食塩水緩衝液等の生理学的に交換可能な緩衝液中で製剤化する。口内粘膜投与のためには、透過すべきバリエーションに適合した浸透剤を製剤中に使用する。このような浸透剤は、一般的に当業者に公知である。30

本発明のPTK/アダプター複合体および/またはPTP/アダプター複合体の形成を直接的に妨害するように細胞内で働く薬剤を、細胞の増殖障害の治療のために使用してもよい。このような薬剤は、SH2及び/又は、SH3ドメイン、又はSH2に結合するドメインおよび/またはSH3に結合するドメイン、小さな有機分子、または複合体成分と競合的に作用して結合し、複合体形成を減少させるか阻害するように作用するはずである天然物の抽出物を含む40
がこれらに限定されるものではなく、これらもまた、目的の細胞増殖障害の進行を低下させるか阻害するはずである。SH2ペプチドドメインおよびSH3ペプチドドメイン、およびSH2に結合するペプチドドメインおよびSH3に結合するペプチドドメインは、上述したように、第5.1節に記載されている。このような薬剤はまた、複合体形成の代わりにまたは複合体形成に加えて下流のシグナリング能を妨害することによって複合体を破壊する。

細胞内に投与しようとする薬剤は、当業者に公知の方法で投与してもよい。例えば、このような薬剤は、リポソーム中に封入されてもよく、その後上述のように投与されてもよい。リポソームは、内部に水溶液を有する球状の脂質二重層である。リポソームが形成されたときに水溶液中に存在するすべての分子は、内部の水溶液中に取り込まれる。リポソームに含まれるものは外部の小環境から保護され、そしてリポソームが細胞膜と融合するた50

めに効率的に細胞の細胞質内に輸送される。加えて、小さな有機分子は疎水性であるため、それらは直接に細胞内に投与してもよい。

細胞内で利用されるペプチド物質をコードするヌクレオチド配列は、当業者に公知の方法を用いて、対象の細胞中で発現されてもよい。例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシ乳頭種ウイルス等のウイルスに由来する発現ベクターを標的とする細胞集団に輸送し、これらの細胞中でこのようなヌクレオチド配列を発現させるために使用してもよい。このようなベクターの構築法は公知である。例えば、Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. および Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. を参照せよ

10

あるいは、PTK/アダプターおよび/またはPTP/アダプター複合体形成を妨害し得る抗体を、アダプタータンパク質との複合体を形成し得るPTKまたはPTPを包含する細胞増殖障害の治療のために投与してもよい。例えば、リガンドの受容体型PTKsまたはPTPsへの結合を妨害することができる中和抗体を、上述したような技術を用いて投与してもよい。このような投与の効果は、可溶性PTKsまたはPTPsの投与にとっては、上述した効果と同様である。加えて、細胞内のエピトープに結合してPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体形成を破壊する効果を有する中和抗体を投与してもよい。このような抗体は、例えば、細胞内で作用する薬剤の投与のために上記の技術を利用して、投与してもよい。あるいは、一本鎖抗体をコーディングするヌクレオチド配列は、標的となる細胞集団の中で、例えば、Ma

20

rascoらに記載された方法を用いて発現させてもよい (Marasco et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889 - 7893)。本発明のPTK/アダプター複合体および/またはPTP/アダプター複合体は、こうした複合体の構成メンバーの活性を破壊するように作用し得る付加的な分子をスクリーニングするために使用してもよく、かくしてこのような複合体の効果などの該シグナル伝達イベントをモジュレートすることができるかもしれない。このような化合物は、D - および/またはL - 配置のアミノ酸からなるペプチド (例えば、ランダムペプチドライブラリの形態で; Lam, et al., 1991, Nature 354:82 - 84を参照せよ)、ホスホペプチド (phosphopeptide, 例えば、ランダムまたは一部縮重、ホスホペプチド指向性ライブラリ形態で, Songyang et al., 1993, Cell 767 - 778を参照せよ)、抗体、および小さな有機分子を含むが、これらに

30

限定されるものではない。例えば、PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体の個々の成分、または個々の成分の官能基部分に結合する (そしてさらに複合体形成を破壊することができるかもしれない) 化合物を同定してもよい。複合体の個別の官能性部分は、ここで、複合体の別のメンバーと尚も安定な複合体を形成できる個別の複合体成分のペプチド部分として定義されてもよい。例えば、PTKのSH2に結合するドメインのペプチド部分は尚もアダプタータンパク質のSH2ドメインに安定して結合することができ、こうしてアダプタータンパク質のSH2ドメインと複合体を尚も形成する。さらに、本発明のPTKまたはPTP成分が触媒ドメインである場合には、触媒ドメインの官能性部分は、未だに基質分子に安定して結合できるペプチドとしてもよい。

40

このようなPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体成分に結合する分子の単離に実行されるこのアプローチを有用する1つの方法は、成分分子またはそれらの官能基部分の、アガロース、プラスチックビーズ、マイクロタイターウェル、シャーレ、または、例えば、ナイロンやニトロセルロースからなる膜などの固相支持体への接着、ついで1種類の強力な成分に結合する化合物または複数の化合物の存在下における、接着した成分分子のインキュベーションを含むはずである。インキュベーションの後、未結合の化合物を洗い流し、成分に結合した化合物を回収する。この手順を使用することにより、多数の型の分子をPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体成分に結合する活性のために同時にスクリーニングしてもよい。

上記のスクリーニング方法で利用されてもよいPTK/アダプター複合体成分は、PTK分子又

50

はそれらの官能基部分、例えばPTK触媒ドメイン、リン酸化ドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、SH2に結合するドメイン、又はSH3に結合するドメイン、およびアダプタータンパク質、またはそれらの官能基部分、例えばSH2ドメインおよびSH3ドメインを含んでもよく、特に限定されない。使用されるペプチドは、リン酸化されていてもいなくてもよく、リン酸化されている場合には、少なくとも1つのアミノ酸残基、好ましくはリン酸化されたTyrを含む。リン酸ドメインは、あるアミノ酸残基が特異的にリン酸化されたペプチド領域として定義してもよい。このようなリン酸ドメインの官能性部分は、特異的PTKによってあるアミノ酸が特異的にリン酸化されたペプチドとして定義してもよい。SH2ドメインの官能性部分は、SH2に結合するドメインに特異的に結合することができるSH2ドメインの少なくとも1つの部分を含むペプチドとして定義してもよい。同様に、SH3ドメインの官能性部分は、SH3に結合するドメインに特異的に結合することができるSH3ドメインの少なくとも1つの部分を含むペプチドとして定義してもよい。SH2に結合するドメインの官能性部分は、SH2に結合することができるペプチドとして定義してもよく、少なくとも4アミノ酸残基長を有していてもよい。SH3に結合するドメインの官能性部分は、SH3に結合することができるペプチドとして定義してもよく、少なくとも4アミノ酸残基長、好ましくは10アミノ酸残基長を有する。

上記のスクリーニング方法で利用されてもよいPTP/アダプター複合体は、PTP/分子またはそれらの官能基部分、例えば、PTP触媒ドメイン、リン酸化ドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、SH2に結合するドメイン、SH3に結合するドメイン、およびアダプタータンパク質、またはそれらのSH2ドメインおよびSH3ドメインといった官能基部分を含んでもよく、特に限定されない。使用されるペプチドは、リン酸化されていてもされていなくてもよく、リン酸化されている場合には、少なくとも1つのリン酸化されたアミノ酸残基を含み、リン酸化されたTyrアミノ酸残基を含むことが好ましい。リン酸ドメインは、あるアミノ酸残基を特異的にリン酸化したペプチドとして定義してもよい。このようなリン酸ドメインの官能性部分は、特異的PTKによってアミノ酸を特異的にリン酸化され得るペプチドとして定義してもよい。SH2ドメイン、SH3ドメイン、SH2に結合するドメイン、およびSH3に結合するドメインの官能性部分は上記のものであってもよい。

結合活性を示す分子を、さらにPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体を破壊する能力を調べるためにスクリーニングしてもよい。二者択一的に、分子を、PTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体を破壊能のために直接スクリーニングしてもよい。例えば、*in vitro*複合体形成を、最初に、固相支持体に固定化された目的の複合体のうちの1つの成分、またはそれらの官能性部分によってアッセイする。第二に、固定化された複合体成分を、上記のように同定した化合物、および目的の複合体の第二の成分、またはそれらの官能性成分に接触させる。第三に、化合物の存在下で、第二の成分が固定化された成分と安定した複合体を未だに形成できるか否かを測定する。

加えて、*in vivo*での複合体形成を、当業者に公知の免疫共沈法を利用してアッセイしてもよい。簡単にいえば、目的のPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体を形成できる細胞株を上記のように同定した化合物に接触させ、細胞ライセートをこのよう接触させた細胞株から調製する。目的の複合体の成分の1つに対して上昇した抗体を細胞ライセートに添加し、標準的な免疫沈降法に供する。複合体が破壊された場合に複合体の成分だけに対して上昇した抗体が沈降するのに対して、複合体がまだ形成される場合には免疫沈降では複合体が沈降する。

目的のPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体のトランスフォーメーション能に対する薬剤の効果を直接にアッセイしてもよい。このような薬剤は、必ずしも必要ではないが、上述のスクリーニング法を利用して同定された薬剤を含んでもよい。例えば、1またはそれ以上の薬剤は、阻害剤がなければ、細胞のトランスフォーメーションを生じるPTK/アダプター複合体を形成できる繊維芽細胞または造血幹細胞に投与してもよい(Muller et al., 1991, Mol. Cell. Biol. 11:1785 - 1792; McLaughlin et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:6558 - 6562)。細胞のトランスフォーメーション状態は、その後、例えば、*in vitro*で軟寒天でのコロニー形成能をモニターすることにより測定してもよい(Lugo et al.,

10

20

30

40

50

1989, Mol. Cell. Biol. 9:1263 - 1270; Gishizky et al., 1992, Science 256:836 - 839)。二者択一的に、細胞のトランスフォーメーション状態を、in vivoで、重篤な複合免疫不全状態 (SCID) の免疫不全ヌードマウスでの腫瘍の形成能を測定することにより、モニターしてもよい (Sawyers et al., 1992, Blood 79:2089 - 2098)。さらに、BCR - ABLの場合には、1つまたはそれ以上の薬剤を、当業者に公知のALLおよび/またはCMLの動物モデルに投与してもよく (Gishizky et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3755 - 3759) および/またはガン性障害の進行を逆転するかもしれない。

PTK/アダプターおよび/またはPTP/アダプター複合体形成を破壊することができ、そしてこうした複合体形成から生じる細胞増殖障害を低下させるか阻害することのできる薬剤を、こうした障害を示している患者またはこのような障害を示すおそれのある患者の治療に使用してもよい。上記の1つまたはそれ以上の薬剤を有効な濃度で患者に投与すると、PTK/アダプターまたはPTP/アダプタータンパク質複合体を含むはずの細胞増殖能は、このような薬剤の存在下で、低下するかまたは消失する。

また、白血病のような造血細胞増殖性疾患の場合には、患者への直接投与よりもむしろ、作用物質または薬剤は当技術分野で公知の自己骨髄移植および化学放射線療法とともに使用することができる。簡単に述べれば、一般に骨盤から採取される骨髄細胞のアリコート患者から取り出す。次に、細胞をPTK/アダプターまたはPTP/アダプター複合体を効率よく破壊し得る濃度の作用物質または薬剤の存在下で培養する。かかる複合体を形成する能力がある骨髄細胞のシグナル伝達経路をブロックすることにより、これら細胞のクローン子孫の存在に対して選択し、治療対象の造血細胞増殖性疾患に關与しているこれら細胞の培養物を効果的に排除する。骨髄細胞を培養して、発がん性の高い細胞を取り除いている間、当技術分野で公知の技法および線量を用いて、その疾患に適した化学放射線療法で患者を治療する。こうした化学放射線療法による治療の終了時に、患者は発がん性細胞を一掃しておいた骨髄細胞培養物の自己由来の注入液を受け取る。

