

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-225396

(P2006-225396A)

(43) 公開日 平成18年8月31日(2006.8.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/00 (2006.01)</b>	C07K 16/00	4B063
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18	4B064
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	4H045
<b>C07K 16/40 (2006.01)</b>	C07K 16/40	
<b>C12Q 1/48 (2006.01)</b>	C12Q 1/48	Z

審査請求 未請求 請求項の数 20 O L 外国語出願 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-79226 (P2006-79226)	(71) 出願人	503115191
(22) 出願日	平成18年3月22日 (2006.3.22)		バイオソース インターナショナル
(62) 分割の表示	特願2002-530779 (P2002-530779) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 93 012 カマリーロ フリン ロード 8 20
原出願日	平成13年9月27日 (2001.9.27)	(74) 代理人	100083806 弁理士 三好 秀和
(31) 優先権主張番号	60/235,620	(72) 発明者	レーガン、 ケヴィン ジェイ。 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91 301 アゴーラ ヒルズ ミドル クレ スト ドライブ 5833
(32) 優先日	平成12年9月27日 (2000.9.27)	(72) 発明者	シェーフュー、 エリック アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1748 ホブキントン グレイストーン レーン 12
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質に対するホスホキナーゼ活性の定量的ための方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 タンパク質のリン酸化を測定するための方法を提供する。

【解決手段】 標的タンパク質のインビトロでのリン酸化を含むが、それは、このタンパク質（非リン酸化）を、タンパク質のリン酸化形態の作製を可能にするホスホキナーゼを含むすべての試薬を含んでなる反応混合物とすることを条件とする。このリン酸化タンパク質は、このリン酸化部位に特異性を持つ抗体との接合によって測定する。測定に有用な抗体を含む。特に、タウタンパク質、Rbタンパク質およびEGFRタンパク質のリン酸化、ならびにタウタンパク質、Rbタンパク質またはEGFRタンパク質のリン酸化の部位に特異性を持つ抗体からなる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

タンパク質に対するホスホキナーゼ活性を測定するための方法であって、  
 ( a ) タンパク質をホスホキナーゼに供して、該タンパク質上のリン酸化部位をリン酸化するステップと、  
 ( b ) 該タンパク質上のリン酸化されるリン酸化部位に特異的な抗体を提供するステップと、  
 ( c ) ( a ) 由来のタンパク質を ( b ) の抗体と接触させるステップと、  
 ( d ) 該リン酸化部位に結合した抗体を検出するステップと、  
 からなる方法。

10

## 【請求項 2】

前記タンパク質がタウタンパク質であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ホスホキナーゼが G S K - 3 、 P K A 、 P K C 、 C D K - 5 、 M A R K 、 J N K 、 p 3 8 M A P K またはカゼインキナーゼ I I であることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記抗体が、表 I I に示される部位から選択される前記タウタンパク質中の特定の位置におけるリン酸化部位に特異的であることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記タンパク質が表 1 におけるタンパク質から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記タンパク質が E G F R であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記タンパク質が R b であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

リン酸化セリンを有するポリペプチド免疫原から調製される抗体。

## 【請求項 9】

リン酸化スレオニン有するポリペプチド免疫原に対して惹起される抗体。

30

## 【請求項 10】

リン酸化チロシン有するポリペプチド免疫原に対して惹起される抗体。

## 【請求項 11】

配列番号 1 に特異性を有する抗体。

## 【請求項 12】

配列番号 2 に特異性を有する抗体。

## 【請求項 13】

E G F R リン酸化されたチロシン 1 1 7 3 部位またはチロシン 8 4 5 部位に対する抗体。

## 【請求項 14】

リン酸化されたスレオニン 8 2 1 部位に対する抗体。

40

## 【請求項 15】

タンパク質に対するホスホキナーゼ活性の測定のためのキットであって、  
 ( a ) 該タンパク質のリン酸化形態および非リン酸化形態の両方に特異的かつ該タンパク質のリン酸化形態および非リン酸化形態の両方に結合する第一の p a n 抗体と、  
 ( b ) 標識されることを特徴とする、該第一の p a n 抗体由来のタンパク質上の独立部位に結合する第二の p a n 抗体と、  
 ( c ) 非リン酸化タンパク質スタンダードおよびリン酸化タンパク質スタンダードと、  
 ( d ) 標識されることを特徴とする、該タンパク質上の標的部位がリン酸化される場合にのみ該タンパク質に結合するリン酸化部位特異的抗体 ( P S S A ) と、

50

( e ) 緩衝液と、  
からなるキット。

【請求項 16】

前記タンパク質がタウであることを特徴とする請求項 11 に記載のキット。

【請求項 17】

前記タンパク質が表 I に列挙されるタンパク質から選択されることを特徴とする請求項 11 に記載のキット。

【請求項 18】

リン酸化部位のプロフィールを定量することによる、タンパク質に対する異なるキナーゼ活性の測定のためのキットであって、

10

( a ) 該タンパク質のリン酸化形態および非リン酸化形態の両方に結合する第一の p a n 抗体と、

( b ) 標識されることを特徴とする、該第一の p a n 抗体由来のタンパク質上の独立部位に結合する第二の p a n 抗体と、

( c ) 該タンパク質の非リン酸化形態およびリン酸化形態についてのタンパク質スタンダードと、

( d ) 抗体が存在するように標識されることを特徴とする、タンパク質上の標的部位がリン酸化される場合にのみ該タンパク質に結合する 2 つ以上の P S S A と、

( e ) 緩衝液と、  
からなるキット。

20

【請求項 19】

前記タンパク質がタウであることを特徴とする請求項 14 に記載のキット。

【請求項 20】

前記タンパク質が表 I に規定される通りであることを特徴とする請求項 14 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

本出願は、2000年9月27日に提出された、仮出願番号60/235,620の優先権を主張する。

30

【0002】

技術分野

本発明は、インビトロでのプロテインキナーゼ活性の測定についてのアッセイおよび試薬に関する。

【0003】

背景技術

薬物開発の努力は、分子の標的選択によって開始される活動の連続を伴う。あらゆる薬物が、細胞レベルで働くので、これらの標的は、通常、とにかく細胞伝達経路に関わり合うタンパク質である。シグナル伝達経路は、正常な細胞機能に不可欠である。細胞内分子の発現の異常、およびシグナル伝達経路の同等の相互作用は、種々の疾患に関連し、従って、薬物発見努力の焦点である。シグナル伝達経路におけるタンパク質のリン酸化は、多細胞生物に生じる重要な共有結合修飾の1つである。この修飾を行う酵素は、プロテインキナーゼであり、これは、リン酸の A T P からタンパク質基質上のチロシン残基、セリン残基またはスレオニン残基への転移を触媒する。これらのアミノ酸残基のリン酸化は、酵素活性を調節し、そして下流のシグナリングタンパク質の補充についての結合部位を作製する。プロテインキナーゼは、細胞のシグナリング経路の重大な構成要素であるので、これらの触媒活性は、厳密に調節される。プロテインキナーゼ活性の異常は、リン酸化のパターンを変更し、結果として細胞機能に対して影響を及ぼす。多くの薬物発見努力は、選択的にプロテインキナーゼ活性を抑制する化学薬品の同定を伴う。本発明は、プロテイン

40

50

キナーゼ活性をモニターするためのアッセイおよび試薬を提供するように設計される。

【0004】

リン酸化についての標的残基は、組換え起源または天然の起源の生物学的に活性のある分子の全長に含まれ得る。プロテインキナーゼ活性の測定について現在利用される大半の方法は、ペプチド基質を使用し、これは、標的されるリン酸化残基を含む。この分野は、本明細書中において参考として援用される米国第6,066,462号(個々のプロテインキナーゼ活性の定量)に教示される。この方法は、本発明と、ペプチド基質が、キナーゼによって作用されリン酸化され得るすべての部位を含まず、従って、天然のタンパク質に対する活性を正確には反映しないかもしれない点で異なる。本明細書中に記載される発明は、天然の起源または組換え起源の全体の分子またはフラグメントを用いて使用され得る。また、異なる残基部位での活性の記述は、本発明において、米国第6,066,462号における異なるペプチドとは対照的に、検出について異なるPSSAを必要とする。

10

【0005】

キナーゼ活性の検出についての別の方法は、すべてのホスホチロシン残基に結合する一般的な抗体の使用を伴う。この方法は、本明細書中で参考として援用される米国第5,766,863号(キナーゼレセプター活性化アッセイ)に記載される。この方法は、分子に対するリン酸化チロシン残基間を区別する能力がないことを欠点として有する。この方法はまた、ホスホセリン分子またはホスホスレオニン分子を検出することができない。なぜなら、この抗体は、このようなリン酸化残基を検出しないからである。対照的に、本明細書中に記載される方法は、抗体を使用し、この抗体は、リン酸化アミノ酸およびホスホ残基自身の周囲の配列特異的残基に結合する。本発明において使用される試薬は、リン酸化スレオニン分子、リン酸化セリン分子またはリン酸化チロシン分子を検出し得る。

20

【0006】

3つの例が利用される；これらのすべては、疾患に向けられる薬学的研究において、現在興味深い重要な分子標的を含む。

【0007】

現在、神経生物学者らは、疾患に関連し得る脳のタンパク質に対する努力に集中している。1つのこのようなタンパク質は、タウ(主に軸索において見出される神経細胞の微小管結合タンパク質)と呼ばれる。タウの機能は、チューブリン重合を促進すること、および微小管を安定することであるが、また、特定のシグナリング経路を細胞骨格に関連させるのに役立つ。タウのリン酸化は、このタンパク質の正常機能および病理学的機能の両方を調節する。タウ(その過剰リン酸化(hyper-phosphorylated)形態において)は、二重らせん状細線維(paired helical filament)(PHF)(アルツハイマー病(AD)脳における神経原線維病変の基本成分)の主要な成分である。過剰リン酸化は、タウの微小管結合機能を損ない、AD脳における微小管の不安定性をもたらし、最後に、神経細胞変性を導く。過剰リン酸化タウはまた、他の中枢神経系障害の範囲において見出される。非常に多数のセリン/スレオニンキナーゼ(GSK-3、PKA、PKC、CDK5、MARK、JNK、p38MAPKおよびカゼインキナーゼIIを含む)が、タウをリン酸化し得る。

30

【0008】

インビトロでのキナーゼ活性の検出は、この活性を阻害しうる化合物のスクリーニングに限界があり、従って、それはタウのリン酸化が異常に高い種々の神経変性疾患の改善に有用であり得る。現在でも努力が続けられている、タウタンパク質に対してキナーゼ活性を抑制し得る薬物を同定する方法がある。しかし、これらの方法は、乏しい感受性および低い特異性を欠点として有する。タウタンパク質内部の個々のセリン残基またはスレオニン残基でのリン酸化は、疾患に相関することが示されている。本発明は、記載される「技術」におけるこれらの欠如の両方を克服する。

40

【0009】

米国特許第5,601,985号は、異常にリン酸化されるタウタンパク質の検出方法に、米国特許第5,843,779号は、微小管結合タンパク質であるタウに対して指向

50

されるモノクローナル抗体、およびこれらの抗体を分泌するハイブリドーマに、米国特許第5,733,734号は、アルツハイマー病または二重らせん状細線維の蓄積に関連する疾患についてのスクリーニング方法に、そして米国特許第6,066,462号は、個々のプロテインキナーゼ活性の定量に、関する。これらの特許は、本明細書中において参考として援用される。

