

(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2006-519800
(P2006-519800A)

(43) 公表日 平成18年8月31日(2006.8.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00	2GO45
C12Q 1/48 (2006.01)	C12Q 1/48 ZNAZ	4BO63
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 515A	4HO45
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/543 545D	
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/543 545F	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-504533 (P2006-504533)
 (86) (22) 出願日 平成16年3月4日 (2004.3.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年8月29日 (2005.8.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/002185
 (87) 国際公開番号 W02004/079326
 (87) 国際公開日 平成16年9月16日 (2004.9.16)
 (31) 優先権主張番号 03005186.6
 (32) 優先日 平成15年3月7日 (2003.3.7)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

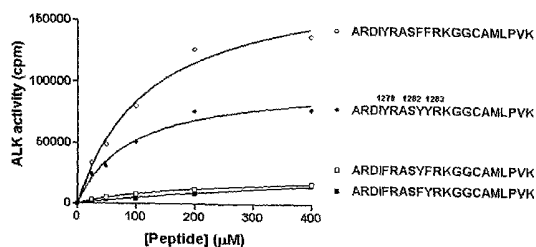
(71) 出願人 591030835
 イスティトゥト ナツィオナーレ ペル
 ロ ストゥディオ エ ラ クラ デイ
 トゥモリ
 ISTITUTO NAZIONALE
 PER LO STUDIO E LA
 CURA DEI TUMORI
 イタリア共和国, ミラノ, ヴィア ヴェネ
 ジアン 1 番地
 (74) 代理人 100094145
 弁理士 小野 由己男
 (74) 代理人 100117422
 弁理士 堀川 かおり

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 未分化リンパ腫キナーゼアッセイ、試薬及びその組成物

(57) 【要約】

ALKチロシンキナーゼ活性を検出する方法であって、i) ALKタンパク質又はそれらの機能性誘導体を配列番号1又は2から選択されるペプチド基質とともに、該ペプチドのリン酸化反応に適した条件下でインキュベートし、ii) リン酸化されたペプチドを検出する工程を含む方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A L Kチロシンキナーゼ活性を検出する方法であって、以下の工程、

- i) A L Kタンパク又はそれらの機能性誘導体を配列番号 1 又は 2 から選択されるペプチド基質とともに、該ペプチドのリン酸化反応に適した条件下でインキュベートし、
- ii) リン酸化されたペプチドを検出する工程を含む方法。

【請求項 2】

ペプチドが配列番号 1 の配列を有する請求項 1 の方法。

【請求項 3】

精製 A L Kタンパク又は A L K含有製剤を用いる請求項 1 の方法。

10

【請求項 4】

製剤が細胞溶解物である請求項 3 の方法。

【請求項 5】

機能性誘導体が、A L K配列の A L K全長残基 1 1 1 6 - 1 3 9 2 の全触媒ドメインを含む請求項 1 の方法。

【請求項 6】

機能性誘導体が、残基 L e u¹⁰⁷³ から A l a¹⁴⁵⁹ に伸張した A L Kプロテインのフラグメントである請求項 5 の方法。

【請求項 7】

- a) 配列番号 1 又は 2 のペプチドを固相に接着させ、
- b) A L Kフラグメントとともに固相を、チロシンリン酸化に適切な条件下でインキュベートし、
- c) 固相を洗浄し、
- d) 抗リン酸化チロシン抗体（第 1 抗体）とともに固相を、抗原 - 抗体結合に適切な条件下でインキュベートし、
- e) 固相を洗浄し、
- f) 第 1 抗体を認識する酵素結合抗体（第 2 抗体）とともに固相を、第 1 抗体及び第 2 抗体の結合に適切な条件下でインキュベートし、それによって三成分免疫複合体を形成し、

20

- g) 固相を洗浄し、
- h) 免疫複合体の酵素活性を測定し、測定された活性は、チロシン - リン酸化の量に比例する工程を含む請求項 6 の方法。

30

【請求項 8】

抗体に結合した酵素が、ホースラディッシュパーオキシターゼである請求項 7 の方法。

【請求項 9】

酵素活性を比色分析反応によって検出する請求項 7 の方法。

【請求項 10】

A L Kチロシンキナーゼ活性を調節する化合物を同定する請求項 1 から 9 のいずれかの方法。

【請求項 11】

- i) A L Kタンパク又はそれらの機能的誘導体を、配列番号 1 又は 2 から選択されるペプチドと、ペプチドのリン酸化に適した条件下で、候補化合物の存在のもとにインキュベートし、

40

- ii) このようにして形成されたリン酸化ペプチドを検出する工程を含む請求項 10 の方法。

【請求項 12】

候補化合物の A L K調節活性を、候補化合物と同じ条件下でアッセイされた参照化合物のそれと比較する請求項 10 又は 11 の方法。

【請求項 13】

参照化合物はスタウロスポリンである請求項 12 の方法。

50

ークの発現を伴って、中枢神経系で発現される。しかし、染色体転座によって、ALKは、異常に発現され、腫瘍融合タンパクの形態でいずれかの癌を活性化する。ALK融合タンパクは、全非ホジキンリンパ腫の約5～10%に關与する。ALK陽性リンパ腫の1年の発生率は、EU国で発生する2000から3000の新たな症例を含んで、全世界で約100000である。ALKは、発癌において必須の役割を果たし、その正常な発現は、ほとんど中枢神経系に限定されているため、治療行為に対する良好な候補である。よって、特定のALK阻害剤は、臨床的な副作用をほとんど伴わないALK陽性リンパ腫の有効な治療薬となり得る。潜在的なALK阻害剤の同定のために、酵素活性に対して直接、阻害作用を示す化合物を評価するのに適するアッセイを開発することが強く望まれている。