本発明の好ましい態様において、PTK/アダプター複合体は破壊または妨害されており、そして該複合体はそのPTK成分がヒトBCR - ABL遺伝子の細胞内PTK産物で、アダプタータンパク質成分がアダプタータンパク質のGRBサブファミリーのGRB - 2メンバーであるものである。さらに、このような薬剤の投与により治療される細胞増殖性疾患としては、この好ましい態様では慢性骨髄性白血病と急性リンパ性白血病が挙げられるが、これらに限らない。

5.7 結合相手間の相互作用を破壊する能力がある化合物の同定

活性化チロシンキナーゼ分子とアダプタータンパク質分子 (ここでは、「結合相手」と呼ぶことにする) との相互作用を妨げる (すなわち、破壊または阻止する) 能力について化合物を試験するにあたって、多くのアッセイ系のどれを使用してもよい。活性化チロシンキナーゼ分子のほかに、アダプタータンパク質と結合して複合体を形成する他の分子が結合相手のこの定義に含まれることを認識するべきである。それゆえ、別の結合相手としては、例えばGRB - 2アダプタータンパク質と結合することが知られているSH2ドメイン含有タンパク質のSHCがある (Tauchi, T. ら, 1994, J. Exp. Med. 179:167 - 175; Rozakis - Adcock, M. ら, 1992, Nature 360:689 - 692; Pelicci, G. ら, 1992, Cell 70:93 - 104)。しかし、リガンド (天然または合成)、ペプチドまたは小さな有機分子を含むがこれらに限らない多数の化合物をスクリーニングできる迅速で高処理量のアッセイが好ましいものである。こうして結合相手の相互作用を妨げることが確認された化合物はここに記載される阻害活性についてさらに評価され得る。

結合相手間の相互作用を妨げる化合物の同定に用いられるアッセイ系の基礎的な原理は、2種のタンパク質を相互作用させ、結合させ、複合体を形成させるのに十分な条件下および時間において結合相手を含む反応混合物を調製することを包含する。阻害活性について化合物を試験するためには、反応を試験化合物の存在下または不在下で実施する。すなわち、試験化合物は反応混合物中に最初に添加しておいてもよいし、結合相手の添加後のある時点で添加してもよい。対照は試験化合物の不在下でまたはプラシーボとともにインキュベートされる。その後、結合相手タンパク質の複合体の形成を検出する。対照反応

混合物中に複合体が形成されるが、試験化合物を含む反応混合物中では複合体が形成されないこと、または対照反応と比較して反応混合物中での複合体形成のレベルが低下していることは、該化合物が結合相手間の相互作用を妨げることを示している。利用しうるアッセイ成分および各種フォーマットを以下に述べる。

アッセイの成分として用いられる結合相手は、天然源から得られるものであってよく、例えば当技術分野で公知のタンパク質分離法を用いて細胞から精製したり、当技術分野で公知の技法を用いて組換えDNA法により作製したり（例えば、Sambrookら,1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratories Press,Cold Spring Harbor,N.Y.参照）、かつ/または当技術分野で公知の技法を用いて全部または一部を化学合成したりすることができる。例えば、ペプチドを固相法で合成し、樹脂から切り離し、分離用の高性能液体クロマトグラフィーで精製する（例えば、Creighton,1983,Proteins: Structures and Molecular Principles,W.H.Freeman & Co.,N.Y.pp.50 - 60参照）。合成ペプチドの組成はアミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができ、例えばエドマン分解法が用いられる（例えば、Creighton,1983,前掲を参照）。

ペプチド断片はそれぞれのタンパク質の結合ドメインに対応するように作製しうる。例えば、このような断片にはSH2ドメイン、SH3ドメイン、SH2ドメインに結合するペプチド断片および/またはSH3ドメインに結合するペプチド断片が含まれるが、これらに限らない。タンパク質の結合部位を同定および単離するには、当技術分野で常用されている多くの方法を採用することができる。こうした方法として、タンパク質をコードする遺伝子の1つの突然変異誘発および同時免疫沈降アッセイにおける結合の破壊についてのスクリーニングがあるが、これらに限らない。それぞれのタンパク質をコードする遺伝子の配列分析により、相互作用結合に関与するタンパク質の領域に対応する突然変異が明らかになるだろう。

また、あるタンパク質を固体表面に固定し、トリプシンのようなタンパク質分解酵素で処理しておいたその標識結合相手と相互作用させて、それに結合させることもできる。洗浄後、結合ドメインを含む短い標識ペプチドは固体材料に結合されたままに残り、それを単離した後アミノ酸配列決定により同定する。また、ひとたびタンパク質の遺伝子が得られたら、短い遺伝子セグメントを遺伝子工学的に作製してそのタンパク質のペプチド断片を発現させ、その後ペプチド断片をその結合活性について試験し、精製し、または合成することができる。

本発明のアッセイにおいて使用しうる結合相手のアミノ酸配列は、分子クローニング法で作製されようと、化学合成法で合成されようと、それらをコードする遺伝子の既知配列に同一である必要はない。結合相手はアミノ酸残基が欠出、付加または置換されているが機能的に等しい産物をもたらす変更配列を含んでいてもよい。

例えば、配列内の残基の代わりに機能的に等しいアミノ酸残基を用いて配列を変えることができる。こうした置換残基はそのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択することができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としてはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが含まれ；極性中性アミノ酸としてはグリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが含まれ；正に荷電した（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リシンおよびヒスチジンが含まれ；負に荷電した（酸性）アミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。

アッセイ系で用いられる結合相手の1つは、結合相手間で形成される複合体の検出を容易にするために、直接または間接的に標識されるべきである。適当な標識系のどれを使用してもよく、¹²⁵Iのような放射性同位元素、基質にさらしたとき検出可能な比色分析シグナルまたは光を発生する酵素標識系、それに蛍光標識が含まれるが、これらに限らない。

アッセイの結合相手を作製するために組換えDNA法を用いる場合は、標識づけ、固定化および/または検出を容易にする融合タンパク質を遺伝子工学的に作製することが有利である。例えば、チロシンキナーゼまたはアダプタータンパク質のコード配列を、酵素活性を有するかまたは酵素基質として作用する異種タンパク質のコード配列に融合させることに

10

20

30

40

50

より、標識づけおよび検出が簡単になる。融合構築物は、融合産物の異種成分が結合相手の結合を妨げないように設計すべきである。

間接標識は、結合相手のひとつに特異的に結合する、標識抗体のような第3のタンパク質の使用を伴う。そのような抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、FabフラグメントおよびFab発現ライブラリーにより生産されるフラグメントが挙げられるが、これらに限定されることはない。

アッセイは、不均一または均一な形態で行うことができる。不均一アッセイは、結合相手のひとつを固相に固定し、固相に固定された複合体を反応の最後に検出することを伴う。均一アッセイにおいては、全反応は液相中で行われる。どちらの方法においても、反応物の添加の順序を変えて、試験される化合物に関する異なる情報を得ることができる。例えば、試験物質の存在下で反応を行う、すなわち、結合相手の前または結合相手と同時に反応混合物に試験物質を添加することにより、例えば、競合により結合相手間の相互作用を妨害する試験化合物を同定することができる。一方、複合体が形成した後に試験化合物を反応混合物に添加することにより、前形成された複合体を分断する試験化合物、例えば、複合体から結合相手のひとつにとって代わるより高い結合定数を有する化合物を試験することができる。

不均一アッセイ系においては、一方の結合相手が固体表面に固定され、その結合相手（固定されていない）が直接あるいは間接的に標識される。実際には、マイクロタイタプレートが好都合に利用される。固定種は、非共有または共有結合により固定化されうる。非共有結合は、固体表面をタンパク質の溶液でコーティングして乾燥することにより、簡単に達成されうる。あるいはまた、タンパク質に特異的な固定化抗体を使用して、タンパク質を固体表面に固定してもよい。この表面を前もって調製し、保存しておいてもよい。

上記のようなアッセイを行うために、試験化合物とともに、あるいは試験化合物なしに、固定化種の結合相手はコーティングされた表面に添加される。反応が完了した後に、（例えば、洗浄により）未反応の成分を除去すると、形成した複合体は固体表面に固定化されたままでいる。固体表面に固定された複合体の検出はいくつかの方法でなされる。結合相手が予備標識されている場合には、表面に固定化された標識の検出により、複合体の形成が示される。結合相手が予備標識されていない場合には、間接標識を使用して、例えば、結合相手に特異的な標識抗体（この抗体は、今度は、標識抗Ig抗体により直接的にあるいは間接的に標識されうる。）を用いて、表面に固定された複合体を検出することができる。反応成分の添加の順序に依存して、複合体の形成を抑制するか、あるいは、前形成された複合体を分断する試験化合物を検出することができる。

あるいはまた、試験化合物の存在下または不存在下で、液相中で反応を行い、反応生成物を未反応成分と分離し、そして、例えば、溶液中に形成した複合体を固定するための一方の結合相手に特異的な固定化抗体および固定された複合体を検出するための他の結合相手に特異的な標識抗体を用いて、複合体を検出することができる。ここでも、反応物の液相への添加の順序に依存して、複合体を抑制するか、あるいは、前形成された複合体を分断する試験化合物を同定することができる。

本発明の他の態様において、均一アッセイを使用することができる。この方法においては、結合相手の前形成された複合体が調製され、ここでは、結合相手のひとつが標識されるが、この標識により生じるシグナルは複合体の形成により消失する（例えば、イムノアッセイのためのこの方法を利用するRubensteinの米国特許第4,109,496号を参照のこと）。結合相手のひとつと競合し、前形成された複合体からこれにとって代わる試験物質の添加により、バックグラウンドより高いシグナルが発生する。このようにして、ウイルスタンパク質 - 宿主細胞タンパク質相互作用を壊す試験物質を同定することができる。

6. 実施例: BCR - ABLはGRB - 2とin vitroでもin vivoでも会合する

この節で提示する実施例において、アダプタータンパク質のGRBサブファミリーのGRB - 2メンバーがBCR - ABL細胞内PTKにin vitroでもin vivoでも結合することが実証される。

6.1. 材料および方法

6.1.1 細胞およびウイルス

10

20

30

40

50

Spodoptera frugiperda (Sf9) 昆虫細胞を完全Grace培地 (Smith, G.E., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:2156 - 2165) 中で増殖させた。Ph¹陽性白血病細胞系K562およびNMG - 01を慢性骨髄性白血病患者から誘導し、P210 BCR - ABLを発現させた。PH¹陽性細胞系ALL - 1を急性リンパ性白血病患者から誘導し、P185 BCR - ABLを発現させた。これらのPH¹陽性細胞系を10 %牛胎児血清含有RPMI 1640培地中で培養した。COSアフリカミドリザル細胞 (COS African green monkey cells) およびRat1繊維芽細胞を5 %牛胎児血清含有DMEM培地中で増殖させた。

Pendergastら, 1991, *Cell* 66:161 - 171; Pendergastら, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5927 - 5931に記載のように、野生型バキュロウイルスDNAの存在下で、pAcCI2バキュロウイルスベクター中にクローニングされた対応するcDNAを同時トランスフェクションすることにより、cBCR、cABLおよびBCR - ABLの発現用の組換えバキュロウイルスを作製した。

先に記載した方法 (Mullerら, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11:1785 - 1792) に従い、COS細胞で一過性の高発現 (hyperexpression) により、無ヘルパー (Helper - free) レトロウイルスのストックを調製した。免疫組織化学的方法 (Mullerら, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11:1785 - 1792) を用いて、野生型および変異型のBCR - ABL遺伝子産物をRat1繊維芽細胞へ移入する能力に従い、レトロウイルスのストックの特性付けを行った。これらの染色法において、内在性レベルのrat c - ablタンパク質は検出されなかった。BCR - ABLタンパク質発現のレベルを測定する (ウエスタンブロット) ことにより、遺伝子移入のレベルをさらに評価した。比較できるレベルの遺伝子移入を示すレトロウイルスのストックのみをこれらの検討に使用した。ウイルスストックの限界希釈へさらした後のG418耐性Rat1コロニーの頻度により測定したところ、力価はml当たり105感染粒子の範囲であった。