#### 【0010】

キナーゼ活性のモニターについて、このような一般的適用性を示す他のモデルが存在する。例示の目的について、本発明者らは、細胞周期調節に重要な核内分子網膜芽細胞腫タンパク質(Rbタンパク質)、および細胞表面レセプター分子(EGFR)を取り巻くアッセイを設計した。

10

#### 【0011】

網膜芽細胞腫タンパク質(Rb)(網膜芽細胞腫罹患性遺伝子の腫瘍抑制産物)は、110kDaタンパク質であり、これは、細胞増殖および細胞分化の調節において重要な役割を果たす。その機能の欠如は、制御不能な細胞増殖および腫瘍発達を導く。このRb遺伝子の変異的不活化は、すべての網膜芽細胞腫、および種々の他のヒト悪性腫瘍(乳癌、肺癌、結腸癌、前立腺癌、骨肉腫、軟部組織肉腫および白血病を含む)において見出される。癌抑制としてのRbタンパク質の役割の中心は、Rbが、細胞周期のG1期において細胞を抑制することによって、不適当な増殖を抑制する能力である。Rbタンパク質は、転写因子(E2F-1、PU.1、ATF-2、UBF、E1f-1およびc-Ab1を含む)への結合によって、その増殖抑制機能を発揮する。Rbタンパク質の結合は、そのリン酸化状態によって支配される。低リン酸化(hypo- or under-phosphorylated)Rbは、転写因子(最も顕著な転写因子は、E2F/Dpファミリー)を結合および封鎖し、G1期からS期境界へ横切ることが必要とされる遺伝子の転写を阻害する。この細胞周期阻害機能は、Rbが、サイクリン/サイクリン依存性プロテインキナーゼ(cdk)の複合体によって触媒されるリン酸化を受ける場合に阻止される。

20

#### 【0012】

Rbは、cdkリン酸化について、少なくとも16の共通のセリン/スレオニン配列を含むが、これらすべての部位の重要性は不明である。Rb上のスレオニン821のリン酸化が、cdk2/複合体(例えば、サイクリンE/cdk2およびサイクリンA/cdk2)によって触媒されることが実証されている。このスレオニン821のリン酸化は、配列LXCXEを含むタンパク質とのRbの相互作用を分離する。このRbタンパク質の脱リン酸化は、Rbをその活性な増殖抑制状態に戻す。Rb上のリン酸の除去は、有糸分裂の完了時に、プロテインホスファターゼ1型(PP1)および非触媒調節サブユニットの多重結合複合体によって行われるようである。特定のアミノ酸残基でリン酸化されるRbの定量は、キナーゼの活性、ならびにRbタンパク質自身の活性化の機能的状態に関する重要な情報を提供する。例示の目的について、本発明者らは、スレオニン821で特異的にリン酸化されるRbタンパク質の量を定量するアッセイを設計した。このELISAは、[pT<sup>821</sup>]以外の部位でリン酸化されるRb、または非リン酸化Rbを認識しない。サンプルは、総Rbの並列測定によって、Rb含量について制御され得る。

30

40

#### 【0013】

WO01/11367(網膜芽細胞腫(RB)タンパク質に対するサイクリン/CDK複合体のリン酸化活性を修飾する化合物の同定についてのこの活性のアッセイ)は、合成ペプチド、およびこのペプチドのリン酸化形態を認識するモノクローナル抗体を用いたELISAによるキナーゼ活性の検出についての方法を記載する。この方法の基本原理は、キナーゼが作用する領域の共通配列を含む合成ペプチドを用いた固相のコートイングである。このペプチドは、キナーゼと接触するようになり、このキナーゼは、このペプチド上の特定の残基がリン酸化されるようになることを可能にする。このキナーゼの活性は、モノクローナル抗体の結合によって反映される。本発明は、WO01/11367と、キナーゼ活性についての基質として、天然のタンパク質を使用する能力が異なる。この特徴は、

50

ペプチドの使用よりも優れている。なぜなら、すべての天然に存在するリン酸化部位が表されるからである。ホスホセリンを認識する1つのモノクローナル抗体(クローン2B9)の使用は、天然に存在するタンパク質上のリン酸化部位間の特定のリン酸化部位の任意の区別が不可能である。特定のPSSAの本発明者らの使用は、ホスホスレオニン残基およびホスホチロシン残基の識別ならびに検出を可能にする。

#### 【0014】

別の例において、細胞表面レセプターが研究され、そしてキナーゼ依存性アッセイが設計された。上皮増殖因子レセプター(EGFR)は、レセプターチロシンキナーゼ(RTK)のファミリーに属し、これは、細胞成長、細胞生存、細胞増殖および細胞分化を調節する。EGFRは全長で、170kDaのI型膜貫通糖タンパク質として発現され、これは、細胞外のリガンド結合ドメイン、疎水性膜貫通領域、およびシグナル伝達に関連する高度に保存される細胞内の領域からなる。EGFRの細胞外ドメインおよび細胞内ドメインにおけるいくつかの欠失が、腫瘍の集団において見出されている。例えば、EGFRvIIIは、EGFR mRNAにおけるエキソン2~7の欠失を含む145kDaタンパク質である。細胞質ドメイン(cytoplasmic domain)を含まない100kDaの短縮型EGFRは、A431細胞(ヒト上皮癌腫細胞株)由来の培養上清において観察される。

10

#### 【0015】

EGFRは、多くのリガンド(例えば、EGF、トランスフォーミング増殖因子(TGF)、アンフィレギュリン(amphiregulin)、ベータセルリン(beta cellulin)、ヘパリン結合性EGF様増殖因子(HB-EGF)およびエピレギュリン(epiregulin))の結合によって活性化される。この結合は、EGFRホモダイマー化およびヘテロダイマー化、ならびにその内因性チロシンキナーゼの迅速な活性化、その後の細胞質ドメインにおける複数のチロシン残基の自己リン酸化を引き起こす。この分子のCOOH末端テイルにおけるチロシン残基のリン酸化は、サイトゾルのシグナリングタンパク質(Srcホモロジー2(SH2)ドメインを含む)についての結合部位として役立つ。インビボでのリン酸化のいくつかの部位は、EGFR(Tyr<sup>845</sup>、Tyr<sup>992</sup>、Tyr<sup>1068</sup>、Tyr<sup>1086</sup>およびTyr<sup>1173</sup>を含む)において同定されている。これらの部位は、種々の下流のシグナリングタンパク質を結合および活性化させ、このタンパク質は、SH2ドメイン(増殖因子レセプター結合タンパク質2(Grb2)、Srcホモロジーおよびコラーゲンドメインタンパク質(Shc)ならびにホスホリパーゼC-(PLC)を含む)を含む。これらのシグナリングタンパク質もしくは他のシグナリングタンパク質のレセプターへの結合またはそのリン酸化もしくはその両方は、引き続くシグナリング事象の伝達をもたらす、この事象は、DNA合成および細胞分裂となる。

20

30

#### 【0016】

EGFRの発現または増幅の上昇もしくはその両方は、乳癌、膀胱癌、神経膠腫癌、結腸癌、肺癌、扁平上皮癌、頭部および頸部癌、卵巣癌ならびに膵臓癌において見出されている。選択的化合物が開発されており、これは、EGFRの細胞外リガンド結合ドメイン、または細胞内チロシンキナーゼ領域のいずれかを標的し、マイトジェン応答および他の癌促進応答を調節するシグナリング経路の妨害をもたらす。これらの潜在的な抗癌因子は、多くの低分子であるチロシンキナーゼインヒビターを含む。

40

#### 【0017】

##### 発明の要約

本発明は、タンパク質のリン酸化の定量についてのアッセイおよび試薬を記載する。本方法は、タンパク質を、タンパク質をリン酸化するホスホキナーゼに供するステップ、および、このリン酸化タンパク質をこのリン酸化部位に特異的な抗体に接触するステップ、ならびに、このリン酸化部位に結合した抗体を検出するステップを包含する。本発明は、本発明の方法の実施に有用な抗体を含む。本発明は特に、タウタンパク質、Rbタンパク質およびEGFRタンパク質のリン酸化、ならびにこのタウタンパク質、Rbタンパク質

50

およびEGFRタンパク質のリン酸化の部位に特異的な抗体に関する。

【0018】

各々の例において、この標的タンパク質（タウ、RbまたはEGFR）は、インビトロまたはインビボでリン酸化され、そしてこの特異的リン酸化事象は、高度に選択的なリン酸化部位特異的抗体（PSSA）を用いて検出される。この標的されるリン酸化事象の出現または消失は、各々の部位でリン酸化され得るタンパク質の合計のパーセンテージとして定量され得る。

【0019】

このPSSAの高度に特異的な性能は、1つのタンパク質上の複数のリン酸化部位の並列した独立性測定を可能にする。さらに、異なるキナーゼは、異なるPSSA（これは、このタンパク質における異なる部位を選択的に標的化する）を用いることによって、同時に測定されることができ、それによって、リン酸化部位プロフィールの作製についての道を提供する。リン酸化タンパク質を疾患の診断指標または予後指標として定量する現存の方法とは対照的に、本発明は、特定の部位でタンパク質のリン酸化をもたらすプロテインキナーゼの酵素活性を測定する。また、本方法は、現在、製薬会社およびバイオテクノロジー会社によって新規の薬物を発見するために使用されている、大規模の「ハイスループットスクリーニング」フォーマットに適応しやすい。

10

【0020】

本明細書中で使用される用語、抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、FabフラグメントおよびF(ab)<sub>2</sub>フラグメント、遺伝子操作される抗体またはそのフラグメントをいう。例えば、ヒト化に改変されうる抗体は、交差種反応を最小化できる。pan抗体は、この用語が、本明細書中で使用される場合、タンパク質のリン酸化形態および非リン酸化形態に結合する抗体をいう。

20

【0021】

発明の詳細な説明

タウ系：タウタンパク質系は、正常状態および病理学的状態において、細胞内および細胞外の両方で見出されるタンパク質に対する本発明の有用性を実証する。このタウタンパク質は、複数のプロテインキナーゼによって作用される複数のリン酸化部位を有する。ホスホセリン残基およびホスホチロシン残基が存在する。モノホスホ残基および二重（dual）ホスホ残基の両方が、このモデル系において区別可能である。

30

【0022】

タウ組換えタンパク質：全長のタウ-441タンパク質は、ヒトタウcDNAのクローニング由来であり、そしてE.coliにおいて発現し精製される組換えタンパク質である。このタンパク質は、標準的な方法を介して精製される。このタンパク質は、複数の売り主から市販される。

【0023】

タウpS<sup>199</sup>PSSA：ウサギを、セリン199を含むタウタンパク質の最も長いアイソフォームの領域に対応する化学合成ホスホペプチドおよびKLH結合体化ホスホペプチドを用いて免疫した。この化学合成ホスホペプチド（RSGYS(pS)PGSPG）は、配列番号1である。このタウpS<sup>199</sup>PSSAを、連続したエピトープ特異性クロマトグラフィーによって、ウサギ血清から精製した。この抗体を、リン酸化部位に対応する非ホスホペプチドを用いて、ネガティブにあらかじめ吸着して、非リン酸化タウと反応性である抗体を除去した。

40

この最終産物は、セリン199でリン酸化されるペプチドを用いて、アフィニティークロマトグラフィーによって作製された。この抗体は、ウェスタンブロッティングアッセイ（western blotting assay）におけるペプチド競合分析によって実証されるように、セリン199上でリン酸化される場合、タウタンパク質を特異的に認識する。セリン199は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3（GSK-3）によって、インビトロおよびインビボでリン酸化される。この試薬は市販される。