【発明の開示】

10

【0003】

本発明によれば、ALKに特異で、かつALK活性を調節する化合物のスクリーニングに有用なインビトロでのキナーゼアッセイが提供される。

このアッセイは、ALKによって容易にリン酸化されるペプチド基質の使用及びそのようにして得られたリン酸化生成物のその後の検出を基にしている。本発明の好ましい実施形態では、アッセイは、リン酸化された生成物が免疫学的反応によって検出されるELISA法である。

【0004】

選択的なALK基質を生成するために、ALK活性化ループの配列を複製するペプチド(aa 1274-1294: ALK HUMAN、Q9UM73、swiss-PROT)を合成し、試験した。そのペプチドARDIYRASFFRKGGCAMLPVK(配番号1)及びARDIYRASYYRKGGCAMLPVK(配列番号2)は、ほとんどのチロシンキナーゼに対して良好な基質となることが知られているランダムポリマーであるポリGlu/Tyrよりも高いリン酸化の程度を示すALK基質として、特に有効であった。従って、本発明の第1の目的は、配列番号1及び配列番号2から選択されたアミノ酸配列を有するペプチドである。

20

【0005】

本発明のさらなる目的は、ALKチロシンキナーゼ活性を検出する方法であり、それは、本質的に、

- i) AKLタンパク又はそれらの機能的誘導体を、配列番号1及び2から選択されたペプチドとともに、そのペプチドのリン酸化反応に適する条件下でインキュベートし、
- ii)このようにして形成されたリン酸化ペプチドを検出する工程を含む。

30

【0006】

ここで用いられる「ALK機能的誘導体」は、ALKタンパクのいずれかの修飾型、例えば、未修飾ALKの触媒活性を維持している、欠失又は複合型あるいはそれらのフラグメントを意味する。機能的誘導体は、ALK配列の1116から1392のALK全長(spanning)残基の全触媒ドメイン(Q9UM73)を含むことが好ましい。残基Leu¹⁰⁷³からAla¹⁴⁵⁹に伸長したALKタンパクの一部が好ましく使用される。

【0007】

バキュロウイルス型発現システムを用いた組換え遺伝子技術によって生成された場合、このALKフラグメントは、正しいホールディング(CDスペクトルによって確認)及び有効な触媒活性を示す。

40

【0008】

さらに、ALKの構成的に活性な形態を含む製剤を、精製たんぱく質又はその機能的誘導体のかわりに用いてもよい。そのような製剤は、細胞溶解物であることが好ましく、それは、ALK発現細胞を異なる化合物で処理し、次いで、ALKキナーゼ活性に対する細胞溶解物をアッセイすることによって、a) AKL又はALK融合プロテインを発現する全細胞において、ALK活性を確かめ、及びb)細胞中でALKに対する潜在的な阻害剤の効果を確かめるために使用することができる。

【0009】

工程ii)においてリン酸化ペプチドを検出するために、工程i)のリン酸化反応を、[³

50

$^2\text{P}]\text{ATP}$ 又は $[\text{}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ のような放射性試薬の存在下で行うことができ、それにより、放射技術によって容易に検出される放射性生成物を形成することができる。あるいは、免疫反応を行うことができ、それは、リン酸化ペプチドと抗リン酸化チロシン抗体との免疫複合体の形成を含む。この抗リン酸化チロシン抗体は、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリホスホターゼ又はグルコースオキシダーゼのような、受容体酵素に放射性標識又は結合することができ、よって、特定の放射活性又は酵素活性を測定することによって、抗体及びリン酸化ペプチドの直接的な検出を可能にする。さらなる代替として、抗リン酸化チロシン抗体は、抗リン酸化チロシン抗体を認識し、かつ放射性標識又は受容体酵素を有する第2の抗体によって、あるいは、抗リン酸化チロシン抗体におけるビオチン標識を認識するストレプトアビジンに結合した酵素によって、間接的に検出することができる。

10

【0010】

好ましい実施形態では、本発明は、ALKチロシンキナーゼ活性を検出する方法を提供し、それは、

- a) 配列番号1又は2のペプチドを固相に接着させ、
- b) Leu^{1073} から Ala^{1459} に伸張するALKフラグメントとともに固相を、チロシンリン酸化反応に適する条件下でインキュベートし、
- c) 固相を洗浄し、
- d) 抗リン酸化チロシン抗体(第1抗体)とともに固相を、抗原-抗体結合に適する条件下でインキュベートし、
- e) 固相を洗浄し、
- f) 抗リン酸化チロシン第1抗体を認識する酵素結合抗体(第2の抗体)とともに固相を、第1抗体の第2抗体への結合に適する条件下でインキュベートし、それによって三成分免疫複合体を形成し、
- g) 固相を洗浄し、
- h) 免疫複合体の酵素活性を測定する(測定された活性は、チロシン-リン酸化の量に比例する)工程を含む。