6.1.2 抗体

cBCRのアミノ末端、cABLのアミノおよびカルボキシ末端配列に対するウサギポリクローナル抗体については先に記載した (Pendergastら, 1991, *Cell* 66:161 - 171; Konopkaら, 1984, *Cell* 37:1035 - 1042)。マウスモノクローナル抗 - ABL (21 - 63) 抗体を免疫プロット法 (Pendergastら, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5927 - 5931) に採用した。GRB - 2 (Ab50) のC末端SH3ドメインに対するウサギポリクローナル抗体およびGRB - 2 (Ab86) のN末端SH3ドメインから誘導された合成ペプチドに対するウサギポリクローナル抗体を、それぞれ、免疫沈降法および免疫プロット法 (Lowensteinら, 1992, *Cell* 70:431 - 442) に使用した。

6.1.3 プラスミドの構築

650塩基対のヒトGRB - 2 cDNA (Lowensteinら, 1992, *Cell* 70:431 - 442; Matuokaら, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9015 - 9019) を、ヒト胎盤cDNAライブラリーから、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、(5') SH3 - SH2および(3') SH3フラグメントとしてクローニングした。完全長のGRB - 2 cDNAを生成するために、GRB - 2 のコドン154のユニークなKpn I部位を採用した。GRB - 2 の全コーディング配列およびGRB - 2 の(3') SH3ドメインをpGEX - 2Tベクター (Pharmacia) のBam H I部位にフレーム内でサブクローニングした。Sko Inikら, 1993, *EMBO J.* 12:1929 - 1936に記載のように、GRB - 2 の単離された(5') SH3およびSH2ドメインを調製した。

野生型P185 BCR - ABL (McLaughlinら, 1989, *Mol. Cell. Biol.* 9:1866 - 1874) およびP185 (Δ176 - 426) (Mullerら, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11:1785 - 1792) についてのcDNAの調製ならびに対応するcDNAのpSRα (Pendergastら, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5927 - 5931) およびpSRα MSVtkneo (Mullerら, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11:1785 - 1792) ベクターへのクローニングは、先に記載したように行った。Muta - Gene Phagemid in vitro mutagenesis system (Bio Rad) を用いるオリゴヌクレオチド特定部位の突然変異誘発により、P185 BCR - ABL (Y177F) 変異体を創製した。pGEM4/cBCR由来のcBCRの1.6KbのEcoR I - Sac IフラグメントをpBlueScript SK+ベクター (Stratagene) のEcoR IおよびSac I部位にサブクローニングし、XL - 1 BlueバクテリアをヘルパーファージR408 (Stratagene) で同時感染させて一本鎖DNAを守ることにより、鋳型を作成した。この突然変異オリゴヌクレオチド5' - AAG CCC TTC TTC GTT AAC GTC GAG - 3'を採用して、ヌクレオチド530をAからT

に変更することにより、チロシンの代わりにフェニルアラニンコドンを生じた。さらに、ヌクレオチド534にサイレントな塩基の変更を導入し、ユニークなHpa I部位を作成した。このユニークなHpa I部位の存在のために突然変異誘発されたプラスミドが選択された。突然変異は、両方向でのジデオキシ読み終わり配列分析により証明された。突然変異したBCR配列を野生型P185 BCR - ABL cDNAに導入した。P185BCR - ABL (Y177F) をpSR α およびpSR α MSVtk neo哺乳類発現ベクターならびにバキュロウイルス発現用のAcC12ベクターにサブクローニングした。野生型cABLのためのcDNAのpSR α ベクターへのクローニングは、先に記載した (Pendergastら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5927 - 5931)。BCR (Δ 872 - 1271) も、Pendergastら, 1991, Cell 66:161 - 171に記載されているように、pSR α にクローニングした。

10

6.1.4. GST融合タンパク質の発現と精製

既に記載されたように (Pendergast et al., 1991, Cell 66:161 - 171)、GST融合タンパク質を発現させて、グルタチオン - セルファロース4Bビーズ (Pharmacia) を用いて精製した。融合タンパク質は樹脂上に残したままで4 で保存した。

6.1.5. 代謝による標識化と免疫沈降

示された組換えバキュロウイルスにSf9細胞を感染させた。感染の3日後、細胞をメチオニンを含まない培地中で0.1mCi/ml [35 S] メチオニン (ICN) とともに4 ~ 6時間、27でインキュベートした。5mM EDTA, 1mM PMSF, 50 μ g/mlロイペプチン、25 μ g/mlアプロチニン、25mM NaF, 1mM Na₃VO₄および0.1mM Na₂MoO₄を補ったKLB (10mMリン酸ナトリウムpH7.0, 150mM NaCl, 1% Triton X - 100) またはPCLB (50mM HEPES, pH7.0, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1% Triton X - 100, 10% グリセロール) のいずれかで、標識細胞を溶解した。溶解物を100,000 $\times$ gで1時間遠心することにより清澄とした。溶解物を示された抗体とともに直接またはインキュベーション緩衝液 (20mM HEPES, pH7.0, 150mM NaCl, 0.1% Triton X - 100, 10% グリセロール, 0.5mM Na₃VO₄, 0.1mM Na₂MoO₄, 25mM NaF, 1mM PMSF, 25 μ g/mlロイペプチン) で3倍希釈後、示されたようにインキュベートした。プロテインA - セファロースビーズ (Pharmacia) とともに120分間、4でインキュベーションすることにより免疫複合体を集めた。ビーズをインキュベーション緩衝液で十分に洗浄し、結合していない物質を除去した。結合したタンパク質はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、フルオログラフィーで肉眼で確認した。未標識の溶解物を用いるときはいつでも示された抗体によるイムノプロットによりそのタンパク質を検出した。

20

30

6.1.6. バインディングアッセイ

タンパク質溶解物をインキュベーション緩衝液で3倍に希釈し、グルタチオン - セファロースビーズに結合させたGSTまたはGST融合タンパク質とともにインキュベートした。4での90分間のインキュベーション後、ビーズをインキュベーション緩衝液またはRIPA緩衝液 (20mM Tris - HCl, pH7.4, 137mM NaCl, 10% グリセロール, 1% Triton X - 100, 0.1% SDS, 0.5% デオキシコール酸塩および2mM EDTA) で、示されたように十分に洗浄した。結合タンパク質はSDSポリアクリルアミド後の放射能標識化タンパク質のフルオログラフィーにより分析した。

6.1.7. イムノプロット、IN VITRO自己リン酸化および脱リン酸化反応

イムノプロットおよび [γ 32 P] ATPによるin vitro標識化の方法は基本的には以前に記載されたように行なった (Pendergast et al., 1991, Cell 66:161 - 171; Pendergast et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5927 - 5931)。ジャガイモ酸性ホスファターゼによる脱リン酸化は記載されたように行なった (Pendergast et al., 1991, Cell 66:161 - 171; Pendergast et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5927 - 5931)。

40

6.2. 結果

6.2.1. BCR - ABLはGRB - 2とIN VIVOで会合する

BCR - ABLチロシンキナーゼがGRB - 2アダプタータンパク質とそのままの細胞中で物理的複合体を形成するかどうかを決定するために、これらの2種類のタンパク質が共免疫沈降するかどうかを調べた。細胞溶解物をPh¹陽性白血病細胞系、K562、MEG - 01、およびALL - 1 Ph¹造血細胞系それにRat1繊維芽細胞から調製し、抗ABL pEx4、抗GRB - 2または対照

50

抗体との免疫沈降に供した。十分な洗浄の後、免疫沈降物をプロテイン A - セファロースビーズ上に集め、 $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATPと MnCl_2 存在下でin vitroリン酸化に供した。そのような条件はBCR - ABLキナーゼの自己リン酸化を促進する。反応は30分後に30℃で停止させ、洗浄し、SDS/8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。 ^{32}P 標識タンパク質はオートラジオグラフィーにより検出した。匹敵する量のBCR - ABLタンパク質を抗GRB - 2または抗ABL抗体のいずれかを用いて沈降させた。さらに両形態のBCR - ABL (P210とP185)は対応するBCR - ABLタンパク質を発現するRat1繊維芽細胞のGRB - 2と会合した。

同様に、GRB - 2タンパク質との免疫沈降は、BCR - ABLを発現している細胞系の抗ABL抗体により沈降させることができる。具体的には、細胞溶解物をMEG - 01細胞から調製し、対照 (前免疫血清)、抗ABL pEX4抗体および抗GRB - 2抗体との免疫沈降に供した。免疫沈降タンパク質をSDS/12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロースに移し、抗GRB - 2抗体を用いてイムノブロットした。結合した抗体は $[\text{}^{125}\text{I}]$ プロテイン Aを用いて肉眼で確認し、抗GRB - 2と抗ABL免疫沈降物質を含有する両レーンで検出することができた。

BCR - ABLを発現する細胞を ^{35}S - メチオニンで代謝的に標識した後、抗ABL抗体か抗GRB - 2抗体による免疫沈降により、細胞中で利用できるBCR - ABLキナーゼの50% ~ 90%が上記の結果と一致してGRB - 2と複合体を形成する。興味あることに、GRB - 2と発がん性v - ablキナーゼとの会合は観察されなかった。これらの実験から、GRB - 2アダプタータンパク質は両形態のBCR - ABLチロシンキナーゼと安定な複合体を形成するが、v - ablキナーゼとは複合体を形成しないこと、およびBCR - ABL/GRB - 2複合体はBCR - ABLのin vitroリン酸化後そのままの状態にあることが分かった。

6.2.2. BCR - ABLはIN VITROでGRB - 2と結合する

BCR - ABLとGRB - 2との会合の分子的基础を調べるために、全長GRB - 2 cDNA配列をpGEX - 2Tにクローン化して細菌中でグルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として発現させた。GST - GRB - 2タンパク質を精製して、in vitroでBCR - ABLと結合する能力について調べた。具体的には、P185 BCR - ABL組換えバキュロウイルスで感染させたSf9昆虫細胞の分解物からの ^{35}S メチオニン標識タンパク質を、プロテイン A - セファロースビーズに結合させた等量の固定化GSTのみ、GST - GRB - 2全長、GSTアミノ末端、GRB - 2 SH3ドメイン、GST - GRB - 2 SH2ドメインGSTカルボキシ末端、GRB - 2 SH3ドメインおよび抗ABL抗体とともにインキュベートした。90分間、4℃でのインキュベーション後、ビーズをインキュベーション緩衝液で4回、RIPA緩衝液で2回洗浄して、結合していない物質を除去した。結合したタンパク質はSDS/7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、フルオログラフィーで検出した。バキュロウイルス感染の昆虫細胞中に発現されたP185 BCR - ABLは、グルタチオンセファロースビーズ上に固定化された全長GRB - 2に結合することが分かった。GSTのみへの結合は検出されなかった。BCR - ABLとGST - GRB - 2との複合体は、SDSとデオキコール酸塩洗浄剤を含有する緩衝液での洗浄後も、もとのままの状態であった。

どのGRB - 2ドメインがBCR - ABLと結合するのかを同定するために、単離されたGRB - 2 SH3ドメインとSH2ドメインを有するGST融合タンパク質を調製した。BCR - ABL結合はGST - GRB - 2 SH2融合タンパク質と結合した。GRB - 2のアミノ末端とカルボキシ末端のSH3ドメインを有するGST融合タンパク質もバキュロウイルス産生BCR - ABLタンパク質とin vitroで結合した。GRB - 2のSH2とSH3のドメインとBCR - ABLとの相互作用はSDSとデオキコール酸塩を含有する緩衝液での洗浄に抗するものであった。BCR - ABLをジャガイモ酸性ホスファターゼで処理することにより、GRB - 2 SH2ドメインと会合するその能力は完全に取り除かれたが、GRB - 2 SH3ドメインへのその結合が影響されることはなかった。