【0024】

50

PSSA タウ特異性は、図 1 に示される。アフリカミドリザル腎臓 (CV-1) 細胞由来の細胞抽出物 (ヒト 4 リピートタウおよびプロテインホスファターゼインヒビターを安定に発現させる) を、10% トリス-グリシゲル上で、SDS-PAGE によって分解した。このタンパク質を、ニトロセルロース (膜) に転移した。ペプチド免疫原の非存在下 (a) またはペプチド免疫原の存在下 (b)、あるいはタウホスホペプチドに対応する非ホスホペプチドにおいて (c)、あらかじめインキュベートした後、膜を、0.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗ホスタウ [pS<sup>199</sup>] とともにインキュベートした。洗浄後、膜を、ヤギ F(ab')<sub>2</sub> 抗ウサギ IgG アルカリホスファターゼとともにインキュベートし、そしてバンドを、Tropix Western Star (登録商標) 検出方法を用いて検出した。図 1 におけるデータは、この部位に対応するホスホペプチドのみが、抗体シグナルをブロックし、このリン酸化部位についての抗タウ [pS<sup>199</sup>] 抗体の特異性を例示することを示す。

10

20

30

40

50

#### 【0025】

タウ [pS<sup>214</sup>] PSSA。この抗体の作製についての手順は、タウ pS<sup>199</sup> PSSA についての上記の手順と類似した。この化学合成ホスホペプチドは、セリン 214 を含むタウタンパク質の最も長いアイソフォームの領域 (GSRSTRP(pS)LP T P P (配列番号 2)) に由来した。この抗体は、ウェスタンブロッティングアッセイにおけるペプチド競合分析によって実証されるように、セリン 214 上でリン酸化される場合、タウタンパク質を特異的に認識する。セリン 214 は、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) によって、インビトロおよびインビボでリン酸化される。この試薬は、Bio

#### 【0026】

タウ pS<sup>214</sup> PSSA 特異性は、図 2 に示される。SF-9 細胞抽出物 (ヒト 4 リピートタウを発現する) を、10% トリス-グリシゲル上で、SDS-PAGE によって分析した。このタンパク質を、ニトロセルロース (膜) に転移した。ペプチド免疫原の非存在下 (a) またはペプチド免疫原の存在下 (b)、あるいはタウホスホペプチドに対応する非ホスホペプチドにおいて (c)、あらかじめインキュベートした後、膜を、0.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗ホスタウ [pS<sup>214</sup>] とともにインキュベートした。洗浄後、膜を、ヤギ F(ab')<sub>2</sub> 抗ウサギ IgG アルカリホスファターゼとともにインキュベートし、そしてバンドを、Tropix Western Star (登録商標) 検出方法を用いて検出した。図 2 におけるデータは、この部位に対応するホスホペプチドのみが、抗体シグナルをブロックし、このリン酸化部位についての抗タウ [pS<sup>214</sup>] 抗体の特異性を例示することを示す。他のタウ部位 [pS<sup>202</sup>、pS<sup>396</sup>、pT<sup>181</sup>、pS<sup>199</sup> / pS<sup>202</sup>、pS<sup>404</sup>] に対する PSSA は、類似の方法を用いて特徴付けられる。

#### 【0027】

##### Pan-タウポリクローナル抗体

ウサギを、組換えタウタンパク質を用いて免疫した。この抗体を、プロテイン A アフィニティーカラムを用いて、ウサギ血清から精製した。この抗体は、タウタンパク質上の複数の抗原性部位を認識する。この抗体は、タウタンパク質の非リン酸化形態およびリン酸化形態の両方に結合する。

#### 【0028】

##### タウ-5モノクローナル抗体 (mAb)

タウに対するマウス mAb を、精製されたウシ微小管結合タンパク質 (MAP) を免疫原として用いて惹起した。そして、免疫化 BALB/c マウス脾臓細胞およびマウス骨髄腫 Sp2/0-Ag14 細胞の融合によってハイブリドーマを産生した。これは、他の MAP またはチューブリンとの交差反応を示さない。これは、タウの非リン酸化形態、ならびにタウのリン酸化形態と反応し、そしてこの反応性エピトープは、残基 210 ~ 230 をマッピングする。この試薬は、Bio source International から市販される。

## 【0029】

全体的タウELISAおよびホスタウELISA

炭酸塩緩衝液、pH 9.4における $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のタウ-5モノクローナル抗体を、4で一晚、マイクロタイタープレートにおいて、1ウェル当たり $100 \mu\text{L}$ でインキュベートした。このウェルを、PBS/Tween-20溶液で3回洗浄し、その後、他の部位に対して、このプラスチック表面上で、関連のないタンパク質（例えば、BSA）を含む緩衝化溶液を用いて、室温で2時間ブロックした。GSK-3リン酸化タウ、PKAリン酸化タウおよび非リン酸化タウを、種々の濃度でウェルに添加し、そして室温で1時間インキュベートした。洗浄緩衝液での3回の洗浄後、このウェルを、それぞれタウ $\text{pS}^{214}$  PSSA、タウ $\text{pS}^{199}$  PSSAおよびPan-タウ抗体とともに、最適濃度で（ $0.1 \sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲）、室温で1時間インキュベートした。次いで、このプレートを、洗浄緩衝液を用いて3回洗浄し、その後、室温で1時間、 $1:5000$ 希釈のHRP結合体化抗ウサギIgG二次抗体を添加した。洗浄後、 $100 \mu\text{L}$ の安定化クロモゲンを、各々のウェルに添加し、次いで、室温、暗所で20分間インキュベートした。 $450 \text{nm}$ でのO.D.値を、各々のウェルへの停止溶液の添加後に測定した。

10

## 【0030】

キナーゼ反応

PKAを用いたタウのリン酸化は、以下のように生じた。PKAを、New England Biolabsより購入した。組換えタウタンパク質（ $1 \mu\text{g}$ ）を、種々の濃度のPKA酵素とともに、 $50 \text{mM}$  トリス-HCl（pH 7.5）、 $10 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  および $100 \mu\text{M}$  ATPを含む緩衝液において、30で1時間インキュベートした。

20

## 【0031】

GSK-3を用いたタウのリン酸化

GSK-3を、Upstate Biotechnology Inc.より購入した。組換えタウタンパク質（ $1 \mu\text{g}$ ）を、種々の濃度の酵素とともに、 $40 \text{mM}$  HEPES（pH 7.2）、 $5 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $5 \text{mM}$  EDTA、 $100 \mu\text{M}$  ATPおよび $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  ヘパリンを含む緩衝液において、30で1時間インキュベートした。

## 【0032】

図3aおよび3bは、ELISAによるPKA/Ser $^{214}$ 部位での全体的タウリン酸化および選択的タウリン酸化の評価を示す。図3aにおいて、リン酸化タウをELISAに配置し、タウ $\text{pS}^{214}$ に特異的なPSSAまたはpan-タウ抗体のいずれかによって検出した。両方の検出抗体は、等しいシグナルでリン酸化タウを検出した。図3bにおいて、非リン酸化タウを、同じアッセイに配置した。期待されるように、タウ $\text{pS}^{214}$ は、リン酸基を含まないタウタンパク質を検出できなかったが、一方、pan-タウ検出器は、このタンパク質を定量した。

30

## 【0033】

図4aおよび4bは、ELISAによるGSK-3/Ser $^{199}/^{202}$ 部位での全体的タウリン酸化および選択的タウリン酸化の評価を示す。図4aは、タウ $\text{pS}^{199}/^{202}$ の検出器を用いたELISAにおいて、非リン酸化タウまたはGSK-3リン酸化タウのいずれかを使用する。非リン酸化タウは、ELISAにおいて陽性に反応しないが、一方、リン酸化タウは、強力な結果を示す。pan-タウが検出器として使用される場合、両方のタンパク質が、容易に検出される（図4b）。

40

## 【0034】

図5は、インビトロでの反応に添加されるキナーゼ活性の量の関係として、ELISAによって検出されるホスタウの量間の直接的関係を示す。種々の量のPKA酵素を使用して、タウタンパク質をリン酸化した。最も高い濃度のPKAである5単位（PKAタウ1）で開始して、次いでPKA酵素を、示されるように、 $1:2$ で系列希釈し、その後 $1:1000$ 希釈し、次いでELISAアッセイの各々のウェルに適用した。ホスタウの

50

検出を、タウに対するPSSAを用いて行い、このPSSAは、Ser<sup>214</sup> (PKA部位)でリン酸化される。これらのデータは、この反応において、キナーゼの量が低い程、より低い量の産生ホスホプロテインが、ELISAにおいて検出されることを示す。従って、このELISAは、ホスホキナーゼ活性の間接的測定である。

【0035】

図6aおよび6bは、タウPSSAおよびELISAを用いた、PKA対GSK3 酵素によって触媒されるタウタンパク質のリン酸化の検出における特異性を示す。この結果は、このタウpS<sup>214</sup> PSSA ELISAが、PKAによってリン酸化される場合にタウのみを検出し、そしてタウpS<sup>199</sup> PSSA ELISAが、GSK3 によってリン酸化される場合にタウのみを検出することを実証する。

10

【0036】

図7は、GSK3 酵素が、タウタンパク質上の複数の部位をリン酸化し得、そしてPSSAが、タウpT<sup>181</sup>、タウpS<sup>202</sup>、タウpS<sup>199</sup> / pS<sup>202</sup>、タウpS<sup>396</sup> およびタウpS<sup>404</sup> でのリン酸化部位を独立して検出し得ることを示す。これは、このELISAが、キナーゼ酵素活性に供されるタンパク質に対するリン酸化事象のプロファイルの作製に有用であるという証拠を提供する。

【0037】

図8は、2つの抗体(一方は、PKAリン酸化部位(pS<sup>214</sup>)に特異的であり、そして他方は、タウタンパク質上のGSK部位(pS<sup>199</sup>)に特異的である)を用いたプロフィールとして試験される場合のキナーゼ反応の特異性を示す。PKA特異的阻害剤であるPKI(c-AMP依存性プロテインキナーゼの熱安定性阻害剤; New England Biolab)を、酵素(PKAまたはGSKのいずれか)に対し阻害剤の種々の比で混合し、そして得られる混合物を、タウPSSAを用いたELISAによって分析した。このPKA特異的阻害剤は、pS<sup>214</sup> 部位単独のキナーゼ活性を変更させた。これらのデータは、ELISAの特異性、および同じタンパク質に対する異なる部位でのキナーゼ活性を独立してモニターする能力を再び証明する。これらのデータはまた、キナーゼ活性の薬物妨害についてスクリーニングする能力を示す。

20

【0038】

表IIに示される他のタウ部位に対する抗体がまた、本発明の代表である。リン酸化部位のいくつかは、表IIにさらに示されるように、疾患に関連することが公知である。

30

【0039】

【表 2】

表II

リン酸化部位	疾患との関連(Y/N/?)	注釈 (NGD=神経変性疾患; FTD=)
T39	?	カゼインキナーゼIIIによるリン酸化
T181、hu	?	変化前(preangle)プロセスに関与?
S184	Y	GSK-3bによるリン酸化; 微小管ネットワークを破壊
S195	Y	GSK-3bによるリン酸化; 微小管ネットワークを破壊
S198	Y	GSK-3bによるリン酸化; 微小管ネットワークを破壊
S199	Y	GSK-3bによるリン酸化; 遺伝性FTDに関連
S202	Y	CDK5およびGSK-3bによる微小管依存性リン酸化; 遺伝性NGDに関連
T205	?	CDK5およびGSK-3bによる微小管依存性リン酸化
T212	Y	NGDプロセスに特異的; GSK-3bおよびPKAによるリン酸化
S214	Y	NGDプロセスに特異的; 凝集をブロックし得る; PKAによるリン酸化
2T17	?	
T231	Y	変化前プロセスに関与?; GSK-3bおよびcdc2/CDK1によるリン酸化
S235	?	GSK-3bによる微小管依存性リン酸化
S262	Y	凝集をブロックし得る; CAM K IIおよびGSK-3bによるリン酸化; AD脳における主要部位
S320	?	
S324	?	
S356	Y	変化前プロセスに関与?; AD経路; AD脳における主要部位; GSK-3bによるリン酸化
S361	?	
S396	N	GSK-3bによるリン酸化
S400	?	GSK-3bによるリン酸化
T403	?	
S404	?	変化前プロセスに関与?; 微小管依存性リン酸化; GSK-3bによるリン酸化
S409	Y	AD経路; PKAによるリン酸化
S412	?	AD経路
S413	Y	AD経路; GSK-3bによるリン酸化
S416	?	CAM K IIIによるリン酸化
S422	Y	いくつかのNGDに関連; MAPKによるリン酸化