20

【0011】

このアッセイ、正確にはELISAベースのキナーゼアッセイは、酵素-抗体結合体に利用される。結合酵素は、基質を開裂し、着色した溶液(それは、リン酸化チロシンの量に比例する)の吸収を測定することによって、分光光度的に検出することができる着色反応生成物を生じさせる。

30

【0012】

本発明で使用することができる固相又は支持体は、プラスチック材料(反応プレート、ウェル、バイアル)、ポリスチレン、ラテックス及び磁性物質ビーズ、コロイダル金属粒子、ガラス及び/又はシリカ表面ならびにその他を含む。

【0013】

ELISAベースのALKアッセイは、ALKのチロシン-リン酸化活性を調節する化合物のスクリーニング、特に、ALK阻害剤のスクリーニングに好ましく使用される。

したがって、好ましい実施形態では、本発明は、ALKのチロシン-キナーゼ活性を調節する化合物の同定方法に指向し、上述したALKアッセイは、候補化合物あるいはALKチロシンキナーゼ活性を刺激又は阻害するとして知られた化合物(対照)の存在下に行われる。特に、ALKチロシンキナーゼ活性を調節する化合物を同定する方法は、

40

i) ALKタンパク又はそれらの機能的誘導体を、配列番号1又は2から選択される(好ましくは配列番号1)ペプチドとともに、そのペプチドのリン酸化に適した条件下で、候補化合物の存在のもとにインキュベートし、

ii) このようにして形成されたリン酸化ペプチドを定量する工程を含む。

【0014】

ALK活性を阻害する化合物は、未分化大細胞リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫のようなALK関連腫瘍の治療用の潜在的な治療剤として選択される。候補化合物のALK調節

50

活性は、候補化合物と同じ条件下でアッセイされた参照化合物（対照）のそれと比較することができる。スタウロスポリン（Staurosporine）（Meggio F.ら、Eyr. J. Biochem. (1995) 234、317-322）は、0.2から0.3 μM 濃度でALK阻害剤として有効であることが証明されており、ALK阻害活性の他の化合物をスクリーニングする場合、陽性の対照として用いることができる。

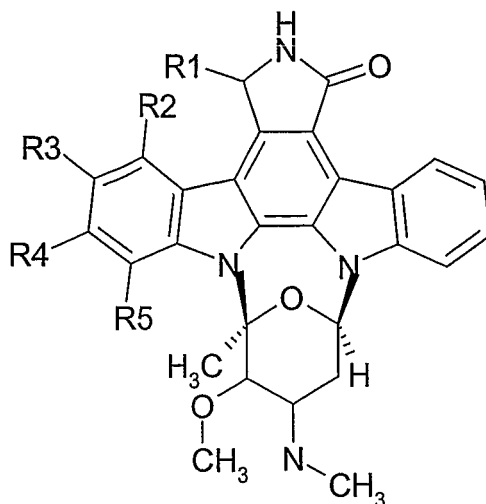
【0015】

分子モデルの研究は、スタウロスポリン親和性及びALKタンパクに対する特異性を改善することが要求されている置換基のパターンに関して、重要な指標を与えた。最も有効な構造は、以下の一般式（I）で示される。

【0016】

10

【化1】



20

【0017】

（式中、R1及びR2は、それぞれ独立して、ハロゲン（好ましくは塩素）、フェニル又は任意に1以上のハロゲンで置換されていてもよいC1からC3アルキルから選択され、R3はヒドロキシ、R4はヒドロキシ又はヒドロキシメチル、R5は、任意にハロゲン置換されていてもよいC1からC3アルキル又はベンジルである。）

30

式（I）の化合物は、NPM-ALK、ATIC-ALK、CTLC-ALK、TFG-ALK又はその他のトロポミオシンとの散発性融合のような発癌性の融合タンパク内で、ATPのALKのチロシンキナーゼドメインへの結合を拮抗する。したがって、それらはALK関連腫瘍、特に、未分化大細胞リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫の治療用医薬製剤に用いることができる。

【0018】

本発明の異なる実施形態では、化合物（I）を、ここで開示されたように、ALK阻害剤のスクリーニング用ALKアッセイに用いる。ハイスループットのスクリーニングもまた、本発明のALKアッセイを用いて実行することができる。

40

【0019】

さらなる観点によれば、本発明は、上述したALKアッセイを行うためのキットに指向する。そのキットは、所定の割合で試薬を組み合わせる包装したものからなる。通常、キットは、配列番号1又は2のペプチド（任意に固相に固定されていてもよい）、抗リン酸化チロシン抗体及び、必要に応じて、酵素的又は放射性標識された標識抗体を含むであろう。さらに、キットは、比色又は放射性反応のための試薬、バッファ、スタウロスポリン又はその誘導体のような対照、希釈剤、洗浄剤、安定剤及びアッセイを組み立てるか、アッセイを行うために有用ないずれかの他の成分を含んでもよい。種々の試薬の相対的な量は、アッセイの感度を最適化するために変化させることができる。特に、試薬は、溶液、懸濁剤、分散剤、乾燥粉末、凍結乾燥製剤のような固体又は液体製剤で提供してもよ