7. 実施例 : SH2を仲介とするGRB - 2のBCR - ABLへの結合に必要なBCR - ABL配列

本節に紹介する実施例において、GRB - 2 SH2ドメインを経るBCR - ABL/GRB - 2結合に必要なアミノ酸配列を調べる。具体的には、結合はTyr - リン酸化アミノ酸残基の存在を必要とすることが示され、さらにBCRの第一エキソン変異はSH2を仲介とするBCR/GRB - 2結合を消滅させることができることが示される。

10

20

30

40

50

7.1. 材料と方法

本実施例で紹介する実験に用いられた材料と技術は上記の第6.1節に記載した通りである。

7.2. 結果

7.2.1. SH2を仲介とするGRB - 2のBCR - ABLへの結合はBCR配列のチロシンリン酸化を必要とする

BCR - ABLのどの領域がGRB - 2結合に関与しているかを同定するために、バキュロウイルスに感染させた昆虫細胞でBCRとABL配列を別々に発現させ、全長GRB - 2ならびに単離されたGRB - 2 SH2及びSH3ドメインに結合するそれらの能力について調べた。バキュロウイルスの産生したcABLは全長GRB - 2にin vitroで結合したが、GRB - 2 SH2ドメインだけでは結合しなかった。具体的には、Sf9昆虫細胞を単独でcABL組換えバキュロウイルスに感染させた。感染の3日後に細胞を³⁵S - メチオニンで標識した。標識細胞を溶解させ、溶解タンパク質を、プロテインA - セファロースビーズの存在下で、GSTのみ、GST - GRB - 2全長、GST - GRB - 2 アミノSH3、GST - GRB - 2 SH2、GST - GRB - 2 カルボキシSH3、および対応する抗ABL抗体とインキュベートした。90分間4 でのインキュベーション後、ビーズをインキュベーション緩衝液で4回、RIPA緩衝液で2回洗浄した。結合したタンパク質をSDS/10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、フルオログラフィーで検出した。昆虫細胞中で過剰発現したcABLはチロシン残基上でリン酸化されている (Pendergast et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5927 - 5931)。よって、バキュロウイルス産生cABLタンパク質に対してGRB - 2 SH2ドメインが結合不能なのはチロシンリン酸化の欠如によるものではなかった。

in vitroでのcABLのGRB - 2への結合は、GRB - 2のアミノ末端とカルボキシ末端のSH3ドメインのみを経て仲介されているようである。SH3ドメインはプロリンに富む特定の部分に結合する (Cicchetti et al., 1992, *Science* 257:803 - 806; Ren et al., 1993, *Science* 259:1157 - 1161)。最近、Sos1のカルボキシ末端領域に存在するプロリンに富む配列 (PPP VPPR) とGRB - 2 SH3ドメインとの直接の相互作用により、GRB - 2はSos1グアニンヌクレオチド交換体に結合することが示されている (Li et al., 1993, *Nature* 363:85 - 87; Rozakis - Adcock et al., 1993, *Nature* 363:83 - 85)。cABLのカルボキシ末端はプロリンに富むいくつかの伸長部分を含有する。しかし、PPP VPPR配列はcABLタンパク質に見られない。in vitroでのGRB - 2 SH3ドメインのcABLへの結合は、cABLカルボキシ末端ドメインの大部分を欠くcABL欠失変異タンパク質において著しく減少しているが、完全にはなくなっていない。後記する通り、タンパク質溶解物からの免疫沈降後の通常のcABLとGRB - 2との検出可能な会合の欠如とともに、これらのデータから、in vitroで観察されるcABL/GRB - 2相互作用は特異的なものではなく、in vivoで起こらないことが示唆される。しかし、cABL中のプロリンに富むドメインは他のSH3ドメインの結合部位として働くことが可能である。

in vitroでのGRB - 2の全長または単離されたドメインへのcBCRの結合の同様な分析から、全長GRB - 2のみが、およびそれよりも少ない程度でGRB - 2のN末端SH3ドメインが、in vitroでcBCRに結合することが明らかとなった。具体的には、Sf9昆虫細胞を単独でcBCR組換えバキュロウイルスに感染させ、次にcABL組換えバキュロウイルスで既に記載のように処理した。興味深いことに、GRB - 2のSH2ドメインへのcBCRの結合は検出されなかった。

in vitroでGRB - 2 SH2ドメインがcABLとcBCRにまったく結合しないことは、このドメインのキメラBCR - ABLチロシンキナーゼへの強い結合とは対照的である。cBCR配列のリン酸化状態は、BCR - ABLキメラとは全長cBCRタンパク質の点において異なる。cBCRタンパク質は、昆虫細胞での過剰発現後でさえ調べられたすべての種類の細胞のセリン/スレオニン残基においてのみリン酸化されているだけである (Timmons et al., 1989, *Oncogene* 4:559 - 567; Pendergast et al., 1991, *Cell* 66:161 - 171)。対照的に、BCR - ABLキメラにおいて、活性化ABLキナーゼはBCRの第一エキソン配列をチロシン上でリン酸化する (Liu et al., 1993, *Oncogene* 8:101 - 109)。BCR配列のチロシンリン酸化が、単離されたGRB - 2 SH2ド

10

20

30

40

50

メインへの結合の原因となっているかどうかを評価するために、全長cBCRとcABLのタンパク質をコードするバキュロウイルスを昆虫細胞に共感染させた。具体的には、Sf9昆虫細胞にcABLとcBCRの組換えバキュロウイルスを共感染させ、cABL組換えバキュロウイルスについて既に記載したように処理した。cABLチロシンキナーゼによるcBCRのトランス-リン酸化の結果、GRB-2 SH2ドメインはcBCRに結合した。抗ホスホチロシン抗体を用いたウェスタンブロットにより、cABLバキュロウイルスとcBCRバキュロウイルスを共感染させたSf9細胞中でcBCRはチロシンのリン酸化を受けた。GRB-2の単離されたアミノ末端またはカルボキシ末端のSH3ドメインへのcBCRの低いレベルのin vitro結合も検出された。これらの結果から、BCR配列へのGRB-2 SH2ドメインの結合はチロシンリン酸化が必要であることが示された。

10

7.2.2. GRB-2はIN VIVOでBCR-ABL配列と相互作用を行なうが、cABLとcBCR配列とは相互作用を行なわない

GRB-2のcABLとcBCRへのin vitro結合がin vivoでも起こっているのかどうかを調べるために、対応するcDNAの発現構築物をCOS細胞に移入した。これらのcDNAのトランスフェクションの結果、cABLとcBCRの発現は対応する内因性タンパク質レベルを超えて約50~200倍に増加する(Pendergast et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5927-5931)。これらの条件下で、cABLは認知できる量でGRB-2と共免疫沈降することはなかった。同様に、GRB-2とBCR配列との相互作用は、COS細胞でのP210 BCR-ABLキメラに保持されたBCR配列の過剰発現後に検出することはできなかった。対照的に、顕著な量のP185 BCR-ABLが同じ実験で抗GRB-2抗体により沈降した。

20

具体的には、pSR α ベクター中にクローン化したcABL cDNAおよびP185野生型をCOS細胞に移入した。このトランスフェクションの3日後に細胞を溶解させ、溶解物を2時間、4で通常のウサギ血清、抗ABL 2/3抗体および抗GRB-2抗体とともにインキュベートした。免疫沈降物をプロテインAビーズ上に集め、インキュベーション緩衝液で6回洗浄した。結合したタンパク質をSDS/8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロースに移し、フィルターを抗ABLマウスモノクローナル抗体とともにインキュベートした。免疫反応性バンドは増強化学発光(ECL)検出システム(Amersham)を用いて肉眼で確認した。さらに、pSR γ ベクター中にクローン化したBCR(872-1271)cDNAをCOS細胞に移入した。この感染の3日後に細胞を溶解させ、溶解物を対照血清、抗BCR抗体または抗GRB-2抗体とともに2時間4でインキュベートした。免疫沈降物をプロテインA

30

-セファロースビーズで集め、インキュベーション緩衝液で4回洗浄し、50mM Tris-HCl、pH7.0で2回洗浄し、次に γ - 32 P ATPとMnCl₂存在下でin vitroリン酸化に供した。タンパク質はSDS/8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動とオートラジオグラフィーにより分析した。

これらのデータは、通常の細胞からの抗GRB-2免疫沈降物中の検出可能な内因性cABLとcBCRタンパク質の欠如とともに、cABL/GRB-2とcBCR/GRB-2複合体はin vivoでは観察されないとの主張を支持するものである。これらの知見から、BCR-ABLキメラはそのBCRおよびABLタンパク質配列成分から識別できる新規なタンパク質結合性を示すことが実証された。

7.2.3. BCRの第一エキソンの点変異はGRB SH2ドメインのBCRへの結合を消滅させる

40

特定のチロシンリン酸化タンパク質へのSH2ドメインの結合は、リン酸化チロシンに対する一次配列C末端に依存する(Fanti et al., 1992, *Cell* 69:413-423; Kashishian et al., 1992, *EMBO J.* 11:1373-1382; Sonyang et al., 1993, *Cell* 72:767-778)。BCRの第一エクソン内の11の潜在的チロシンリン酸化部位のまわりの配列を調べることで、チロシン177がGRB-2 SH2ドメインの最適結合部位に対応する配列YVNV内に見られることが明らかとなった(Sonyang et al., 1993, *Cell* 72:767-778; Skolnik et al., 1993, *ENBO J.* 12:1929-1936)。BCRの第一エクソン中の他の10個のチロシンのまわりの配列は、GRB-2 SH2ドメインまたは調べられた他のSH2ドメインの最適結合部位と一致しない(Sonyang et al., 1993, *Cell* 72:767-778)。BCR-ABLをGRB-2 SH2ドメインに結合させるためにチロシン177が必要であるかどうかを決定するために、部位特異的変異によりBCR-ABL中のチロ

50

シン177をフェニルアラニンに置換し、この変異タンパク質を昆虫細胞で発現させ、GRB - 2に対する結合について調べた。in vitro自己リン酸化後のP185 (Y177F) 変異タンパク質とP185野生型タンパク質とのホスホペプチドマップのパターンの比較から、P185 (Y177F) では少なくとも一つの主要なホスホペプチドの欠如が明らかとなった。具体的には、pSR α MSVtkneoベクターにクローン化したP185野生型とP185 (Y177F) をCOS細胞に移入した。このトランスフェクションの3日後に、細胞を溶解させ、溶解物を抗ABL抗体とともにインキュベートした。免疫沈降物を γ - 32 P ATPとMnCl $_2$ 存在下でin vitro自己リン酸化に供した。タンパク質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、ニトロセルロースに移し、ホスホペプチドマップ作製に供した。

結合の研究により、野生型P185 BCR - ABLとは対照的に、BCRの第一エクソン中のチロシン 177をフェニルアラニンで置換したP185 BCR - ABL (Y177F) 変異タンパク質は、in vitroでGRB - 2 SH2ドメインと相互作用しないことが示された。具体的には、Sf9昆虫細胞に、pAcC12ベクターを用いてクローン化した野生型P185 BCR - ABL cDNAと野生型バキュロウイルスDNAを共に移入するか、またはpAcC12ベクター中にクローン化したP185 BCR - ABL (Y177F) cDNAと野生型バキュロウイルスDNAを共に移入した。このトランスフェクションの6日後、細胞を、 35 S - メチオニンで代謝を通して標識した。細胞を溶解し、溶解物をGST - GRB - 2 SH2または抗ABL pEX4抗体とともにプロテイン A - セファロースビーズの存在下でインキュベートした。結合したタンパク質はSDS/7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動とフルオログラフィーにより分析した。