10

20

30

40

## 【0040】

R b系: このモデル系は、複数のプロテインキナーゼによって作用される複数のリン酸化部位を含む大きな核内タンパク質を与える。ホスホセリン残基およびホスホチロシン残基が存在する。モノホスホ残基および二重ホスホ残基の両方が、このモデル系において識別可能である。

50

## 【0041】

Rbタンパク質：全長Rbタンパク質は、ヒトRb cDNAのクローニング由来であり、そしてE. coliにおいて発現される精製組換えタンパク質である。このタンパク質は、標準的な方法を介して精製される。このタンパク質は、複数の売り主から市販される。

## 【0042】

Rb [pT<sup>8 2 1</sup>] PSSA：ウサギ抗血清を、スレオニン821を含むヒトRbの領域由来の化学合成ホスホペプチドに対して産生した。抗体を、連続したエピトープ特異的クロマトグラフィーによって、ウサギ血清から精製した。この抗体を、リン酸化部位に対応する非ホスホペプチドを用いて、ネガティブにあらかじめ吸着して、非リン酸化pRbと反応性を有する抗体を除去した。この最終産物を、スレオニン821でリン酸化されるpRb由来ペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって作製した。図9は、抗Rb [pT<sup>8 2 1</sup>]の特異性を規定する。7.5% トリス-グリシゲル上でのSDS-PAGEは、MCF-7細胞から調製される細胞抽出物を分解した。次いで、このタンパク質を、PVDFに転移した。膜を、ペプチド免疫原の非存在下(a)またはペプチド免疫原の存在下(b)、RBホスホペプチドに対応する非ホスホペプチド(c)、ホスホRB上のスレオニン356に対応するホスホペプチド(d)、ホスホRB上のセリン807/811に対応するホスホペプチド(e)、ホスホRB上のセリン249/スレオニン252に対応するホスホペプチド(f)、およびホスホRB上のセリン751に対応するホスホペプチド(g)において、あらかじめインキュベートした後、0.5 μg/mL 抗RB [pT<sup>8 2 1</sup>]とともにインキュベートした。洗浄後、膜を、ヤギF(ab')<sub>2</sub> 抗ウサギIgGアルカリホスファターゼとともにインキュベートし、そしてバンドを、Tropix Western Star (登録商標) 検出方法を用いて検出した。このデータは、この部位に対応するホスホペプチドのみが、抗体シグナルをブロックし、従って、このリン酸化残基についての抗Rb [pT<sup>8 2 1</sup>]抗体の特異性を実証することを示す。

## 【0043】

全体的なRb [pan] 検出抗体：この検出抗体は、モノクローナルであり(クローンG3-245)、BD/Pharmingen (San Diego, CA) から市販される。これは、Rbタンパク質のアミノ酸332~344間のエピトープを認識する。この抗体は、Rbタンパク質の非リン酸化形態およびリン酸化形態の両方に結合する。

## 【0044】

Rbモノクローナル抗体：この捕捉抗体[固相に結合される]は、モノクローナルであり(クローン3C8)、QED Biosciences (San Diego, CA) から市販される。これは、Rbタンパク質のC末端付近(aa886~aa905)上のエピトープと反応する。この抗体は、Rbタンパク質の非リン酸化形態およびリン酸化形態の両方に結合する。

## 【0045】

全体的なRb ELISAおよびRb [pT<sup>8 2 1</sup>] ELISA：炭酸塩緩衝液、pH 9.4における1.25 μg/mLの濃度のRbモノクローナル抗体を、4℃で一晩、マイクロタイタープレートにおいて、1ウェル当たり100 μLでインキュベートした。このウェルを、PBS/Tween-20溶液で3回洗浄し、その後、他の部位に対して、このプラスチック表面上で、関連のないタンパク質(例えば、BSA)を含む緩衝化溶液を用いて、室温で2時間ブロックした。リン酸化Rbまたは非リン酸化組換えRbを含むジャーカット細胞溶解物を、種々の濃度でウェルに添加し、そして室温で2時間インキュベートした。洗浄緩衝液での3回の洗浄後、このウェルを、それぞれRb [pT<sup>8 2 1</sup>] PSSA、およびビオチン化(biotinylated) pan-Rb抗体とともに、最適濃度で(0.1~1 μg/mLの範囲)、室温で1時間インキュベートした。次いで、このプレートを、洗浄緩衝液を用いて3回洗浄し、その後、室温で1時間、1:5000希釈でのHRP結合体化抗ウサギIgG二次抗体、または0.25 μg/mLのストレプト

10

20

30

40

50

トアビジン - HRP を添加した。洗浄後、100  $\mu$ L の安定化クロモゲンを、各々のウェルに添加し、次いで、室温、暗所で20分間インキュベートした。450 nm でのOD値を、各々のウェルへの停止溶液の添加後に測定した。

【0046】

図10は、Rb [ p T <sup>8 2 1</sup> ] E L I S A の特異性を決定するための研究を示す。第一の研究において、ジャーカット、U2OSおよびColo205由来の20 ng / mL の濃度でのRbタンパク質を含む溶液を、20 ng / mL の精製全長Rbタンパク質 ( E . c o l i において発現される ( 非リン酸化 ) ) を含む溶液とともに、Rb [ p T <sup>8 2 1</sup> ] E L I S A キットを用いて分析した。図11は、この細胞株から単離されるRbタンパク質が、強かに認識されたことを示す。これらのデータは、Rbタンパク質の適切なリン酸化が、このアッセイにおける反応性に必要であるという証拠を提供する。

10

【0047】

第二の研究において、スレオニン821に対する特異性を、ペプチド競合によって決定した。図11に示されるデータは、スレオニン821周囲の領域に対応するペプチド ( ホスホスレオニンを含む ) のみが、このE L I S A シグナルをブロックし得ることを示す。

【0048】

Rbについてのキナーゼ反応 : Rbについての天然の供給源を、これらの研究について、指数増殖細胞から得た。内因性の細胞性キナーゼは、天然のRbタンパク質のリン酸化を提供した。図12は、キナーゼ反応を研究するためのこのE L I S A の適用を示す。ジャーカット細胞を、溶解の前に、キナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンの存在下で、種々の濃度で36時間増殖させた。溶解物を、BioSource Total Rb E L I S A ( カタログ番号KH00011 ) を用いて、全Rb含量について正規化した。スレオニン821でのRbリン酸化のレベルを決定した。これらのデータは、スタウロスポリンが、おそらくcdkの阻害を通じてスレオニン821でのRbのリン酸化を阻害することを示す。

20

【0049】

E G F R 系 : このモデル系は、細胞表面レセプタータンパク質を与える。このタンパク質は大きく、複数のリン酸化部位は、ホスホスレオニン残基、ホスホセリン残基およびホスホチロシン残基からなる。

【0050】

E G F R タンパク質 : ヒトE G F R タンパク質を、アフィニティー精製によって、ヒト癌腫A431細胞から精製した。この産物を、Sigma ( S t . L o u i s , M O カタログ番号E - 2645 ) から購入する。

30

【0051】

( E G F R [ p Y <sup>1 1 7 3</sup> ] P S S A ) : ウサギ抗血清を、チロシン1173を含むE G F R の領域由来の化学合成ホスホペプチドに対して産生した。この配列は、ヒト、マウスおよびラットにおいて保存される。抗体を、連続したエピトープ特異的クロマトグラフィーによって、血清から精製した。この抗体を、( i ) 非リン酸化E G F R 酵素と反応性である抗体を除去するために、リン酸化部位に対応する非ホスホペプチドを用いて、そして( i i ) ホスホチロシンと反応性である抗体を除去するために、一般的チロシンリン酸化ペプチドを用いて ( 配列に関係なく ) 、ネガティブにあらかじめ吸着した。この最終産物は、チロシン1173でリン酸化される、E G F R 由来ペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって作製される。図13は、E G F R P S S A [ p Y <sup>1 1 7 3</sup> ] の特異性を例示する。E G F R を発現するN I H 3 T 3 細胞から調製される細胞抽出物を、30時間飢餓させ、次いで、30 ng / mL E G F を用いて10分間刺激するか ( + ) 、または刺激しないままにし ( - ) 、次いで、6% トリス - グリシンゲル上でのS D S - P A G E によって分解し、そしてニトロセルロースに転移した。膜を、ペプチド免疫原の非存在下 ( レーン1および2 ) またはペプチド免疫原の存在下 ( レーン3および4 ) 、あるいはE G F R ホスホペプチドに対応する非ホスホペプチド ( レーン5および6 ) において、あらかじめインキュベートした後、0 . 50  $\mu$ g / mL 抗E G F R [ p

40

50

Y<sup>1173</sup> ] 抗体とともにインキュベートした。洗浄後、膜を、ヤギ F ( a b ' )<sub>2</sub> 抗ウサギ Ig G アルカリホスファターゼとともにインキュベートし、そしてバンドを、Tropix Western Star (登録商標) 検出方法を用いて検出した。このデータは、この部位に対応するホスホペプチドのみが、抗体シグナルをブロックし、このリン酸化残基についての抗 EGFR [ p Y<sup>1173</sup> ] 抗体の特異性を実証することを示す。

【0052】

EGFR [ p Y<sup>845</sup> ] PSSA : EGFR [ p Y<sup>845</sup> ] PSSA として本質的に調製されるが、チロシン 845 を含む領域由来の化学合成ホスホペプチドを用いた。

【0053】

EGFR [ pan ] モノクローナル抗体 : この捕捉抗体は、マウスモノクローナル抗体であり (クローン 199.12)、Neomarkers, Inc. (Union City, CA) から市販される。これは、ヒト EGFR に特異的であり、そして HER2/neu、HER3 および HER4 と反応しない。この抗体は、EGFR タンパク質の非リン酸化形態およびリン酸化形態の両方に結合する。 10

【0054】

EGFR [ pan ] 検出抗体 : このウサギ抗体を、ヒト EGFR の C 末端に対応する合成ペプチドを用いた免疫によって調製した。この抗体を、プロテイン A アフィニティーカラムを用いて精製した。これは、HER2/neu、HER3 および HER4 との交差反応性を示さない。