50

い。キット成分は、1つの又は別個の容器で供給される。またそのキットは、アッセイを行うための指示書を含んでいてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】組換えHis標識ALKの精製及び活性。A) マーカー(M)、HiTrapカラムにロードされた透析及びプールされたDEAEカラムフラクション(load)、HiTrapカラムフラクション(数字はフラクション番号を示す)を示す銀染色10%SDS-PAGEゲル。B) 精製rALKの放射活性自動リン酸化反応アッセイ。レーン1：³²P標識rALKのオートラジオグラフィー。レーン2：レーン1と同様のサンプルの銀染色。

10

【0021】

【図2】ALKキナーゼとペプチドとの反応速度。

【図3】ELISAベースのキナーゼアッセイを用いたALK活性の検出。A) 精製rALKによる配列番号2のペプチドのリン酸化反応。ELISAキナーゼ反応を0.5 µg精製rALKの有又は無で、配列番号2のペプチド又はペプチド無しで、30にて30分間行った。グラフは、450 nmでの吸収を示す。B) ALKペプチド基質リン酸化の反応速度。ELISAキナーゼ反応を、206 µMの配列番号2のペプチド又は42 µMの配列番号1のペプチドを用いて、0.1 µgの精製rALKとともに行った。反応は0、0.5、2、5、10分後、EDTAを添加することによって中止させた。

20

【0022】

【図4】リン酸化反応のレベルに対するペプチド基質濃度の効果。ELISAアッセイを、0.2 µgの精製rALK及び0~105 µMの配列番号1のペプチド(A)又は0~315 µMの配列番号2のペプチド(B)の存在下で、30にて15分間行った。

【図5】基質リン酸化反応に対するrALK濃度の効果。ELISAアッセイを、206 µMの配列番号2のペプチド又は42 µMの配列番号1のペプチド及び0~225 ngの範囲のrALKを用いて、30にて15分間行った。

【図6】スタウロスポリンによるALK活性の阻害。ELISAアッセイを、42 µMの配列番号1のペプチド、20 ngのrALKを用いて、30にて15分間、0~5 µMのスタウロスポリン又は溶媒、DMSOの当量の存在下にて行った。グラフは未処理対照で標準化したA450を示す。

30

【0023】

実験結果

ペプチド合成

アブライド・バイオシステム・モデル431A・シンセサイザー(4-ヒドロキシメチル-コポリスチレン-1%ジビニルベンゼン樹脂(0.95 mmol/g、0.05 mmol))で、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)化学を利用する自動固相合成法によって、ペプチドを合成した。

【0024】

Fmocアミノ酸(0.5 mmol)を、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1-1,1,3,3-トリメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスファート(HBTU)(1当量)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)(1当量)を、DIPEA(2当量)の存在下で、活性化した。

40

【0025】

ペプチジル樹脂(100 mg)を開裂させ、5 mlのトリフルオロ酢酸、0.375 gのフェノール、0.125 µlの1,2-エタンエジチオール、0.250 µlのチオアニソール及び0.25 µlの水中で、2時間、脱保護した。その反応混合物を、0にて冷却したエチルエーテルを含む試験管にろ過した。析出したペプチドを遠心により分離し、新鮮なエーテルで洗浄した。

【0026】

粗ペプチド(10 mlの水中、50から100 mg)を分離用RP-カラム(prepNova-Pa

50

k HR C18、6 μ m、25 \times 10 mm、Waters)にポンピングし、12 ml / 分で、10%から45%アセトニトリルの線形勾配で溶出した。

【0027】

ペプチドの純度は、1 ml / 分で、0.1%フルオロ酢酸中のアセトニトリルの線形勾配を用いた分析RP-HPLC(5 μ m、C18 Symmetry300カラム、4.6 \times 250 mm (Waters))による判定で>90%であった。ペプチドの分子量は、マトリクス-援助レーザー吸収イオン化飛行時間型(MALDI-ToF)質量分析計(Maldi-1; Kratos-Schimidzu、Manchester、UK)を用いた質量分析法によって確認した。

【0028】

組換えALKの生成及び精製

10

ALKの一部(Leu¹⁰⁷³からAla¹⁴⁵⁹から伸張)をバキュロウイルス転移ベクター(pBlueBacHis2C(インビトロゲン))にクローン化した。

このベクターとMaxBac(登録商標)2.0バキュロウイルス発現システム(インビトロゲン)を用いて、我々は、Sf9(Spodoptera frugiperda)昆虫細胞内で、組換えバキュロウイルス及び発現組換えALK(rALK)プロテインを生成した。このタンパクは、理論分子量が49 kDaであり、6-ヒスチジン標識(His-tag)に融合したALK(Ile¹¹¹⁶からVal¹³⁹²)の予測触媒ドメインを含む。His標識rALKの自動リン酸化活性は、正しいホールディングを表示し、全細胞溶解物の抗リン酸化チロシン免疫プロット及びインビトロの放射性キナーゼアッセイによって検証された。