次に、in vivoでGRB - 2 と相互作用するP185 BCR - ABL (Y177F) 変異体の能力を評価した。P185 (Y177F) は、変異タンパク質を安定に発現するCOS細胞またはRat1繊維芽細胞で過剰発現されたときに内因性GRB - 2 と相互作用を行なわなかった。同様に、チロシン177を欠くBCR - ABL欠失変異体はGRB - 2 に結合しなかった。具体的には、pSR α MSVtkneoベクター中にクローン化したP185野生型とP185 (Y177F) のcDNAをCOS細胞に移入した。このトランスフェクションの3日後、細胞を溶解させ、溶解物を通常のウサギ血清 (NRS)、抗ABL 2/3抗体、または抗GRB - 2 抗体とともに2時間、4℃でインキュベートした。免疫沈降物をプロテイン A - セファロースビーズ上に集め、 $[\gamma$ 32 P] ATPとMnCl $_2$ 存在下でのin vitroリン酸化に供した。タンパク質をSDS 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動とオートラジオグラフィーにより分析した。さらに、P185野生型とP185 (Y177F) を発現するG418選択Rat1細胞の溶解物を、抗GRB - 2 抗体、抗ABL 2/3抗体または通常のウサギ血清とともに2時間、4℃でインキュベートした。免疫沈降物をプロテイン A - セファロースビーズ上に集めた。結合したタンパク質をSDS 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびその後の抗ABLマウスモノクローナル抗体によるイムノブロットにより分析した。免疫反応性バンドはECL検出システム (Amersham) で肉眼で確認した。

これらのデータから、BCR - ABLとGRB - 2 とのin vivoでの相互作用は、BCR - ABL中のリン酸化チロシン177へのGRB - 2 SH2ドメインの結合により仲介されていることが示された。GRB - 2 SH3ドメインは、全長GRB - 2 とBCR - ABLとの間のin vivo結合に明らかに寄与していない。

8. 実施例: GRB - 2 結合を欠損しているBCR - ABLタンパク質はトランスフォーメーション能力の減少を呈する

この実施例に示すデータにより、BCR - ABL細胞内PTKのトランスフォーメーションポテンシャルは、タンパク質のアダプターファミリーのGRBサブファミリーのGRB - 2 へのこのPTKの結合に依存していることが示される。この結果により、このようなPTKへのアダプタータンパク質の結合がトランスフォーメーション / 発がん過程における1つのステップとして関与していることを表している。

8.1. 材料および方法

8.1.1 トランスフォーメーションアッセイ

Rat1繊維芽細胞の感染を前記のように実施した (Lugoら, 1989, Mol. Cell. Biol. 9:1263 - 1270)。力価は、繊維芽細胞への遺伝子転移の頻度により測定した場合、ml当たりの感染粒子が $> 10^5$ の範囲である。半固体培地でRat1コロニー形成を、15%子牛胎児血清および0

10

20

30

40

50

.4% ノーブル (Noble) 寒天を補給した、Iscove 5ml中の $6 - \text{cm}^2$ 皿当たり 5×10^4 個の細胞を塗布して測定した (Lugoら, 1989, *Mol. Cell. Biol.* 9:1263 - 1270)。G418 - 耐性集団を感染細胞を G518 (0.5mg/ml) で 12 ~ 15 日間培養して樹立した。選択した後、G418 - 耐性培養物の細胞を ml 当たり 10^4 個の細胞の濃度で寒天に塗布した。寒天に形成したコロニーの数を細胞塗布の 2 週間後に記録した。

新たに単離したマウス骨髄からの造血細胞培養物の感染および樹立を前記のように実施した (McLaughlinら, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6558 - 6562)。簡単には、4 ~ 6 週令雌 BALB/c マウスからの骨髄成分を、ml 当たり Polybrene $4 \mu\text{g}$ を補給した適切なレトロウイルス原液に ml 当たり 2×10^6 個の細胞で再懸濁した。細胞を 37 で 4 時間インキュベートした。感染後、細胞を洗浄しそして 5 % 子牛胎児血清および $50 \mu\text{M}$ β - メルカプトエタノールを補給した RPMI 1640 培地に再懸濁した。ml 当たり 10^6 個の細胞の濃度で細胞懸濁液 5ml を各 6cm^2 皿に塗布した。培養物を 8 週間まで維持し、新鮮な培地を 1 週間に 1 度添加した。非粘性性造血細胞の濃度が ml 当たり 10^6 個を超える場合に、培養物が形質転換したと考えた。

8.1.2. 種々の方法

セクション 8.1.1 に記載したトランスフォーメーションアッセイとは別の技術は上記のセクション 6.1 に記載されているものである。

8.2. 結 果

BCR - ABL - 誘導発がん誘発に対する GRB - 2 結合の生物学的関連性を測定するために、BCR - ABL が繊維芽細胞および造血細胞をトランスフォームする能力に対する、GRB - 2 と会合するのに必要な突然変異チロシン - 177 の影響を調べた。ヘルパーフリーの野生型のレトロウイルス原液および突然変異 BCR - ABL 型を使用して Rat1 繊維芽細胞および新たに単離したマウス骨髄細胞に感染させた。GRB2 および hSos - 1 の両者ともこれらの細胞型で発現することが示された (Lowensteinら, 1992, *Cell* 70:431 - 442; Bowtellら, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6511 - 6515; Chardinら, 1993, *Science* 260:1338 - 1343)。Rat1 繊維芽細胞のトランスフォーメーションを軟寒天でのコロニー形成により検定した (Lugoら, 1989, *Mol. Cell. Biol.* 9:1263 - 1270)。造血細胞トランスフォーメーションを pre - B - リンパ球の成長を支持する条件下で感染マウス骨髄細胞を培養することにより検定した (McLaughlinら, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6558 - 6562)。野生型 BCR - ABL と対照的に、P185 (Y177F) タンパク質は造血細胞を形質転換せず、Rat1 細胞を形質転換する能力の減少を示した (下の表 1 を参照されたい)。これらの結果は、Y177 を欠失している P185 ($\Delta 176 - 426$) 突然変異体が Rat1 繊維芽細胞および造血細胞の両者でトランスフォーミング活性の減少を呈するという以前の観察と一致する (Mullerら, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11:1785 - 1792; 表 1)。P185 ($\Delta 176 - 426$) は P185 (Y177F) より、特に G418 選択の後で Rat1 繊維芽細胞のトランスフォーメーションにおいてさらに顕著な欠失を示す。BCR 第一エクソンの Y177 の下流にある配列はホスホセリン / ホスホトレオニン依存形式で SH2 - ドメインに結合していることが示された (Peudergastら, 1991, *Cell* 66:161 - 171; Mullerら, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11:1785 - 1792)。2 種の SH2 - 結合部位がこの領域内で同定され (A および B と名付けられた)、そしてこれらの部位の除去により繊維芽細胞の BCR - ABL - 媒介トランスフォーメーションにとって重要な特異的タンパク質相互作用を停止できるであろう。P185 (Y177F) および P185 ($\Delta 176 - 426$) の両者とも造血細胞でトランスフォーミング活性を示さなかった。BCR - ABL タンパク質の形質転換活性における差異はタンパク質発現のレベル差によるものではなかった。

表 1

レトロウイルス ^a 構築物	Rat 1 ^b #コロニー/10 ⁵ 細胞		骨髓 ^e 形質転換体/総計
	急性感染 ^c	G418 選択 ^d	
野生型P185	37	690	11/12
P185(Y177F)	0	40	0/14
P185 (Δ176-426)	0	10	0/9
ベクター	0	0	0/7

上付きの文字

a 異なるP185 BCR-ABL型の名前。

変異または欠失アミノ酸をカッコ内に示す。

b 検定当たり2枚のプレートで、構築物当たり4～5種の独立した検定法で測定した寒天内のコロニー形成の平均頻度。

c ヘルパーフリーレトロウイルス原液で感染3日後に、細胞を寒天に塗布した。

d ヘルパーフリーレトロウイルス原液で感染3日後に開始し、細胞を12～15日間、G418(0.5mg/ml)を用いて選択した。

e 塗布した培養物の全数をこえて、形質転換したリンパ球の成長がみられた高密度骨髓培養物の数。データは3種の独立した実験を示す。各実験において、各レトロウイルス原液で感染後に細胞培養物を標本にした。

種々のBCR - ABL型を発現する細胞の溶解物質のウェスタンブロット分析により、相当するレトロウイルスでRat1繊維芽細胞を感染後の、比較できる定常的なタンパク質の値が示された。ウェスタンブロット分析では、RAT1細胞を、P185BCR - ABCの野生型および突然変異体(Y177F)型またはコントロールベクターをコードするレトロウイルスで感染させた。感染3日後に、細胞を溶解し、そして抗 - ABLマウスモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法を実施した。免疫反応帯をECL検出系(Amersham)を用いて可視化した。

9.実施例：ras反応性エレメントプロモーターからのras依存的なBCR - ABL活性の転写
本節に記した実施例においてBCR - ABL細胞内PTK/GRB - 2結合はrasシグナル伝達経路を活性化することが示されている。

9.1.材料と方法

9.1.1.転写活性化アッセイ

10

20

30

40

50

ras反応性エレメント (ets/AP - 1) プロモーターからの発現の転写活性化は本質的には既述の方法に従った (Clarkら, 1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:4887 - 4891; Hauserら, 1993, Methods in Enzymology, 印刷中)。簡単に記せば、NIH 3T3細胞を1 μ gのpB4X - CATクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼレポータープラスミド (Wasylykら, 1989, Mol.Cell.Biol. 9:2247 - 2250) 及び5 μ gのpZIP H - ras (17N) (Feigら, 1988, Mol.Cell.Biol. 8:3235 - 3243) の存在または不在で明示したBCR - ABL変異体を含む0.5 μ gのpSR α MSVTkneoを用いてトランスフェクトした。トランスフェクションは60mmの皿を用いて2通りずつ行い、細胞は48時間後に採取した。250mMトリス塩酸 (pH7.8) 100 μ l中で凍結融解して細胞を溶解した後、遠心して細胞の破片を取り除き、上清を62で加熱して内在性のアシルトランスフェラーゼを変性させた。さらに遠心した後、上清を50 μ lずつ取り、0.1 μ Ciの¹⁴Cクロラムフェニコール (NEN) 及び250mMトリス塩酸中に0.34mMアセチルCoAを含む液で最終反応容量を140 μ lとして45分間インキュベートし、CAT活性を測定した。反応は500 μ lの酢酸エチル抽出によって終わらせ、真空下で蒸発させ、残存したペレットを再溶解し、シリカゲルプレートで薄層クロマトグラフィーをおこなった。溶剤としては、5%メタノール/95%クロロホルム (v/v) を用いた。AMBISベータスキャナーで定量した。

9.1.2. その他の技法

第8.1.1節に記載したトランスフォーメーションアッセイ以外の技法については、上記の第6.1節に記載したとおりである。

9.2. 結 果

GRB - 2のBCR - ABLとの結合が発癌性の形質転換を可能とする作用機作は、Sos - 1 グアニンヌクレオチド交換因子を経由してrasを直接的に刺激することによるものである。BCR - ABLとGRB - 2との相互作用が、ras経路に直接的に作用するか否かを調べるため、転写活性化アッセイを行った。発癌性のrasはras反応性エレメント (例えば、ets - 1 及びAP - 1 DNAモチーフ; Hauserら, 19993, Methods in Enzymology, 印刷中) からの転写率を増加させる。さらに、プロテインチロシンキナーゼおよびセリン/トレオニンキナーゼを含む広範な機能を有するガン遺伝子は、ras反応性エレメント、例えばets/AP - 1モチーフを有するプロモーターからの転写を活性化しうる (Schweighofferら, 1992, Science, 256:825 - 827)。各種のガン遺伝子のets/AP - 1含有プロモーターからの転写活性化能と細胞形質転換能との間には相関関係がある (Wasylykら, 1988, ENBO.J. 7:2475 - 2483)。上述のとおり、トランス活性化アッセイは、ガン遺伝子機能の分析のための細胞増殖及び腫瘍原性研究を補完するものである。