【0055】

EGFR PSSA および全長 ELISA : 炭酸塩緩衝液、pH 9.4 における 2.5 μg/mL の濃度の pan-EGFR モノクローナル抗体を、4 で一晩、マイクロタイタープレートにおいて、1 ウェル当たり 100 μL でインキュベートした。このウェルを、PBS/Tween-20 溶液で 3 回洗浄し、その後、他の部位に対して、このプラスチック表面上で、関連のないタンパク質 (例えば、BSA) を含む緩衝化溶液を用いて、室温で 2 時間ブロックした。自己リン酸化 EGFR または非リン酸化 EGFR を、種々の濃度でウェルに添加し、そして室温で 1 時間インキュベートした。洗浄緩衝液での 3 回の洗浄後、このウェルを、それぞれ EGFR [ p Y<sup>845</sup> ] PSSA、EGFR [ p Y<sup>1173</sup> ] PSSA および pan-EGFR 抗体とともに、最適濃度で (0.1 ~ 1 μg/mL の範囲)、室温で 1 時間インキュベートした。次いで、このプレートを、洗浄緩衝液を用いて 3 回洗浄し、その後、室温で 1 時間、1 : 2000 希釈で、HRP 結合体化抗ウサギ Ig G 二次抗体を添加した。洗浄後、100 μL の安定化クロモゲンを、各々のウェルに添加し、次いで、室温、暗所で 20 分間インキュベートした。450 nm での OD 値を、各々のウェルへの停止溶液の添加後に測定した。 20 30

【0056】

チロシン残基 1173 についての EGFR [ p Y<sup>1173</sup> ] ELISA の特異性を、ペプチド競合によって決定した。図 14 に示されるデータは、チロシン残基 1173 周囲の領域に対応するペプチド (ホスホスレオニンを含む) のみが、この ELISA をブロックし得ることを示す。

【0057】

キナーゼ反応 : (自己リン酸化)

EGFR を、1 μM ATP を含む、15 mM HEPES (pH 7.4)、6 mM MnCl<sub>2</sub> および 15 mM MgCl<sub>2</sub> の緩衝液において、30 で 30 分間インキュベートした (自己リン酸化)。

【0058】

図 15 は、10 分間の 1 ~ 500 ng/mL での EGF を用いた処理後の、A431 細胞における EGFR のリン酸化の応答曲線を実証する。EGFR チロシンのリン酸化を、EGFR [ p Y<sup>1173</sup> ] ELISA を用いて検出した。

【0059】

図 16 は、本発明の使用を実証して、残基 p Y 845 での EGFR に関連するプロテ 50

ンキナーゼ活性、およびプロテインキナーゼ阻害機能によるこの活性の阻害を検出する。  
 1 バイアル当たり 2 ng の精製ヒト E G F R を、1 μ M A T P を含む、15 m M H E P E S ( p H 7 . 4 )、6 m M M n C l 2 および 15 m M M g C l 2 の緩衝液において、30 で 30 分間インキュベートした ( 自己リン酸化 )。E G F R [ p Y 8 4 5 ] のリン酸化阻害について、チロシンキナーゼインヒビターである P D 1 5 8 7 8 0 ( C a l b i o c h e m、カタログ番号 5 1 3 0 3 5 ) を、指示濃度でバイアルに添加した。E G F R [ p Y 8 4 5 ] のリン酸化を、E G F R [ p Y 8 4 5 ] リン酸化部位特異的 E L I S A を用いて、4 n g / m L で測定した。

【 0 0 6 0 】

表 1 : シグナル伝達タンパク質を列挙し、このリン酸化は、本発明の方法によって決定 10  
 され得る。

【 0 0 6 1 】

表 1

シグナル伝達タンパク質の例

タンパク質

A

- アクチニン

- シヌクレイン ( a l p h a - s y n u c l e i n )

A B L / c - A b l ( エイブルソン非レセプタータンパク質チロシンキナーゼ ( A b e l 20  
 s o n n o n r e c e p t o r p r o t e i n t y r o s i n e k i n a s e ) )

アセチルコリンレセプター

A c k 非レセプタータンパク質チロシンキナーゼ

A k t / P K B セリン / スレオニンプロテインキナーゼ

A P - 1 ( アクチベータータンパク質 1 j u n / f o s 二量体転写因子 )

A P - 2 ( アクチベータータンパク質 2 転写因子 )

A p a f - 1 ( アポトーシスプロテアーゼ活性化因子 1 )

A p a f - 2 ( アポトーシスプロテアーゼ活性化因子 2 / シトクロム C )

A p a f - 3 ( アポトーシスプロテアーゼ活性化因子 3 / カスパーゼ 9 ) 30

A r p 2 / 3 ( アクチン関連 ( r e l a t e d ) タンパク質 )

A t f - 1 ( 活性化転写因子 1 ( A c t i v a t i n g t r a n s c r i p t i o n  
 f a c t o r - 1 ) A t f - 2 ( 活性化転写因子 2 )

A t f - 3 ( 活性化転写因子 3 )

A t f - 4 ( 活性化転写因子 4 )

A T M ( 血管拡張性失調症変異タンパク質 )

B

B - A T F 核塩基性ロイシンジッパータンパク質 / 転写因子 ( n u c l e a r b a s  
 i c l e u c i n e z i p p e r p r o t e i n / t r a n s c r i p t i o n 40  
 f a c t o r s )

B a d

B a k

B a x

B c l - 2 ( B 細胞慢性リンパ性白血病 2 )

B c l - x L

B c l - x S

B C R / A B L タンパク質チロシンキナーゼ

カテニン

B I D ( B H - 3 相互作用性細胞死誘導領域 ( I n t e r a c t i n g D e a t h D 50

o m a i n ) )

B l k ( B リンパ球 S r c 非レセプタータンパク質チロシンキナーゼファミリーメンバー )

B M K - 1 ( 大 M A P キナーゼ ( B i g M A P K i n a s e ) / E R K 5 )

B t k ( ブルトンチロシンキナーゼ ( B r u t o n ' s T y r o s i n e K i n a s e )

C

カドヘリン

C A D T K ( カルシウム活性化タンパク質チロシンキナーゼ / C a k / P y k 2 / F A K 2 / R A F T K ) 10

C A K ( C d k - 活性化キナーゼ )

C a k - ( 細胞接着キナーゼ / C A D T K / P y k 2 / F A K 2 / R A F T K )

カルデスモン

カルモジュリン

カルバインシステインプロテアーゼ

C a M キナーゼ I I ( カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ I I )

C B 1 ( カンナビノイドレセプター 1 )

C B 2 ( カンナビノイドレセプター 2 )

カスパーゼ 2 ( システインアスパルチルプロテアーゼ 2 / I C H - 1 / N E D D - 2 ) 20

カスパーゼ 3 ( システインアスパルチルプロテアーゼ 3 / L I C E / C P P 3 2 / Y A M A / アポパイン ( a p o p a i n ) / S C A - 1 )

カスパーゼ 8 ( システインアスパルチルプロテアーゼ 8 / M A C H / F L I C E / M c h 5 )

カスパーゼ 9 ( システインアスパルチルプロテアーゼ 9 / I C E - L A P 6 / M c h 6 / A P A F - 3 )

カベオリン 1、2 および 3

C D 4 5 膜貫通チロシンホスファターゼ

C D 4 5 A P ( C D 4 5 結合タンパク質 )

c - f o s 転写因子

C D K 1 / c d c 2 ( サイクリン依存性キナーゼ 1 )

C D K 2 ( サイクリン依存性キナーゼ 2 )

C D K 4 ( サイクリン依存性キナーゼ 4 )

C D K 5 ( サイクリン依存性キナーゼ 5 )

c - J u n 転写因子

c - m y c 転写因子

コルタクチン ( C o r t a c t i n )

C O X - 2 ( シクロオキシゲナーゼ 2 / プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ 2 )

c - k i t レセプタータンパク質

c - r a f タンパク質セリン / スレオニンキナーゼ

C R E B 転写因子

C r k S H 2 および S H 3 ドメイン含有アダプタータンパク質

C S K ( カルボキシル末端 S r c キナーゼ )

シトクロム c

D

D A P K ( 細胞死 ( D e a t h ) 結合プロテインキナーゼ )

デスミン

D N A - P K ( D N A 依存性プロテインキナーゼ )

50

## E

E 2 F - 1 DNA 結合タンパク質

E G F - R (上皮増殖因子レセプター)

e I F - 2 (真核生物転写開始因子 2)

E R K 1 / M A P K (細胞外シグナル制御/マイトジェン活性化プロテインキナーゼ 1)

E R K 2 / M A P K (細胞外シグナル制御/マイトジェン活性化プロテインキナーゼ 2)

E R K 3 (細胞外シグナル制御/p 6 2 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ 3)

E R K 4 (細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ 4)

E R K 5 (細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ 5 / 大 M A P キナーゼ 1)

E R K 6 (細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ 6 / p 3 8)

E R K 7 (細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ 7)

E R K 5 (細胞外シグナル制御プロテインキナーゼ 8)

10

## F

F アクチン

F A D D (F a s 結合細胞死誘導領域)

F A K (フォーカルアドヒージョンキナーゼ / p p 1 2 5 F A K)

F A S (F A S リガンドレセプター)

F g r 非レセプター S r c ファミリーチロシンキナーゼ

F o s B

F r a - 1 (F o s 関連 ( r e l a t e d ) 抗原 1)

F r a - 2 (F o s 関連抗原 2)

F R K (F o s 制御 ( r e g u l a t i n g ) キナーゼ)

F Y B (F y n 結合タンパク質)

F y n 非レセプター S r c ファミリーチロシンキナーゼ

20

## G

G a b 1 (G r b 2 結合バインダー ( b i n d e r ) 1)

G a b 2 (G r b 2 結合バインダー 2)

G C K (胚中心キナーゼ)

G E F (グアニンヌクレオチド交換因子)

G i 抑制性グアニンヌクレオチド結合タンパク質 ( G i i n h i b i t o r y g u a n i n e n u c l e o t i d e r e g u l a t o r y p r o t e i n )

G i 抑制性グアニンヌクレオチド結合タンパク質

G i 抑制性グアニンヌクレオチド結合タンパク質

G q / 1 1 グアニンヌクレオチド結合タンパク質

G q / 1 1 グアニンヌクレオチド結合タンパク質

G q / 1 1 グアニンヌクレオチド結合タンパク質

G r b 2 (増殖因子レセプター結合タンパク質 2)

G r k 2 (G タンパク質共役レセプターキナーゼ)

G s k - 3 (グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3)

G s k - 3 (グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3)

30

40

## H

H c k (造血細胞キナーゼ)

H G F - R (肝細胞増殖因子レセプター)

H r k (3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル補酵素 A レダクターゼキナーゼ)