【0029】

20

精製のためのタンパクを生成するために、感染多重度(MOI)5で、Sf9細胞を組換えウイルスに感染させた。27にて3日間、インキュベートすることにより培養し、次いで、4にて10分間400gで遠心することにより回収した。細胞ペレットを使用まで-80で保存した。細胞を溶解するために、50 mMのTris-HCl(pH 8)、20 mMのNaCl及びプロテアーゼ阻害剤(ペプスタチン、ベンズアミジン、ロイペプチン及びアプロチニン)を含む低張のバッファ(バッファA)中で、細胞ペレットを再懸濁した。氷上でのインキュベーションの30分後、細胞再懸濁液を1500gで15分間、4にて遠心し、上清を0.45 μ mフィルターによってろ過した。次いで、ろ液を、バッファAの存在下、80 mlアニオン交換高速DEAEセファロース(シグマ)カラムに、1.5 ml / 分の流量で、AKTAPLCシステム(アマーシャム-ファルマシアバイオテック)を用いてロードした。結合したタンパクを、20から200 mMの範囲のNaClの勾配中で溶出した。フラクションを、免疫プロットによって、ALKタンパクが存在するかどうか分析した。陽性フラクションをプールし、1リットルの陰性結合バッファ(20 mMのリン酸ナトリウム(pH 7.8)、500 mMのNaCl及びPI)中で、毎時間バッファを交換しながら、4にて3時間透析した。次いで、透析フラクションを、50 mMイミダゾール及び20 mMメルカプトエタノールを添加した陰性結合バッファで予め平衡させて、HiTrap(商標)-ニッケル親和性クロマトグラフィーカラム(アマーシャム-ファルマシアバイオテック)にロードした。0.5から1 ml / 分の流量をカラムに適用した。カラムを陰性結合バッファで洗浄した後、結合タンパクを、50から200 mMの範囲のイミダゾールの線形勾配を用いて溶出した。次いで、フラクションを、SDS-PAGE及び銀染色によって、rALKの存在及び純度について分析した。図1AはrALKの精製の実施例を示す。

30

40

【0030】

最後に、陽性フラクションを、50 mMのトリス(pH 7.4)、100 mMのNaCl、10%グリセロール、20 mMのメルカプトエタノール及びプロテアーゼ阻害剤中で透析し、使用まで-80で保存した。精製rALKが活性であることを検証するために、我々は、放射性自動リン酸化アッセイを行った。25 μ lのrALK陽性フラクション、6 μ Mの冷ATP、1.2 mMのDTT、10 μ Ci[⁻³²P]ATP、25 mMのヘプス(pH 7.5)、10 mMのMgCl₂及び10 mMのMnCl₂を含む反応混合物を30にて30分間インキュベートした。反応を、Laemmliバッファを加える

50

ことによって中止させ、95 にて5分間加熱した。サンプルを10% SDS-PAGEゲルに解像し、Immobilon(商標)-Pメンブレンに転写した。放射性標識タンパクを図1Bに示したように、オートラジオグラフィーによって視覚化した。

【0031】

ペプチドリン酸化反応(放射性アッセイ)

ペプチド及びランダムポリマーポリGlu/Tyr(1:4)を、50mMのTris/HCl(pH 7.5)、5mMのMnCl₂、10μMのNa-バンデート、30μM [³²P] ATP又は[³³P] ATP (特異活性1000cpm/pmol)及び10単位のrALK [1ユニットは、ポリGluTyr(0.1mg/ml)に対して、1分当たり1pmolのリン酸を転移する酵素の量として定義されている]を含む媒体の30μl 10
中でリン酸化した。その反応を、30 で10分間のインキュベーションの後、25μlの混合物をP81ホスホセルロース紙にスポットすること(それは、他の箇所(1)で説明されたように進めた)により終了させた。非線形回帰を用いたミハエリスメンテンの式に直接データを代入するGraphPad Prism softwareによって、反応速度定数を測定した。

【0032】

結果

Tyr-1278を含む、ALK参照配列から誘導されたペプチドは、rALKの良好な基質となったが、Tyr-1282又はTyr-1283のいずれかを含むペプチドは、酵素によってわずかに影響された(図2参照)。Tyr-1278誘導体は3つのTy 20
r残基を有するペプチドによって表されたものよりもっと高い効率でリン酸化された(表I)。Tyr-1278誘導体がALK触媒ドメインに最適なペプチド基質であることを確認するために、我々は、ポリGlu/Tyr(1:4)、つまり、ほとんどのチロシンキナーゼに非常に良好な基質であるランダムポリマーによって表されたものとそのリン酸化の程度を比較した。

表IIは、Tyr-1278誘導体がポリGlu/Tyrよりも良好なALK基質となることを示す。

【0033】

表I

rALKと合成ペプチドとの反応速度定数 30
ペプチド: Vmax(pmol/分): Km(μM): 効率(Vmax/Km)
ARDIYRASYYRKGGCAMLVK: 99.5: 90.5: 1.1
ARDIYRASFFRKGGCAMLVK: 186.3: 109.4: 1.7

【0034】

表II

ALK触媒ドメインによるモデル基質のリン酸化速度
ポリ(Glu/Tyr)及びペプチド濃度を、それぞれ0.1mg/ml及び400μMとした。酵素濃度は10単位であった。報告された値は、3回の別個の実験の平均を示す。S.E.M.値は常に14%未満であった。