BCR - ABLの野生型と変異型について、ets/AP - 1からの転写活性化能を比較した。CATレポーターは β - グロビンプロモーターの制御下にあり、4個の縦列のras反応性エレメントを有している (pB4X - CAT)。発癌性のrasはこのエレメントからの転写率を15倍増加させることが示されている (Schweighoffer, Science, 256:825 - 827)。図1に示すとおり、野生型BCR - ABLで誘導した活性化は、ras (17N)、これは最も強力な阻害性の変異体で、ras機能を中和することが示されているものであるが (Feigら, 1988, Mol.Cell.Biol., 8:3235 - 3243; Thomasら, 1992, Cell, 68:1031 - 1040; Woodら, 1992, Cell, 68:1041 - 1050) このras (17N) のコトランスフェクションによって消失する。このことは、BCR - ABLによって誘導された転写活性がrasによって媒介されることを示している。BCR - ABL変異体のP185 (Y177F) 及びP185 (Δ 176 - 425) はGRB - 2結合を欠いているが、それらの変異体はこのプロモーターからの転写トランス活性化にほとんど影響を及ぼさないことは意義深いことである。これらのBCR - ABL変異体で示された低いレベルのトランス活性化は、これらの変異体が野生型P185 BCR - ABLに比し低い形質転換能を有することと相関している (上記の表1参照)。

さらに、野生型BCR - ABL含有レトロウイルスをRat1の繊維芽細胞に感染させるとras - GTP画分が増加する。すなわち、Rat1細胞にP185 BCR - ABL野生型のヘルパーフリーレトロウイルス又はベクター (対照) を感染させた。感染の2日後に、リン酸塩不含の培地で³²P - オルトリン酸 (0.5mCi/ml) で16時間、細胞をラベルした。細胞を溶解させ、抗rasモノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体でras - 免疫沈降させた。rasに結合したグアニンヌクレオチドは、解離させた後、0.75M KH_2PO_4 (pH3.5) 中のPEI - セルロースプレートで薄層クロマトグラフィーにより分離した。rasに結合したGDP及びGTP量のAMBISベータスキャナーによる定量では中程度だが再現性のある増加を示した。

10. 実施例：シグナル伝達能のないGRB2は形質転換された細胞の表現型を復帰させる

次の例は、BCR/ABLとGRB2が関与するシグナル伝達経路が分断されると、形質転換によって生じた表現型が復帰され得ることを示している。シグナル伝達能のないGRB2変異体の発現が増大すると、Rat1細胞のBCR/ABLで誘導された増殖が復帰する。また、シグナル伝達経路の分断によって、慢性骨髄性白血病患者から得られたBCR/ABLを発現する細胞 (K562細胞) 及びPDGFレセプター依存性の形質転換細胞の増殖も阻害される。

10

10.1. 材料と方法

GRB2遺伝子の変異体は、N、末端又はC末端のどちらかからSH3ドメインを欠失することによって構築された。GRB2の完全長型及び末端切断型は、改変pCGNプラスミドベクター (Tanakaら, *Cell*, 60:375 - 386, 1990) のBamH I部にPendergastら, *Cell*, 75:175 - 183, 1993記載の方法で挿入した。このベクターにはヒグロマイシン抵抗性遺伝子をSV40複製起点の上流に挿入してある。トランスフェクトされら構築物からの内在性のGRB2タンパク質を区別するため、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンエピトープをコードする配列 (Pati, U.K., *Gene*, 114:285 - 288, 1992) を変異体タンパク質のN末端に同じ読み枠で融合させてある。これと同じ抗原性標識を野生型GRB2遺伝子にも融合させた。

BCR/ABLで形質転換されたRat1繊維芽細胞は上記実施例8.1.1に記載の方法で確立した。GRB2構築物はRat1 - BCR/ABL細胞系及びラットグリオーマ細胞系C6 (ATCC CCL 107) に標準的なリン酸カルシウムトランスフェクション法 (Molecular Cloning Techniques, Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrookら編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 及びMuller) を用いてトランスフェクトした。トランスフェクト後、Rat1細胞を24時間培養し、G418薬剤 + ヒグロマイシン (Sigma) に7 - 9日間さらした。2種の薬剤によって選択された細胞群を軟寒天にまき、内在性BCR/ABL, GRB2, トランスフェクトされたGRB2のレベルをウエスタンブロットで測定した。相異なるGRB2構築物を発現している個々のクローン由来の細胞系も確立した。トランスフェクトされたC6細胞の場合には、Muller (上述参照) の方法に従ってヒグロマイシン含有培地で10日間培養することにより、細胞を選択した。薬剤による選択の後、細胞を0.5% FCSとPDGF (1ng/ml) を含有する軟寒天培地にまいた。10日目

20

30

に0.4mmより大きいコロニー数を数えた。GRB2構築物の発現は、Pendergastら, *Cell*, 75:175 - 185, 1993の方法に従って免疫沈降反応で調べた。簡単に記せば、BCR/ABL - GRB2を発現しているRat1細胞を溶解させ、抗ABL pEx4抗体で免疫沈降反応させ、免疫沈降物をin vitroオートキナーゼアッセイにかけた (Pendergastら, 上述参照)。サンプルは、SDS - PAGEゲルで分析し、オートラジオグラフィーで目視可能なものとした。2つの目の実験においては、細胞を10mM トリス塩酸 (pH7.4)、1% SDS、1mM PMSF中で溶解し、各サンプルからの15µgのタンパク質をSDS - PAGE (15%) を用いて分離した。得られたタンパク質は、電気泳動でニトロセルロースフィルターに移し、抗GRB2マウスモノクローナル抗体 (Transduction Laboratories) で免疫ブロットした後、セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合させたヤギ抗マウスモノクローナル抗体 (Bio Rad) とインキュベートした。タンパク質はEnhanced Chemiluminescence検出システム (Amersham) で目視可能とした。

40

軟寒天アッセイは既述の方法 (Lugoら, *Mol. Cell. Bio.*, 9:1263 - 1270) に従って行った。薬剤によって選択された細胞群は、それぞれの細胞型のクローニング効率によって $10^3 \sim 5 \times 10^4$ 個/6cm² 皿の範囲の密度でプレートした。サンプルは20% ウシ胎児血清を含有する培地に2通りずつまいた。肉眼で見えるコロニー (0.4mmより大) を14日後に数えた。データはトランスフェクトされ、薬剤で選択された細胞群について行った3ないし5回の独立した実験でのコロニー数の平均を示している。Rat1 - BCR/ABLの増殖に関するデータは、適当な構築物でトランスフェクトした3つの独立したRat1 - BCR/ABLのクローンからの細胞系についてそれぞれ2 - 3回の別の実験を繰り返して得たものである。上記のとおり

50

り、このデータは7つの独立した実験で観察されたコロニー数の平均を示している。
K562 (ATCC CRL 243) 細胞は標準的なエレクトロポレーション法を用いて、GRB2構築物で
トランスフェクトした。トランスフェクトした後、18～24時間培養し、ヒグロマイシン (500 µg/ml) に2日間さらした。薬剤による選択後、生細胞数はトリパンブルー染色されない細胞数を数えることによって決定した。軟寒天に同数の生細胞をまいた。

10.2. 結 果

10.2.1. Rat1細胞におけるGRB2の発現

Rat1 - BCR/ABL細胞でのGRB2 N末端変異タンパク質の発現は、正常な表現型への復帰をひきおこす。GRB2 N末端変異体を発現する細胞群は液体培養で単層をなし、集密状態に達すると接触障害を示した。GRB2 N末端変異体を発現するRat1 - BCR/ABL細胞は、空のベクターを発現している細胞と比較すると、軟寒天中にコロニーを形成する能力ははるかに低いことは重要である (表2参照)。GRB2C末端変異体を発現する細胞は液体培養で単層をなすが、集密状態になっても休止しなかった。GRB2 C末端変異体を発現するRat1 - BCR/ABL繊維芽細胞の軟寒天中での増殖は、GRB2 N末端変異体で見られた程ではないが抑制された。N末端変異体及びC末端変異体を発現する細胞群には変異型タンパク質と野生型GRB2タンパク質の類似した比が示されているので、N末端変異体がBCR/ABLによって誘導される形質転換をより強く抑制することは単に2種の変異体のレベルの差によるものではないであろう。詳細には、p210 BCR - ABLのみ、あるいはさらに野生型GRB2又は末端切断型GRB2を共に発現しているRat1細胞を溶解し、抗ABL抗体と免疫沈降反応をさせた。沈降反応生成物をin vitroオートキナーゼアッセイし、サンプルはSDS - PAGE (8%ゲル) で分析した。対照に比しGRB - 2発現の増大している細胞においてもABLキナーゼ活性に変化は認められなかった。さらにp210 BCR - ABLのみ、あるいはさらに野生型GRB2又は末端切断型GRB - 2を共に発現しているRat1細胞を溶解させ、1つのクローンの細胞溶解物から得たタンパク質を電気泳動でニトロセルロースフィルターに移し、抗GRB - 2モノクローナル抗体を用いて免疫プロットした。GRB - 2形質転換体はすべてほぼ同程度のGRB2タンパク質を発現した。これらの相異はむしろ2つのSH3ドメインがSOSと異なる親和性で結合するか、あるいは異なる基質と結合することを示しているのかもしれない。このようにGRB - 2のSH3欠失変異タンパク質は、細胞中で内在性の野生型GRB2と等モル量又はより多量に存在する場合、BCR/ABLによって誘導される形質転換の主たる負の阻害剤となる。
N'末端又はC'末端GRB2変異体と対照的に、Rat1 - BCR/ABL繊維芽細胞中で野生型GRB2の発現が増大した場合は、形質転換された表現型をより目立たせると考えられる。トランスフェクトされた野生型GRB2構築物を発現している、薬剤によって選択された細胞群は、空のベクターでトランスフェクトされた細胞と比較すると軟寒天中のコロニー数が常に25～30%多かった (表2)。これらのデータは、Rat1繊維芽細胞のBCR/ABLによって誘導される形質転換においてGRB2タンパク質が制限エフェクターである可能性を示唆している。

表 2

構築物	Rat 1	K562	C6
空のベクター	566	187	520
野生型GRB2	734	209	577
N末端切断GRB2	14	13	2
C末端切断GRB2	119	86	3

(コロニー数 / 1×10^4 播種細胞)

10.2.2. K562細胞でのGRB2変異体の発現

GRB2のSH3部分の変異体はヒト白血病細胞の増殖も阻害する。GRB2構築物をK562細胞に導入した。K562細胞は、p210 BCR/ABLを発現している細胞で芽球発症の慢性骨髄性白血病患者から確立した系である。トランスフェクション及び48時間薬剤選択を行った後、内在性

のBCR/ABL, GRB2及びトランスフェクトされたGRB2のレベルをウエスタンブロット法で求めた。同時に生細胞を軟寒天にまいた。GRB2 N末端変異体タンパク質を発現しているK562細胞の培養では、空のものをトランスフェクトした対照に比べ、軟寒天中のコロニー数が1/10であった(表2)。Rat1 - BCR/ABL繊維芽細胞で認められたと同様に、GRB2 C末端変異体もK562のコロニー形成を阻害したが、その程度はN末端変異体より低かった。これらのデータは、GRB2によって媒介されるシグナル伝達が、BCR/ABLによって引き起こされるヒトの悪性腫瘍発生において重要不可欠な要素であることを示唆している。

10.2.3. C6グリオーマ細胞でのGRB2の発現

GRB2構築物をラットC6グリオーマ細胞にも導入した。C6グリオーマ細胞の形質転換された増殖性の表現型はPDGF受容体活性依存性である(Zhangら, *Neurol. Res.* 14(5):397 - 401, 1992)。PDGF受容体がGRB2と相互作用することは知られている(Lowensteinら, 1992, *Cell* 70:431 - 442)。表2に示すとおり、シグナル伝達能のないGRB2変異体の発現はコロニー形成を顕著に阻害する。このデータは、GRB2シグナル伝達の阻害は、受容体チロシンキナーゼ活性化に依存する形質転換細胞の増殖を阻害するために使用しうることを示している。