## I

50

I B N F B抑制性タンパク質	
I B N F B抑制性タンパク質	
I K K ( I k Bキナーゼ )	
I K K ( I k Bキナーゼ )	
I K K ( I k Bキナーゼ / N E M O )	
I G F - 1レセプター(インスリン様増殖因子Iレセプター)	
インスリンレセプター	
インテグリン	
インテグリン結合タンパク質( I A P / C D 4 7 )	
I R A K ( インターロイキン - 1レセプター結合キナーゼ )	10
I R K ( インスリンレセプターキナーゼ )	
I R S - 1 ( インスリンレセプター基質 1 )	
I R S - 2 ( インスリンレセプター基質 2 )	
J	
J A B 1 ( J u n 活性化ドメイン結合タンパク質 1 ( J u n - A c t i v a t i o n d o m a i n B i n d i n g p r o t e i n 1 ) )	
J A K 1 ( J a n u s 活性化キナーゼ 1 ( J a n u s A c t i v a t i n g K i n a s e 1 ) )	
J A K 2 ( J a n u s 活性化キナーゼ 2 ) J A K 3 ( J a n u s 活性化キナーゼ 3 )	20
J N K 1 / S A P K ( c - J u n アミノ末端キナーゼ 1 / ストレス活性化プロテインキナーゼ )	
J N K 2 / S A P K ( c - J u n アミノ末端キナーゼ 2 / ストレス活性化プロテインキナーゼ )	
J N K 3 / S A P K ( c - J u n アミノ末端キナーゼ 3 / ストレス活性化プロテインキナーゼ )	
L	
L A T ( T細胞の活性化のためのリンカー )	
L c k非レセプターS r cファミリータンパク質チロシンキナーゼ	30
L y n非レセプターS r cファミリータンパク質チロシンキナーゼ	
M	
M E F 2 c 転写因子	
M E K 1 ( マイトジェン活性化 E R K 活性化キナーゼ 1 )	
M E K 2 ( マイトジェン活性化 E R K 活性化キナーゼ 2 )	
M E K 3 ( マイトジェン活性化 E R K 活性化キナーゼ 3 )	
M E K 4 ( マイトジェン活性化 E R K 活性化キナーゼ 4 )	
M E K 5 ( マイトジェン活性化 E R K 活性化キナーゼ 5 )	
M E K K 1 ( M E K キナーゼ 1 )	40
M e t ( c - m e t / H G F レセプター )	
M K P 1 ( M A P キナーゼホスファターゼ 1 )	
M K P 2 ( M A P キナーゼホスファターゼ 2 )	
M K P 3 ( M A P キナーゼホスファターゼ 3 )	
M K P 4 ( M A P キナーゼホスファターゼ 4 )	
M K P 5 ( M A P キナーゼホスファターゼ 5 )	
M K P 6 ( M A P キナーゼホスファターゼ 6 )	
M L C K ( ミオシン軽鎖キナーゼ ) M u S K ( 筋特異的セリン / スレオニンキナーゼ )	
ミオシン	
M L C K P p a s e ( ミオシン軽鎖キナーゼホスファターゼ )	50

## N

N A P ( ニューロンアダプタータンパク質 / A P - 3 )  
 N A T 1 / D A P - 5 ( 新規 A P O B E C - 1 標的番号 1 / 細胞死結合タンパク質 5 ( N o v e l A P O B E C - 1 T a r g e t n o . 1 / D e a t h - A s s o c i a t e d P r o t e i n - 5 ) )  
 N C K S H 2 および S H 3 ドメイン含有トランスフォーミングタンパク質  
 N e k 2 ( N i m a 関連キナーゼ 2 ( N i m a - r e l a t e d K i n a s e 2 ) )  
 N F A T - 1 ( 活性化 T 細胞の核因子 ( N u c l e a r F a c t o r o f A c t i v a t e d T - c e l l s ) ) 10  
 N f B ( 核因子 B 転写因子 )  
 N I K ( N F B 誘導化 ( I n d u c i n g ) キナーゼ )  
 N T K ( 神経組織および T 細胞キナーゼ )

## P

p 1 3 0 c a s  
 p 1 9 0 R h o G A P G T P a s e  
 P 2 Y 2 プリノセプター ( p u r i n o c e p t o r )  
 p 3 6 C A K アセンブリ / 活性化因子 ( a s s e m b l y / a c t i v a t i o n f a c t o r ) 20  
 p 3 8 ( E R K 6 M A P K / S A P K )  
 p 3 8 d ( S A P K 4 )  
 p 5 3 癌抑制遺伝子  
 p 5 8 I P K ( インターフェロン誘導性二本鎖 RNA 活性化プロテインキナーゼ、 P K R のインヒビター ( I n h i b i t o r o f t h e i n t e r f e r o n - i n d u c e d d o u b l e - s t r a n d e d R N A - a c t i v a t e d P r o t e i n K i n a s e , P K R ) )  
 p 6 2 d o k G A P 結合タンパク質  
 p 6 2 l c k リガンド / Z I P  
 p 6 8 キナーゼ 30  
 p 9 6  
 P A K 1 ( p 2 1 活性化プロテインキナーゼ 1 )  
 P A K 2 ( p 2 1 活性化プロテインキナーゼ 2 )  
 P A K 3 ( p 2 1 活性化プロテインキナーゼ 3 )  
 P A R P ( ポリ ( A D P リボース ) ポリメラーゼ )  
 パキシリン  
 P C N A ( 増殖細胞核抗原 )  
 P D G F レセプター ( 血小板由来増殖因子レセプター )  
 P D K 1 ( ホスホイノシチド依存性キナーゼ 1 )  
 P D K - 2 ( ホスホイノシチド依存性キナーゼ 2 / インテグリン結合キナーゼ ) P E C A 40  
 M - 1 ( 血小板内皮細胞接着分子 1 )  
 P 1 3 K ( ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ )  
 P I A S ( 活性化 S T A T のタンパク質インヒビター )  
 P I T P ( ホスファチジルイノシトール転移 ( t r a n s f e r ) タンパク質 )  
 P K A / c A M P 依存性プロテインキナーゼ  
 P K B ( プロテインキナーゼ B )  
 P K C ( プロテインキナーゼ C )  
 P K C ( プロテインキナーゼ C )  
 P K C ( プロテインキナーゼ C )  
 P K C ( プロテインキナーゼ C ) 50

P K D ( プロテインキナーゼ D )	
P K R ( プロテインキナーゼ R または二本鎖 A R N A 活性化プロテインキナーゼ )	
P L C 1 ( ホスホリパーゼ C - 1 )	
P R K ( 増殖関連キナーゼ )	
P T E N ( M M A C 1 癌抑制遺伝子 / タンパク質ホスファターゼ )	
P y k 2 ( C A K / F A K 2 / R A F T K ) タンパク質チロシンキナーゼ	
R	
R a c / c d c 4 2 G T P a s e	
R a f 1 ( C - r a f ) セリン / スレオニンプロテインキナーゼ	10
A - R a f セリン / スレオニンプロテインキナーゼ	
B - r a f セリン / スレオニンキナーゼ	
V - R a f ウイルス性セリン / スレオニンプロテインキナーゼ	
R A F T K ( 関連性接着フォーカルチロシンキナーゼ ( R e l a t e d A d h e s i o n F o c a l T y r o s i n e K i n a s e ) )	
R A I D D ( R I P 結合 I C H - 1 / 細胞死誘導領域との C E D - 3 相同タンパク質 ( R I P - A s s o c i a t e d I C H - 1 / C E D - 3 h o m o l o g o u s p r o t e i n w i t h a D e a t h D o m a i n ) )	
R a p 2 G T P a s e	
R a p - 1 の R a p 1 - G A P ( C 3 G ) インアクチベーター ( R a p 1 - G A P ( C 3 G ) i n a c t i v a t o r o f R a p - 1 )	20
ラプシン ( R a p s y n )	
R a s G T P a s e	
R b ( 網膜芽細胞腫癌抑制タンパク質 )	
R h o 低分子量 G T P a s e	
R I P ( レセプター相互作用タンパク質 )	
R O C K ( R h o 活性化キナーゼ )	
S	
S 6 k ( S 6 キナーゼ )	30
S h c S H I P ( S H 2 ドメイン含有イノシトールホスファターゼ )	
S H - P T P 1 タンパク質チロシンホスファターゼ	
S H - P T P 2 タンパク質チロシンホスファターゼ	
S I R P 1 ( シグナル関連タンパク質 )	
S I P 1 ( S m a d 相互作用タンパク質 1 )	
S m a d 2 ( S m a および M a d 関連 2 ( S m a a n d M a d - r e l a t e d 2 ) )	
S m a d 3 ( S m a および M a d 関連 3 )	
S m a d 5 ( S m a および M a d 関連 5 )	
S m a d 7 ( S m a および M a d 関連 7 )	
S O C S - 1 ( サイトカインシグナリング 1 のサブレッサー ( S u p p r e s s o r o f C y t o k i n e S i g n a l i n g - 1 ) )	40
S O C S - 2 ( サイトカインシグナリング 2 のサブレッサー )	
S O C S - 3 ( サイトカインシグナリング 3 のサブレッサー )	
S O S ( セブンレスの息子 ( S o n o f S e v e n l e s s ) )	
S r c 非レセプターチロシンキナーゼ	
S R F ( 血清応答因子 )	
S R P K 1 ( S R タンパク質特異的キナーゼ 1 )	
S R P K 2 ( S R タンパク質特異的キナーゼ 2 )	
S T A T 1 ( 転写 1 のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター ( S i g n a l T r a n s d u c e r a n d A c t i v a t o r o f T r a n s c r i p t	50

i o n 1 ) )

S T A T 2 ( 転写 2 のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター )

S T A T 3 ( 転写 3 のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター )

S T A T 4 ( 転写 4 のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター )

S T A T 5 ( 転写 5 のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター )

S T A T 5 ( 転写 5 のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター )

S T A T 6 ( 転写 6 のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター )

S y k ( 脾臓チロシンキナーゼ )

シンデカン膜貫通プロテオグリカン

T

T a k 1 ( T G F - b 1 活性化キナーゼ )

テーリン

T A N K / I - T R A F ( T N F レセプター活性化因子 )

タウ微小管結合タンパク質

T B K - 1 / T 2 K ( T A N K 結合キナーゼ 1 )

テンシン ( T e n s i n )

T N F - R I ( 腫瘍壊死因子レセプター I )

T R A D D ( T N F レセプター結合細胞死誘導領域タンパク質 )

T R A F 1 ( T N F レセプター結合因子 1 )

T R A F 2 ( T N F レセプター結合因子 2 )

T R A F 3 ( T N F レセプター結合因子 3 )

T R A F 4 ( T N F レセプター結合因子 4 )

T R A F 5 ( T N F レセプター結合因子 5 )

T R A F 6 ( T N F レセプター結合因子 6 )

T r k A タンパク質チロシンレセプターキナーゼ A

T r k B タンパク質チロシンレセプターキナーゼ B

T r k C タンパク質チロシンレセプターキナーゼ C

V

V E G F レセプター ( 血管内皮増殖因子レセプター 1 型、2 型、3 型 )

ビンキュリン

W

W A S P ( ウィスコット・アルドリッチ症候群タンパク質 )

Z

Z I P ( 相互作用タンパク質 )

Z I P キナーゼ ( ジッパーセリン / スレオニンキナーゼ )

Z R P - 1 ( ジキシン関連タンパク質 )

ジキシン

【 0 0 6 2 】

本発明の抗体はまた、治療目的についてのリン酸化ポリペプチドの不活化に有用である。本実施例は、本発明を例示し、そして趣旨または範囲において、本発明を限定するように意図されない。同様に、これらの試薬および方法の説明は、逆の機能において使用されて、タンパク質特異的ホスファターゼ ( 特定のアミノ酸残基からリン酸基を除去する酵素 ) の活性を分析し得る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 3 】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、抗ホスホタウ [ p S <sup>1 9 9</sup> ] リン酸化部位特異的抗体 ( P S S A ) の特異性を例示する。

【図2】図2は、抗ホスホタウ [ p S <sup>2 1 4</sup> ] P S S A 特異性を例示する。

【図3】図3 a および 3 b は、E L I S A による全体的タウ対 P K A / セリン 2 1 4 部位でリン酸化されるタウの検出を例示する。

【図4】図4 a および 4 b は、E L I S A による G S K - 3 / セリン 1 9 9 / 2 0 2 でリン酸化されるタウ ( 4 a ) 対全体的タウ ( 4 b ) 部位の検出を例示する。

【図5】図5は、タウセリン 2 1 4 P S S A を用いた E L I S A において作製される用量反応曲線を例示する。

【図6】図6は、E L I S A におけるタウ P S S A の特異性を例示して、P K A 対 G S K - 3 酵素によって触媒されるタウリン酸化を検出する。 10