基質: リン酸化の程度(pmol/分) 40

ポリ(Glu/Tyr): 10.0

ARDIYRASFFRKGGCAMLVK: 30.3

【0035】

ELISAベースのインビトロでのキナーゼアッセイ

ナンクイムノ96ウェルプレートを、PBS中の種々の濃度でALKペプチド基質(配列番号1又は2)を含む被覆溶液(125μl/ウェル)とともに、37 にて一晚インキュベートした。次いで、ウェルを洗浄緩衝液(PBS-トウーン0.05%)の200μlで洗浄し、37 にて2時間放置して乾燥した。キナーゼ反応をキナーゼバッファ(25mMHepes(pH 7.5)、5mMのMnCl₂、5mMのMgCl₂)、0.3mMのATP及び精製rALKを30 にて15分間、100μl/ウェルの総容量中、 50

種々の濃度でインキュベートすることによって行った。次いで、反応混合物を取り出し、ウェルを洗浄バッファ200 μ lで5回洗浄した。リン酸化ペプチドをPBS+4%BSA中で1:500に希釈されたマウスモノクローナル抗リン酸化チロシン抗体(クローン4G10 UpstateBiotech Ltd)100 μ l/ウェルを用いて検出した。室温でのインキュベートの30分後、抗体を取り出し、上述したようにウェルを洗浄した。PBS+4%BSA中で1:500に希釈された第2抗体(抗マウスIgG、ホースラディッシュパーオキシターゼ結合全抗体、羊から、Amersham Pharmacia Biotech)の100 μ lを各ウェルに加え、上述したような洗浄の前に、プレートを再度室温にて30分間インキュベートした。プレートを100 μ l/ウェルのTMB基質溶液(エンドゲン)を用いて製造し、反応を0.18Mの硫酸の同量を添加することによって中止させた。最後に、Ultrospec (登録商標)300スペクトロメータ(Amersham- Pharmacia Biotech)を用いて、450又は490nmで吸収を読み取った。

10

【0036】

結果

我々は、ELISAベースキナーゼアッセイがリン酸化ALKペプチド基質(配列番号1及び2)を、よって精製rALK活性を検出するために使用することができることを示した。最初の実験で、我々は、450nm(A450)での吸収における特別な増加が観察できるかどうかを測定するために、精製rALK及び配列番号2のペプチド基質の双方の存在、非存在下でアッセイを行った(図3A)。当然、精製rALK及び基質の双方の存在下で、A450nmにおける劇的な増加が観察された。それに対して、ペプチド又はrALKのいずれか及び双方の非存在下では、A450nmは低く、つまりバックグラウンド吸収の低いレベルを示した。基質リン酸化の反応速度を測定するために、我々は、種々のインキュベーション時間後のA450を測定した(図3B)。双方のペプチドについて、反応速度は、10分後に最大リン酸化に達したというように、同様であった。

20

【0037】

ELISAキナーゼアッセイにおける2種のペプチドの効率を比較し、使用のためのペプチドの最適濃度を測定するために、我々は、双方のペプチドについて検量線測定を行った。結果は、ペプチド基質の量の増加がA450を、よってrALKキナーゼ活性を増加させることを示す。配列番号2のペプチド基質について、最大A450及びリン酸化反応は、約200 μ Mで観察され、それに対して、配列番号1のペプチド基質はわずか25 μ Mであった(図4A及びB)。これは、配列番号1のペプチド基質がrALK用の基質としてより有効であることを示す。

30

【0038】

キナーゼ活性の阻害を観察するために、酵素の適当な濃度、つまり、検量線の線形範囲を用いることが必須である。ELISAを、206 μ Mの配列番号2又は42 μ Mの配列番号1及びrALKの0~220ngの範囲を用いて行った。双方の基質の曲線の線形範囲は、rALKの約0~15ngの間であり、その後、曲線はプラトーに達した(図5)。

【0039】

rALK活性に対する阻害剤スタウロスポリンの効果をも42 μ Mの配列番号2のペプチド基質を用いて評価した。また、対応濃度でDMSOを含有する溶媒対照を行った。スタウロスポリンは、1 μ Mで、見積もり IC_{50} = 300nMの最大阻害に達し、著しくrALK活性を阻害した(図6)。溶媒(DMSO)単独ではrALK活性に実質的な効果はなかった。

40

【0040】

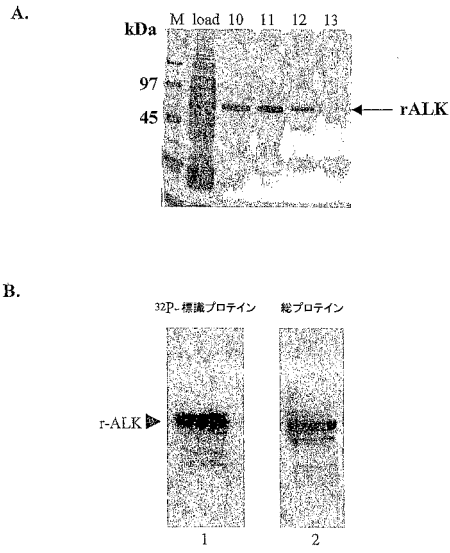
参照

[1] Glass, D.B., Masaracchia, R.A., Feramisco, J.R.及びKemp, D.E., (1978) Anal. Biochem. 87, 566-575.