10

11. 実施例：シグナル伝達能のないGRB2はモデル動物での腫瘍増殖を妨げる

本実施例は、シグナル伝達能のないGRB2を発現している細胞は、もはや動物に腫瘍を形成しえないことを示しており、BCR/ABLシグナル伝達経路の分断によって動物のがんを治療しうることを示唆している。

11.1. 材料と方法

20

GRB2(野生型及び変異体)及びBCR/ABLを発現しているRat1細胞は上記第10.1節に記載の方法で調製した。ヌードマウス(1群4匹)の左側腹部の皮下に、野生型GRB2、N末端切断GRB2、C末端切断GRB2のいずれかとp210 BCR/ABLを共に発現しているRat1細胞を注射した。p210 BCR/ABLのみを発現している細胞(100µl中 2×10^6 細胞)は各マウスの右後肢に皮下注射し、その個体における対照とした。マウスは移植3週間後に屠殺し、腫瘍の大きさを測定した。

11.2. 結果

表3に示した結果は、シグナル伝達能のないGRB2タンパク質の発現によってin vivoの腫瘍細胞の増殖が減少することを明瞭に示している。

表 3

30

投与群	左	右
野生型GRB2	0.5	0.5
N末端切断GRB2	0.3	0.7
C末端切断GRB2	<0.1	0.7

(数値は各群の腫瘍サイズの平均)

12. 実施例：ras活性化に及ぼすシグナル伝達能のないGRB2の影響

40

本実施例は、ここに記載したシグナル伝達能のないGRB2分子はその形質転換阻害活性に比例してBCR/ABLによって誘導されるras活性化を阻害することを示しており、GRB2と下流のシグナル伝達要素(ras活性化へ導く)との相互作用が分断されることを示唆している。

12.1. 材料と方法

ras反応性エレメント(ets/AP-1)プロモーターからの発現の転写活性化は上記第9.1節記載の方法で行った。Rat1細胞の形質転換、軟寒天アッセイ、免疫ブロッティング実験は上記第10.1節記載の方法で行った。

12.2. 結果

GRB2変異体の増殖阻害効果が、ras活性化を阻害するためであるか否かを調べるため、野生型又は変異型GRB2を過剰に発現しているRat1 - BCR/ABL細胞の溶解物を調製し、ras活性

50

化能を調べた。ras依存性転写活性化アッセイを用いることにより、N末端変異GRB2を発現しているRat1 - BCR/ABL細胞の溶解物は、空のベクターをトランスフェクトをした対照と比較して1/10～1/15の低いras活性化能を示した(図2)。C末端変異GRB2を発現している細胞の溶解物もN末端変異体で見られた程ではないがras活性化能の低下を示した。このN末端変異体とC末端変異体の阻害効果の差はそれぞれの持つBCR/ABL形質転換表現型を復帰させる能力と整合するものであった。

もしGRB2変異体タンパク質がシグナル伝達経路のrasより前の中間段階をブロックするのであれば、ras活性化を回避する遺伝子による形質転換は影響を受けないはずである。この仮説を検証するために、GRB2構築物を、活性型rafで形質転換したRat1細胞にトランスフェクトさせた。rafはセリンキナーゼであり、同じシグナル伝達経路でrasの下流で、マイトジェン作用を示す(Kolchら, *Nature*, 349:426, 1991)。ヒグロマイシンで選択した後、細胞群を寒天にまいた。N末端又はC末端GRB2変異体を発現しているRat1/v-raf細胞は軟寒天中で空のベクターでトランスフェクトした対照の細胞と同数のコロニーを形成した(表4)。さらに、SH3変異体を野生型GRB2の2倍以上発現している細胞系は、軟寒天中でのそれ自体の増殖能を阻害しなかった。これらのデータは、GRB2変異タンパク質が、BCR/ABLのマイトジェンシグナルをrafの上流のシグナル伝達経路を切断することにより阻害することを示唆している。

表 4

構築物	Rat 1/v-raf
空のベクター	620
野生型GRB2	665
N末端切断GRB2	653
C末端切断GRB2	598

(コロニー数/ 1×10^4 播種細胞)

13. 実施例：GRB2変異体はヒトPh¹陽性白血病細胞系K562の増殖を阻害し、分化を誘導する。下記の実施例において、GRB2のSH3変異体タンパク質は、BCR/ABLで誘導される造血系細胞の発がん性表現型を復帰させる能力があるのみならず、K562細胞の赤血球系への分化をひきおこす能力があることを示している。

13.1. 材料と方法

形質転換アッセイ：軟寒天アッセイは上記の第8.1.1節記載の方法で行った。各細胞型のクローニング効率によって $10^3 \sim 5 \times 10^4$ 個/6cm²皿の範囲の密度で同数の生細胞を軟寒天中にまいた。サンプルは20%ウシ胎児血清を含有する培地に2通りずつプレートした。14日後に肉眼で見えるコロニー(>0.4mm)の数を数えた。コロニー数は細胞数が 10^4 となるように調整した。

転写活性化アッセイ：ras反応性エレメント(ets/AP-1)プロモーターからの発現の転写活性化は既述の方法(Pendergastら, 1993)に従って行った。簡単に記せば、正常Rat1細胞及びGRB2タンパク質を発現している形質転換Rat1/BCR - ABL細胞とを1 μ gのpB4x - CATレポータープラスミドでトランスフェクトし、トランスフェクションの48時間後に細胞を採取し、CAT活性を第9.1.1節記載の方法で測定した。

結合アッセイ、in vitro自己リン酸化と免疫ブロッティング：

in vitroの結合アッセイ、in vitroの[γ -³²P]ATPラベル及び免疫ブロッティングの方法は本質的には上記の第6.1.6節及び第6.1.7節記載のとおりに行った。

ヘモグロビンタンパク質の定量：トランスフェクトされたK562細胞群に存在するヘモグロビン量は本質的にはFeinsteinら, 1992, *Oncogene* 7:1853 - 1857に記載の方法で定量した。簡単に記せば、各細胞群から溶解物を調製し、総タンパク量をBradfordアッセイ法で求めた。各サンプルについて、20 μ gの総細胞性タンパク質を90%酢酸中に1%ベンジジン

を含む溶液及び新たに調製した過酸化水素と混合した。室温で20分間インキュベートした後、10%酢酸溶液を加え、515nmの吸光度を測定した。比較対照としてヒトのヘモグロビンを用いた。

腫瘍増殖アッセイ: Rat1/BCR - ABL繊維芽細胞の腫瘍形成性について本質的には、既述の方法 (Lugoら, 1989, *Mol. Cell. Biol.* 9:1263 - 1270) に従って評価した。簡単に記せば、野生型又は変異GRB2構築物でトランスフェクトしたRat1/BCR - ABL繊維芽細胞群から 2×10^6 個の細胞を取り、ヌードマウスの左後側腹部に接種した。その個体での対照として空のベクターでトランスフェクトしたRat1/BCR - ABL細胞を各マウスの右後側腹部に接種した。各Rat1/BCY - ABL細胞群あたり4匹のマウスを用いた。接種3週間後、マウスを屠殺し、左右の側腹部の腫瘍の大きさを比較し、湿重量(グラム)で記録した。

10

13.2. 結 果

下記の実験で、GRB2のSH3変異体タンパク質が造血系細胞においてBCR/ABLによって誘導される発癌性表現型を復帰しうるか否かを評価した。GRB2構築物をPh¹陽性のK562細胞に導入した。トランスフェクション及びヒグロマイシン存在下で48時間培養後、免疫プロット法で内在性及びトランスフェクトされたGRB2タンパク質を定量した。同時に細胞を液体培地から採取し、生細胞を同数ずつ軟寒天中にまいた。各実験においてトランスフェクトされたGRB2変異体のレベルは内在性のGRB2より少なくとも5倍は多かった。GRB2 N末端切断変異体を発現しているK562細胞をまいた培養では空のベクターでトランスフェクトした対照に比べ1/10のコロニー数を示した(上記表2)。Rat1/BCR - ABL繊維芽細胞で見られたのと同様に、GRB2 C末端切断変異体も、N末端変異体より程度は低いもののK562のコロニー形成を阻害した(上記表2)。これらのデータは、GRB2によって媒介されるBCR - ABL誘導ras活性化はBCR - ABLが誘導するヒトの悪性腫瘍発生に重要不可欠な要素であることを強く示唆する。

20

K562細胞系は高レベルの野生型GRB2タンパク質を安定に発現しており、培地中で維持されうるとはいえ、N末端切断又はC末端切断GRB2タンパク質を発現する1つのクローンから由来する細胞系を確立することは不可能であった。K562細胞は分化能とヘモグロビン合成能を保持している (Anderson, L.C.ら, 1979, *Int. J. Cancer* 23:143 - 147; Rowley, P.T.ら, 1981, *Exp. Hematol.* 9:32 - 37; Feinstein, E.ら, 1992, *Oncogene* 7:1853 - 1857)。以前の研究によれば、チロシンキナーゼ活性阻害剤はK562細胞を赤血球系へ分化させうることを示していた (Fukazawa, H.ら, 1991, *Biochem. Pharm.*, 42:1661 - 1671; Anafi, M.ら, 1993, *Blood* 82:3524 - 3529)。

30

GRB2変異体の発現が同様の分化過程をおこすか否かを調べるため、軟寒天アッセイに用いたトランスフェクトされたK562細胞の一部を取って溶解させ、ヘモグロビンタンパク量を各細胞群毎に定量した。N末端切断又はC末端切断変異体を発現している細胞ではヘモグロビンタンパク量の劇的な増加が認められた。これに対し、野生型GRB2タンパク質を高レベルで発現しているK562細胞では、空のベクターでトランスフェクトした対照と比較してヘモグロビンの増加は認められなかった。このように、ここで用いられたGRB2変異体はBCR/ABL形質転換表現型を復帰させるのみならず、K562細胞を赤血球系へ分化させる能力も持っている。これらのデータは、BCR - ABLが、部分的に通常の分化をras依存的にブロックすることにより、造血系細胞を形質転換しうることを示唆している。

40

13. 実施例: タンパク質/チロシンキナーゼの相互作用を妨害する化合物を特定するスクリーニングアッセイ

ここに提示する実施例では、試験物質が、結合相手である複合体との相互作用を阻害するポテンシャルを検定する手段を記載する。こうした結合相手は、たとえば、アダプタータンパク質と、こうしたアダプタータンパク質に結合する分子、たとえば、活性化されたチロシンキナーゼ分子、ならびに他のタンパク質、たとえばSHCタンパク質を含むものとすることができる。この実施例で特定する化合物は、細胞の成長制御をモジュレートしうる可能性があり、腫瘍形成ならびに細胞増殖性疾患を調節しうる可能性がある。

ここに記載する特定のアッセイでは、リン酸化したチロシンキナーゼタンパク質と結合しうるアダプター - GST融合タンパク質を、リン酸化したチロシンキナーゼタンパク質を固

50

相に固定化しておいたものとともに、試験物質の存在下でインキュベートする。試験物質が、アダプタータンパク質 - GST融合タンパク質と、チロシンキナーゼ分子との相互作用を阻害しうる場合には、固定化したチロシンキナーゼ分子に結合するアダプター - GST融合タンパク質の量が、試験物質が存在しない場合にチロシンキナーゼ分子に結合するアダプター - GST融合タンパク質の量と比べて、検出が可能な程度に減少する。

こうした例を、GRB - 2 と EGF - R との相互作用を阻害する物質のスクリーニングに関して詳しく例示する。しかし、これと同一の原理を、任意のチロシンキナーゼタンパク質あるいはチロシンキナーゼのチロシンリン酸化基質（たとえば、SHC、ホスファターゼ1D）と、このものと相互作用しうるアダプタータンパク質との相互作用を阻害する物質を検出する際にも適用することができる。