【図7】図7は、タウ上の複数の G S K - 3 リン酸化部位が、タウ P S S A を用いた E L I S A によって検出され得ることを例示する。

【図8】図8は、P K A 活性の特異的インヒビターが、タウのセリン 2 1 4 に対するリン酸化を選択的に阻害するが、E L I S A によって検出されるように、タウ [ p S <sup>2 1 4</sup> ] P S S A およびタウ [ p S <sup>1 9 9</sup> ] P S S A を用いて実証されるように、G S K 酵素活性を妨害しないことを例示する。

【図9】図9は、抗 R b [ p T <sup>8 2 1</sup> ] の特異性を規定する。

【図10】図10は R b [ p T <sup>8 2 1</sup> ] E L I S A の特異性を決定するための研究を示す。 20

【図11】図11は、ペプチド競合によって決定されるように、スレオニン 8 2 1 についての R b [ p T <sup>8 2 1</sup> ] E L I S A の特異性を示す。

【図12】図12は、ジャーカット細胞におけるキナーゼ活性の評価における R b [ p T <sup>8 2 1</sup> ] E L I S A の適用が、キナーゼインヒビターであるスタウロスポリンの存在下で増加したことを示す。

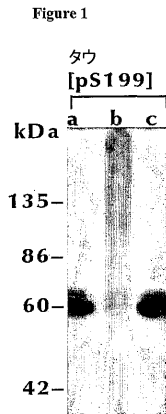
【図13】図13は、E G F R P S S A [ p Y <sup>1 1 7 3</sup> ] の特異性を例示する。

【図14】図14は、ペプチド競合によって決定されるように、チロシン残基 1 1 7 3 についての E G F R [ p Y <sup>1 1 7 3</sup> ] E L I S A の特異性を示す。

【図15】図15は、E G F R [ p Y <sup>1 1 7 3</sup> ] E L I S A を使用した E G F での処理後の、A 4 3 1 細胞における E G F R のリン酸化の応答曲線を実証する。 30

【図16】図16は、A 4 3 1 細胞におけるキナーゼ活性の評価における E G F R [ p Y <sup>8 4 5</sup> ] E L I S A の適用が、チロシンキナーゼインヒビターである P D 1 5 8 7 8 0 の存在下で増加したことを示す。

【 図 1 】



【 図 3 】

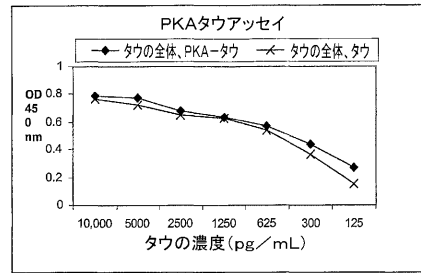


FIGURE 3a

【 図 2 】



FIGURE 2

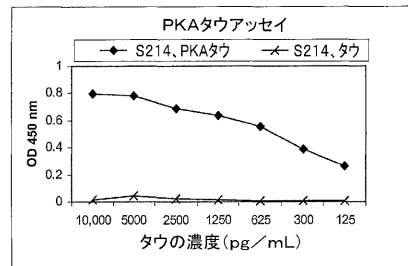


FIGURE 3b

【 図 4 】

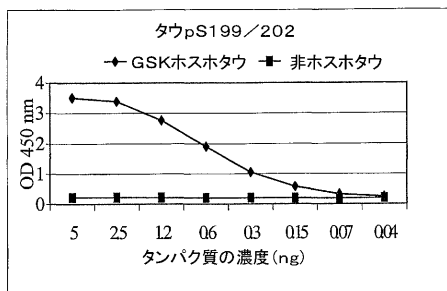


Figure 4a

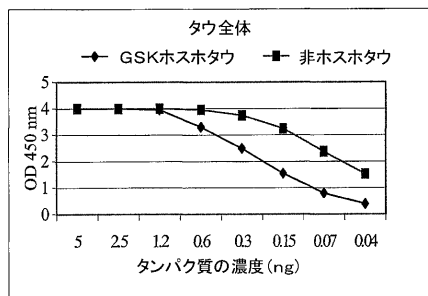


Figure 4b

【 図 5 】

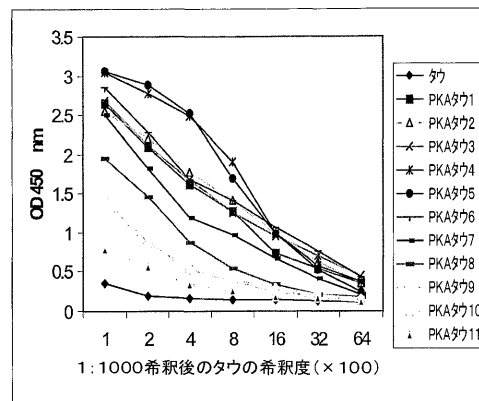


Figure 5

【 図 6 】

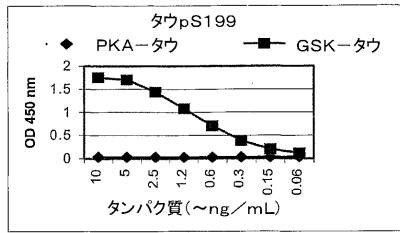


Figure 6a

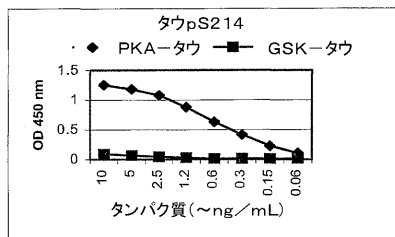
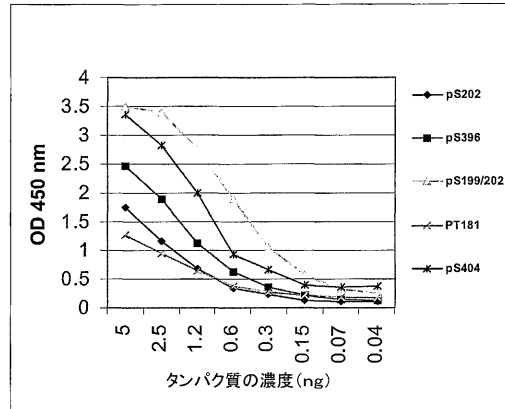


Figure 6b

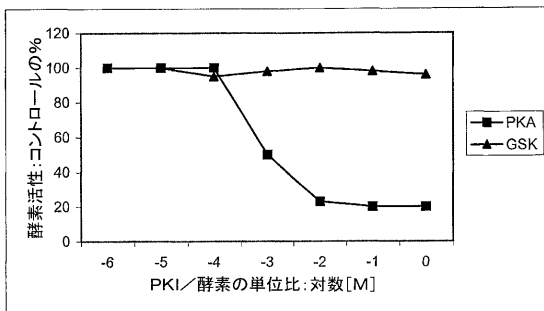
【 図 7 】

Figure 7



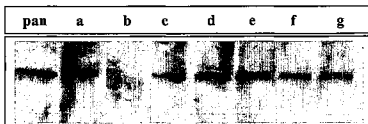
【 図 8 】

Figure 8



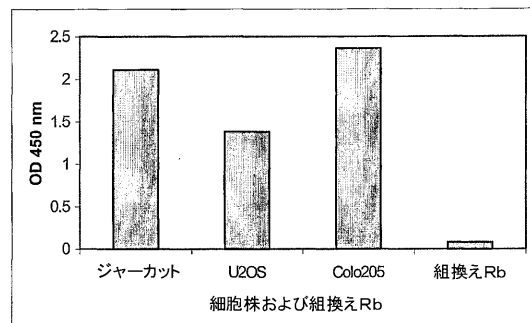
【 図 9 】

Figure 9



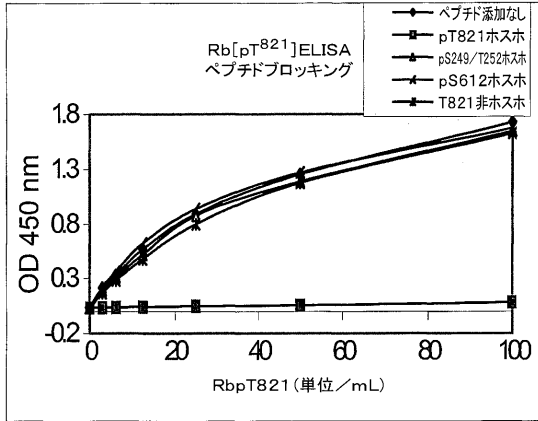
【 図 10 】

Figure 10



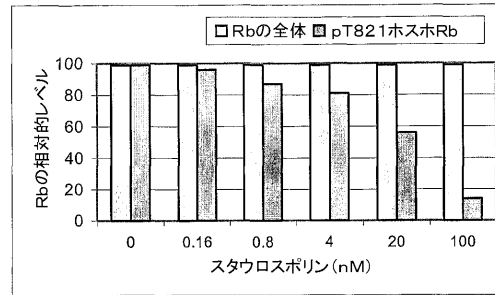
【 図 1 1 】

Figure 11



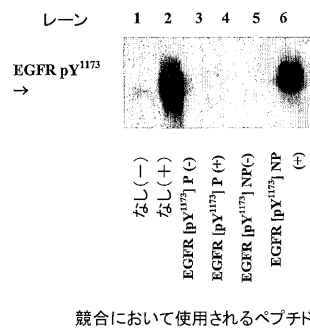
【 図 1 2 】

Figure 12



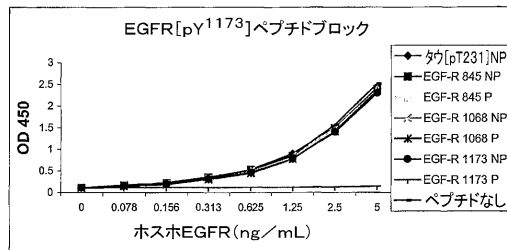
【 図 1 3 】

Figure 13



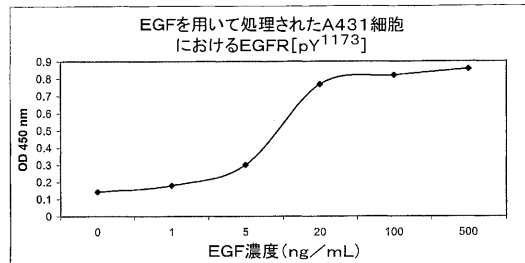
【 図 1 4 】

Figure 14



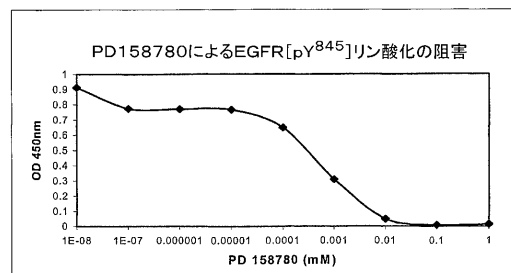
【 図 1 5 】

Figure 15



【 図 1 6 】

Figure 16



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08		

(72)発明者 ワン、 ジミン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 3 2 0 サウザンド オークス カミーノ デル マー  
 ル 6 5 7

F ターム(参考) 4B063 QA01 QQ27 QQ79 QR07 QR42 QR48 QR50 QR57 QR66 QR82  
 QS12 QS16 QS28 QS36 QX02 QX07  
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA13  
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74 GA26

【外国語明細書】

TITLE OF THE INVENTION  
METHOD FOR QUANTIFYING PHOSPHOKINASE ACTIVITY ON PROTEINS

BACKGROUND OF THE INVENTION

This application claims the priority of provisional application No. 60/235,620 filed on September 27, 2000.