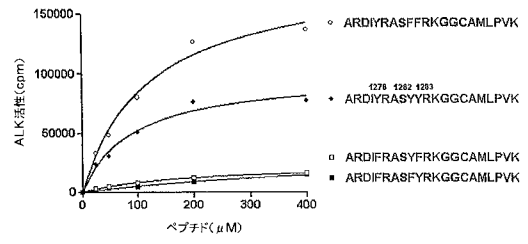
[2] Till, J. H., Ablooglu, A. J., Frankel, M., Bishop, S. M., Kohanski, R. A. 及びHubbard S. R., (2001) J. Biol. Chem. 276, 10049-10055.

50

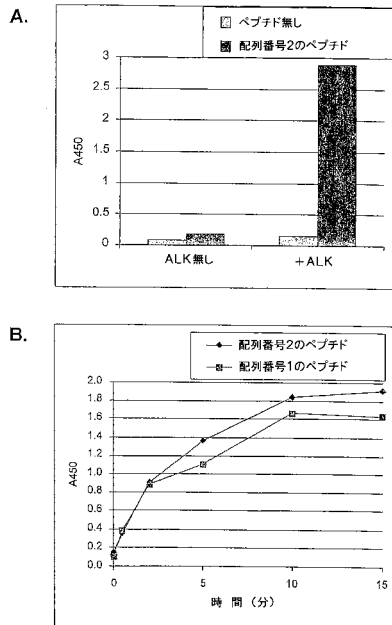
【 図 1 】



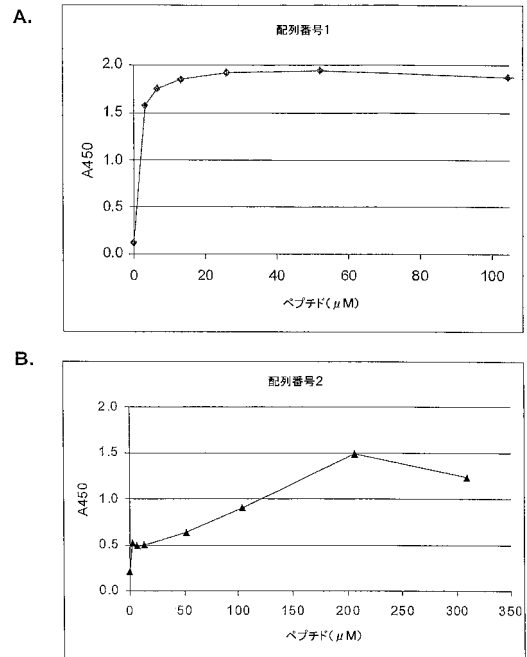
【 図 2 】



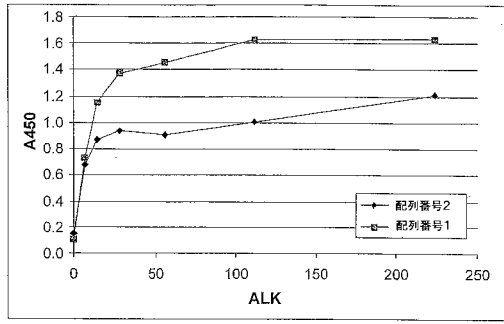
【 図 3 】



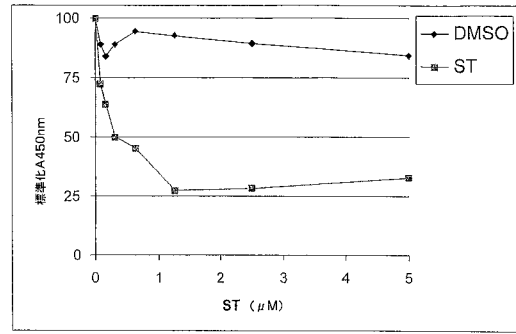
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

[2006519800000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern Application No PCT/EP2004/002185
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/48 C07K14/72 G01N33/74 A61K31/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C07K A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199325 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 1993-201126 XP002249142 & JP 05 126833 A (TOSOH CORP) 21 May 1993 (1993-05-21) abstract	1-17,19, 20
A	US 5 770 421 A (LOOK A THOMAS ET AL) 23 June 1998 (1998-06-23) the whole document	1-17,19, 20
A	WO 95/14930 A (SADICK MICHAEL DANIEL ;GENENTECH INC (US); GODOWSKI PAUL J (US); M) 1 June 1995 (1995-06-01) the whole document	1-17,19, 20
	----- -/-- -----	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"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.
"L" document 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)		"&" document member of the same patent family
"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		
Date of the actual completion of the international search 1 July 2004		Date of mailing of the international search report 28 SEP 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gunster, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/EP2004/002185