10

アダプター - GST融合タンパク質：

ここで使用するアダプター - GST（グルタチオン - S - トランスフェラーゼ）融合タンパク質は、GRB - 2/pGEX構築物で形質転換した大腸菌での発現によって産生したGRB - 2 - GST融合タンパク質とした。こうした融合タンパク質のGRB - 2部分は、GRB - 2タンパク質のSH2ドメインのみから構成されるものとした。形質転換細胞は、アンピシリンを加えたルリアブロス（LB）中で生育させる。600nmでのOD（光学濃度）が0.3に達した後、細胞をイソプロピルβ - D - チオガラクトピラノシド（IPTG）で6時間にわたって誘導して、誘導タンパク質を発現させる。

6時間の発現期間の後、細胞を沈殿させ、4 にて10分間にわたって10,000 × g でペレット化し、洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に再度懸濁させた。次に、細胞を、超音波処理（6ストローク、5秒/ストローク）によって破壊した。不溶性の物質を、4 にて10分間にわたって10,000 × g で遠心分離することによって取り除き、得られた上清を、グルタチオン - セファロースカラムに通した。結合したGRB - 2 - GST融合タンパク質を、5mMの還元グルタチオンでカラムから溶出させ、PBSに対して透析した。

20

固定化したチロシンキナーゼ分子：

ここで使用するチロシンキナーゼ分子は、上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ（EGF - R）である。EGF - Rは、EGF - Rを過度に発現している細胞、たとえばA431（ATCC CRL 1551）細胞系から単離する。細胞を、HNTG緩衝液（20mMヘプス/HCl、pH7.4;150mMNaCl; 1.0%トリトンX - 100;5%グリセロール;1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）、1mg/Lアプロトニン、1mg/Lロイペプチン;10mg/Lベンズアミジン）中で溶解する。

30

EGF - Rタンパク質を、以下に説明するようにしてマイクロタイタープレートに固定することによって、細胞溶解産物から単離する。その後、EGF - Rを以下に説明するようにしてin vitroでリン酸化する。

EGF - R分子のマイクロタイタープレートへの固定化を行う。マイクロタイタープレートの調製にあたっては、まず、プレートのウェルを、4 にて一晚、EGFRの細胞外ドメインに対して誘導された抗EGF - Rモノクローナル抗体（UBI、#05 - 101）（PBS中の濃度：最終容量150μl/ウェルで、0.5μg/ウェル）でコーティングする。

一晚のコーティングの後、マイクロタイタープレートのウェルからコーティング用溶液を取り除き、かわりに、ブロッキング用緩衝液（ドライミルク5%のPBS溶液）を加えて室温で30分間おき、その後ブロッキング用緩衝液を取り除き、ウェルをTBST緩衝液（150mMNaCl;50mMトリス - HCl、pH7.2;0.1%トリトンX - 100）で4回洗浄する。

40

EGF - R発現細胞の細胞溶解産物を、各ウェルに、150μlのPBSへの溶液として加え、室温で振とうしながら30分間インキュベートする。結合しなかったEGF - Rを、ウェルをTBST緩衝液で5回洗浄することによって取り除く。ウェル1つあたり、約50 - 100ngのEGF - Rタンパク質が結合する。

内在性ホスファターゼ活性が高い、EGF - Rを過度に発現する細胞系、たとえばA431株化細胞を使用することが重要である。これは、細胞溶解及び固定化抗体とのインキュベーションの間に、ホスファターゼによってリン酸基がEGF - R分子から除去され、内在性のアダプタータンパク質、たとえばGRBタンパク質がEGFRと結合し、場合によって人為的な結果が生じることが防止されるからである。また、使用する細胞系が容易に飢餓化しうるも

50

のである場合には、細胞溶解を行う前に、細胞を飢餓化しておくこともできる。

自己リン酸化EGF - Rの作成：

以下に記載するin vitroのキナーゼ反応によって、自己リン酸化されたEGF - Rが得られた。キナーゼ反応は、15 μ lのATP/Mn²⁺ミックス（50mMのMnCl₂、最終濃度10 μ M ATP、総容量150 μ l）を加えることによって開始した。プレートは、室温にて5分間、振盪しつつインキュベートし、上清を吸引し、次に、プレートをTBSTで5回洗浄した。

アッセイの手順：

30ngのGRB - 2 - GST融合タンパク質（すなわち、EGF - R:GRB - 2タンパク質の比で1:1）、あるいは5ngのGRB - 2 - GST融合タンパク質（すなわち、EGF - R:GRB - 2タンパク質の比で4:1）を、リン酸化したEGF - Rでコーティングしたマイクロタイタープレートのウェルに、インキュベーション用緩衝液（0.1Mのリン酸カリウム緩衝液、pH6.5）中で、室温にて30分にわたって、ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解した試験物質の存在下で加える。対照のウェルは、試験物質を用いずに、GRB - 2 - GST融合タンパク質とともにインキュベートする。

インキュベーションの後、ウェルをTBSTで十分に洗浄する。次に、固定化EGF - Rと結合したGRB - 2 - GST融合タンパク質の量を、好ましくは融合タンパク質のGST部分に対する精製ウサギ抗血清（AMRAD, オーストラリア、ニュービクトリア、カタログ番号00001605）を用いて測定する。インキュベーションは、室温にて30分間行う。インキュベーションの後、抗体を除去し、ウェルをTBSTで十分に洗浄する。次に、結果が目に見えるようにするために、ウェルを、TAGOヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ抗体とともに、室温にて30分間インキュベートする。インキュベーションの後、抗体を除去し、ウェルを水道水、次にTBSTで洗浄する。基質溶液であるABTS（2,2' - アジノビス（3 - エチルベンズチアゾリンスルホン酸））/H₂O₂（10mlのABSTに対して1.2 μ lのH₂O₂）をウェルに加え、室温にて20分間インキュベートする。5NH₂SO₄を加えることによって反応を停止する。410nmでのODを各ウェルについて測定する。この方法を用いると、GRB - 2 - GSTがバックグラウンドに対して2ngという少量であっても、検出を行うことが可能である。

また、試験物質とGRB - 2 - GST融合タンパク質をEGF - Rのウェルでインキュベートしてから、ビオチニル化したモノクローナル抗体、たとえばEL - 6あるいはEL - 12を使用して、融合タンパク質の結合を検定することもできる。こうした抗体によって認識されるエピトープは、GRB - 2のSH2ドメインに位置しているものの、GRB - 2のリン酸化EGFRとの結合を妨害しない。次に、これらの抗体の結合を、ストレプトアビジン - ビオチニル化したホースラディッシュペルオキシダーゼ反応物質を使用して測定する。

さらにまた、試験物質とGRB - 2 - GST融合タンパク質のEGF - Rのウェルでインキュベートしてから、融合タンパク質の固定化EGFRとの結合についての検定を、インキュベーション用緩衝液中で1mM 1 - クロロ - 2,4 - ジニトロベンゼン（CDNB）及び1.54mg/mlの還元グルタチオンとともにインキュベートすることによって行うこともできる。次に、ODを340nmで測定する。この反応は、ODが1.0となるまで線形であり、競合性のGST阻害物質を用いて、マナービックおよびダニエルソン（Mannervik, B. and Danielson, U.H., 1988, CRC Critical Reviews in Biochemistry 23:238）に記載されたようににして停止することができる。

本明細書に記載した本発明に、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく数多くの改変や変更を加えることは、明らかである。以上で説明した特定の実施態様は、例として挙げただけであって、本発明は、添付した請求の範囲の用語によってのみ限定されるものである。

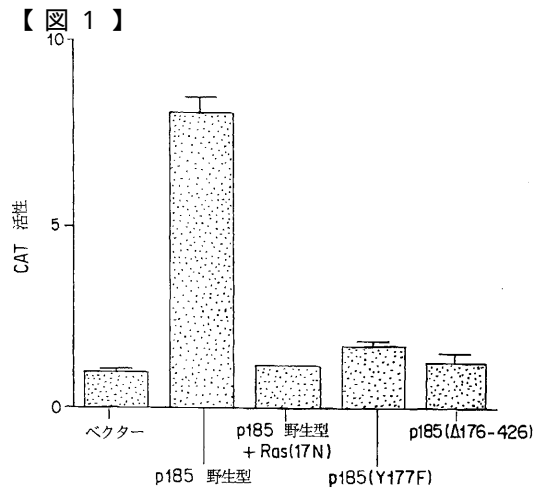


FIG. 1

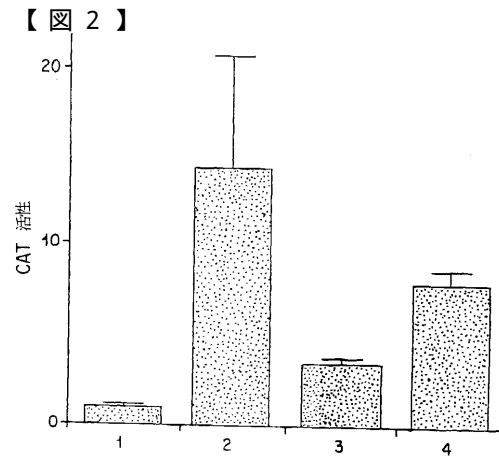


FIG. 2

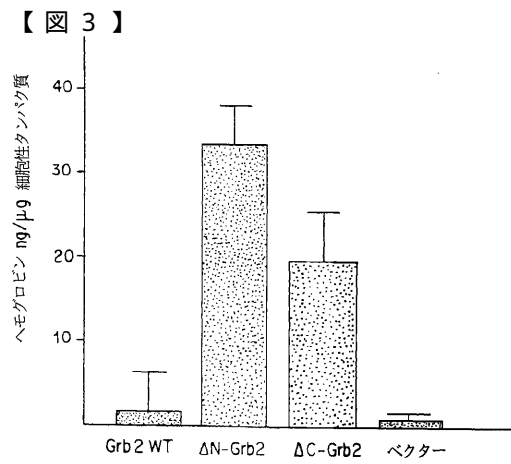


FIG. 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/573	G 0 1 N 33/573	A
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/574	

(73)特許権者

ドューク ユニバーシティー メディカル センター
 アメリカ合衆国 2 7 7 0 8 ノースカロライナ州 ダラム, アラン ビルディング 0 0 1 イー

(74)代理人

弁理士 平木 祐輔

(74)代理人

弁理士 石井 貞次

(74)代理人

弁理士 早川 康

(72)発明者 シュレシンガー, ジョセフ

アメリカ合衆国 1 0 0 1 1 ニューヨーク州 ニューヨーク, ウェスト, ワシントン スクエア
 3 7 番地

(72)発明者 ギシツキー, ミカイル エル.

アメリカ合衆国 9 4 3 0 1 カリフォルニア州 パロ アルト, ブライアント ストリート 3
 0 0 1 ビー番地

(72)発明者 ペンダーガスト, アン エム.

アメリカ合衆国 2 7 7 0 7 ノースカロライナ州 ダラム, ベイカーズ ミル ロード 5 4 2
 0 番地

(72)発明者 アップ, ハラルド

アメリカ合衆国 9 4 1 1 7 カリフォルニア州 サン フランシスコ, ベルヴェデレ ストリー
 ト 5 8 1 番地

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 Cell, 1 9 9 1 年, Vol.64, p. 281-302

Nature, 1 9 9 3 年 5 月 6 日, Vol.363, p. 45-51

Nature, 1 9 9 3 年 5 月 6 日, Vol.363, p. 83-85

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B 名)

C12Q 1/00 - 70

C07K 14/00 - 16/46

G01N 33/50 - 98

A61k 31/00 - 48/00

A61P 1/00 - 43/00

PubMed,

MEDLINE(STN)

BIOSIS/WPI (DIALOG)

EUROPAT(QUESTEL)