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/49317 A (PELES ELIOR ;ONRUST SUSAN (NZ); CLARY DOUGLAS (US); HUI TERANCE H) 5 November 1998 (1998-11-05) the whole document -----	1-17,19, 20
A	WO 95/02187 A (BARKER KAREN TRACEY ;CROMPTON MARK ROGER (GB); MARTINDALE JANE ELI) 19 January 1995 (1995-01-19) the whole document -----	1-17,19, 20
A	SADICK M D ET AL: "Kinase receptor activation (KIRA): A rapid and accurate alternative to end-point bioassays" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 1999 NETHERLANDS, vol. 19, no. 6, 1999, pages 883-891, XP002249139 ISSN: 0731-7085 the whole document -----	1-17,19, 20
A	TURTURRO FRANCESCO ET AL: "Model of inhibition of the NPM-ALK kinase activity by herbimycin A." CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. UNITED STATES JAN 2002, vol. 8, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 240-245, XP002249140 ISSN: 1078-0432 the whole document -----	1-17,19, 20
A	MORRIS STEPHAN W ET AL: "ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK)." ONCOGENE, vol. 14, no. 18, 1997, pages 2175-2188, XP002249141 ISSN: 0950-9232 the whole document -----	1-17,19, 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/002185**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims 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. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. 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. 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.:
1-17, 19, 20

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2004/ 002185

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-17,19,20

ALK assay using a peptide of SEQ ID N. 1 or SEQ ID N. 2 and said peptides and related kits.

2. claim: 18

Use of compounds of formula (I) for the preparation of a medicament for the treatment of ALK-related tumors.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern
 Application No
 PCT/EP2004/002185

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 5126833	A	21-05-1993	NONE
US 5770421	A	23-06-1998	US 5529925 A 25-06-1996 US 6174674 B1 16-01-2001 US 6451997 B1 17-09-2002 US 2001021505 A1 13-09-2001 AU 679833 B2 10-07-1997 AU 1511695 A 19-06-1995 CA 2177957 A1 08-06-1995 DE 69433665 D1 06-05-2004 EP 0731806 A1 18-09-1996 JP 9512161 T 09-12-1997 WO 9515331 A1 08-06-1995
WO 9514930	A	01-06-1995	US 6001621 A 14-12-1999 AT 163231 T 15-02-1998 AU 697142 B2 01-10-1998 AU 1180095 A 13-06-1995 AU 698975 B2 12-11-1998 AU 1210895 A 13-06-1995 CA 2175892 A1 01-06-1995 CA 2175893 A1 01-06-1995 DE 69408541 D1 19-03-1998 DE 69408541 T2 06-08-1998 DK 730740 T3 28-09-1998 EP 0730646 A1 11-09-1996 EP 0730740 A1 11-09-1996 ES 2116066 T3 01-07-1998 GR 3026430 T3 30-06-1998 HK 1008440 A1 07-05-1999 JP 9506250 T 24-06-1997 JP 3442784 B2 02-09-2003 JP 9505889 T 10-06-1997 WO 9514776 A1 01-06-1995 WO 9514930 A1 01-06-1995 US 2002147325 A1 10-10-2002 US 2003204072 A1 30-10-2003 US 5766863 A 16-06-1998 US 6025145 A 15-02-2000 US 6287784 B1 11-09-2001 US 5914237 A 22-06-1999 US 5891650 A 06-04-1999 US 6096527 A 01-08-2000 US 5709858 A 20-01-1998 US 6087144 A 11-07-2000 US 2002137113 A1 26-09-2002
WO 9849317	A	05-11-1998	AU 7260098 A 24-11-1998 CA 2288221 A1 05-11-1998 EP 0979288 A2 16-02-2000 JP 2002513289 T 08-05-2002 US 2003073143 A1 17-04-2003 WO 9849317 A2 05-11-1998 US 6228641 B1 08-05-2001 US 2002119501 A1 29-08-2002 US 2003095970 A1 22-05-2003 US 2003008347 A1 09-01-2003 US 6342593 B1 29-01-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	Application No
PCT/JP2004/002185	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9849317	A	US 6388063 B1 US 2004087783 A1	14-05-2002 06-05-2004
WO 9502187	A	19-01-1995 AU 7081094 A WO 9502187 A1 ZA 9404983 A	06-02-1995 19-01-1995 08-01-1996

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/15	Z

(81) 指定国 AP(BW, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ピンナ, ロレンツォ, アー .
 イタリア共和国, I - 2 0 1 3 3 ミラノ, 1, ヴィア ヴェネジアン

(72) 発明者 ドネラ - ディアナ, アリアナ
 イタリア共和国, I - 2 0 1 3 3 ミラノ, 1, ヴィア ヴェネジアン

(72) 発明者 マリン, オリアノ
 イタリア共和国, I - 2 0 1 3 3 ミラノ, 1, ヴィア ヴェネジアン

(72) 発明者 モログニ, ルカ
 イタリア共和国, I - 2 0 1 3 3 ミラノ, 1, ヴィア ヴェネジアン

(72) 発明者 ガンビー, ロザリンド
 イタリア共和国, I - 2 0 1 3 3 ミラノ, 1, ヴィア ヴェネジアン

(72) 発明者 ガンバコルティ, パッセリーニ, カルロ
 イタリア共和国, I - 2 0 1 3 3 ミラノ, 1, ヴィア ヴェネジアン

(72) 発明者 スカポッツァ, レオナルド
 イタリア共和国, I - 2 0 1 3 3 ミラノ, 1, ヴィア ヴェネジアン

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB50 BB51 DA20 DA36 FA26 FB01 FB03 FB11 GC10
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ27 QQ79 QR02 QR42 QR48
 QR50 QS33 QS36 QS39 QX01
 4H045 AA10 AA30 BA09 BA17 EA51 FA41