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to assays and reagents for measuring protein kinase activity *in vitro*.

BACKGROUND OF THE ART

Drug development efforts involve a continuum of activities initiated by target selection of a molecule. Since all drugs work at the level of the cell, those targets are usually proteins that somehow are involved in cellular communication pathways. Signal transduction pathways are key to normal cell function. Aberrations in the expression of intracellular molecules and coordinated interactions of signal transduction pathways are associated with a variety of diseases and, thus, are the focus of drug discovery efforts. Phosphorylation of proteins in signal transduction pathways is one of the key covalent modifications that occur in multicellular organisms. The enzymes that carry out this modification are the protein kinases, which catalyze the transfer of the phosphate from ATP to tyrosine, serine or threonine residues on protein substrates. Phosphorylation of these amino acid residues modulates enzymatic activity and creates binding sites for the recruitment of downstream signaling proteins. Because protein kinases are critical components of cellular signaling pathways, their catalytic activity is strictly regulated. Abnormalities in protein kinase activity alter patterns of phosphorylation with subsequent effects on the cell function. Many drug discovery efforts involve the identification of chemicals that selectively suppress protein kinase activity. This invention is designed to provide assays and reagents to monitor protein kinase activity.

The targeted residues for phosphorylation can be contained in a full-length, biologically active molecule of recombinant or natural origin. Most methods currently employed for measuring protein kinase activity use peptide substrates, which include the targeted phosphorylation residue. This art is taught in US 6,066,462 (Quantitation of individual protein kinase activity) incorporated herein by reference. This method differs from the present invention in that the peptide substrate does not contain all possible phosphorylation sites that can be acted on by kinases and thus may not truly reflect activity on a natural protein. The invention described herein can be used with whole molecule or fragments, of natural or recombinant origin. Also, the delineation of activity at different residue sites requires in the invention, a different PSSA for detection as opposed to a different peptide in US 6,066,462.

Another method for detection of kinase activity involves use of a generic antibody that binds to all phospho-tyrosine residues. This method is described in US 5,766,863 (Kinase receptor activation assay) incorporated herein by reference. This method suffers from an inability to discriminate among phosphorylated tyrosine residues on a molecule. This method is also incapable of detecting phospho-serine or phospho-threonine molecules since the antibody does not detect such phosphorylated residues. In contrast, the method described herein uses antibodies, which bind to the sequence specific residues surrounding the phosphorylated amino acid plus the phospho-residue itself. The reagents used in this invention are capable of detecting phosphorylated threonine, serine or tyrosine molecules.

Three examples are employed; all of which involve important molecular targets of current interest in disease-oriented pharmaceutical study.

Currently, neurobiologists are focusing efforts on the proteins in the brain that can be associated with disease. One such protein is called Tau, a neuronal microtubule-associated protein found predominantly in axons. The function of Tau is to promote tubulin polymerization and stabilize microtubules, but it also serves to link certain signaling pathways to the cytoskeleton. Tau phosphorylation regulates both normal and pathological functions of this protein. Tau, in its hyper-phosphorylated form, is the

major component of paired helical filaments (PHF), the building block of neurofibrillary lesions in Alzheimer's disease (AD) brain. Hyperphosphorylation impairs the microtubule binding function of Tau, resulting in the destabilization of microtubules in AD brains, ultimately leading to neuronal degeneration. Hyperphosphorylated Tau is also found in a range of other central nervous system disorders. Numerous serine/threonine kinases, including GSK-3 $\beta$ , PKA, PKC, CDK5, MARK, JNK, p38MAPK and casein kinase II, can phosphorylate Tau.

Detection of *in vitro* kinase activity is critical for screening compounds that may be able to inhibit this activity and therefore could be useful in ameliorating various neurodegenerative diseases where Tau phosphorylation is abnormally high. Current efforts exist to identify drugs that might suppress kinase activity towards the Tau protein; however, these methods suffer from poor sensitivity and low specificity. Phosphorylation at individual Serine or Threonine residues within the Tau protein has been shown to correlate with disease. This invention overcomes both of these deficiencies in the described 'art'.

US Patent 5,601,985 relates to methods of detecting abnormally phosphorylated Tau Protein; US Patent 5,843,779 relates to monoclonal antibodies directed against the microtubule-associated protein, Tau, and hybridomas secreting these antibodies; US Patent 5,733,734 relates to methods of screening for Alzheimer's disease or disease associated with the accumulation of paired helical filaments and US Patent 6,066,462 relates to quantitation of individual protein kinase activity. These patents are incorporated herein by reference.

Other models exist to show the general applicability of this format for monitoring kinase activity. For the purposes of illustration, we have designed assays around an intranuclear molecule Retinoblastoma protein (Rb protein) important in cell cycle regulation and a cell surface receptor molecule (EGFR).

Retinoblastoma protein (Rb), the tumor suppressor product of the retinoblastoma susceptibility gene, is a 110 kDa protein which plays an important role in regulating cell

growth and differentiation. Loss of its function leads to uncontrolled cell growth and tumor development. Mutational inactivation of the Rb gene is found in all retinoblastomas and in a variety of other human malignancies including cancers of breast, lung, colon, prostate, osteosarcomas, soft tissue sarcomas, and leukemia. Central to the role of the Rb protein as a tumor suppressor is the ability of Rb to suppress inappropriate proliferation by arresting cells in the G1 phase of the cell cycle. Rb protein exerts its growth suppressive function by binding to transcription factors including E2F-1, PU.1, ATF-2, UBF, Elf-1, and c-Abl. The binding of Rb protein is governed by its phosphorylation state. Hypo- or under-phosphorylated Rb binds and sequesters transcription factors, most notably those of the E2F/DP family, inhibiting the transcription of genes required to traverse the G1 to S phase boundary. The cell cycle inhibitory function is abrogated when Rb undergoes phosphorylation catalyzed by the complex of cyclins/cyclin-dependent protein kinases (cdks).

Rb contains at least 16 consensus serine/threonine sequences for cdk phosphorylation, although the significance of all these sites is unclear. It has been demonstrated that phosphorylation of threonine 821 on Rb is catalyzed by cdk2/complex such as Cyclin E/cdk2 and Cyclin A/cdk2. The phosphorylation of threonine 821 disrupts the interaction of Rb with the proteins containing the sequence LXCXE. The dephosphorylation of Rb protein returns Rb to its active, growth suppressive state. Removal of phosphates on Rb appears to be carried out by a multimeric complex of protein phosphatase type 1 (PP1) and noncatalytic regulatory subunits at the completion of mitosis. The quantitation of Rb phosphorylated at specific amino acid residues gives important information regarding the activity of kinases as well as the functional state of activation of the Rb protein itself. For the purposes of illustration, we designed an assay to quantitate the amount of Rb protein that is specifically phosphorylated at threonine 821. This ELISA does not recognize Rb phosphorylated at sites other than [pT<sup>821</sup>] or non-phosphorylated Rb. Samples can be controlled for Rb content by parallel measurement of total Rb.

WO 01/11367 (Assay of the phosphorylation activity of cyclin/CDK complex on retinoblastoma (RB) protein for identifying compounds which modify this activity) describes a method for detecting kinase activity by ELISA using a synthetic peptide and

a monoclonal antibody that recognizes the phosphorylated form of the peptide. The basis of this method is the coating of a solid phase with a synthetic peptide containing the consensus sequence of a region upon which a kinase acts. The peptide is allowed to come in contact with a kinase that allows a specific residue on that peptide to become phosphorylated. The activity of the kinase is reflected in the by the binding of the monoclonal antibody. Our invention differs from WO 01/11367 by the ability to use natural protein as the substrate for kinase activity. This feature is superior to the use of peptides since all naturally occurring phosphorylation sites would be present. The use of a single monoclonal antibody recognizing phosphoserine (clone 2B9) does not allow any discrimination of specific phosphorylation sites among those on the naturally occurring protein. Our use of specific PSSAs allows that distinction as well as the detection of phosphothreonine and phosphotyrosine residues.

In another example, a cell surface receptor was studied and a kinase-dependent assay designed. Epidermal growth factor receptor (EGFR) belongs to the family of receptor tyrosine kinases (RTKs), which regulate cell growth, survival, proliferation and differentiation. EGFR is expressed at full length as a 170 kDa type I transmembrane glycoprotein which consists of an extracellular ligand-binding domain, a single hydrophobic transmembrane region, and an intracellular, highly conserved region involved with signal transduction. Several deletions in the extra- and intracellular domain of the EGFR have been found in number of tumors. For example, EGFRvIII is a 145 kDa protein with a deletion of exons 2-7 in EGFR mRNA. A 100 kDa truncated EGFR without the cytoplasmic domain is observed in the culture supernatant from A431 cells, a human epidermal carcinoma cell line.

EGFR is activated by binding of a number of ligands such as EGF, transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), amphiregulin, betacellulin, heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and epiregulin. The binding causes EGFR homo- and heterodimerization and rapid activation of its intrinsic tyrosine kinase followed by autophosphorylation of multiple tyrosine residues in the cytoplasmic domain. The phosphorylation of tyrosine residues in the COOH-terminal tail of the molecule serve as binding sites for cytosolic signaling proteins containing Src homology 2 (SH2) domains.

Several sites of *in vivo* phosphorylation have been identified in the EGFR including Tyr<sup>845</sup>, Tyr<sup>992</sup>, Tyr<sup>1068</sup>, Tyr<sup>1086</sup>, and Tyr<sup>1173</sup>. These sites bind and activate a variety of downstream signaling protein which contain SH2 domains, including growth factor receptor-binding protein 2 (Grb2), Src homology and collagen domain protein (Shc) and phospholipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). The binding of these or other signaling proteins to the receptor and/or their phosphorylation results in transmission of subsequent signaling events that culminate in DNA synthesis and cell division.

Elevated expression and/or amplification of the EGFR have been found in breast, bladder, glioma, colon, lung, squamous cell, head and neck, ovarian, and pancreatic cancers. Selective compounds have been developed that target either the extracellular ligand-binding domain of EGFR or the intracellular tyrosine kinase region, resulting in interference with the signaling pathways that modulate mitogenic and other cancer-promoting responses. These potential anticancer agents include a number of small molecule, tyrosine kinase inhibitors.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The invention describes assays and reagents for quantitating phosphorylation of proteins. The method involves subjecting a protein to a phosphokinase that will phosphorylate the protein and contacting the phosphorylated protein with an antibody specific for the phosphorylated site and detecting the antibody bound to the phosphorylated site. The invention includes antibodies useful in practicing the methods of the invention. The invention particularly relates to phosphorylation of Tau, Rb, and EGFR proteins and antibodies specific for the site of phosphorylation of the Tau, Rb, and EGFR proteins.

In each example system, the targeted protein (Tau, Rb or EGFR) is phosphorylated *in vitro* or *in vivo* and the specific phosphorylation event is detected using a highly selective phosphorylation site-specific antibody (PSSA). The appearance or disappearance of the targeted phosphorylation event can be quantified as a percentage of total protein that may be phosphorylated at each site.

The highly specific nature of the PSSAs allows parallel independent measurement of multiple phosphorylation sites on one protein. Moreover, different kinases can be measured simultaneously by using different PSSAs that selectively target different sites in the protein, thereby providing an avenue for generating phosphorylation site profiles. In contrast to existing methods that quantitate phosphorylated proteins as a diagnostic or prognostic indication of disease, this invention measures protein kinase enzymatic activity that results in the phosphorylation of proteins at a specific site(s). This method is also amenable to large-scale 'High Throughput Screening' formats currently being used by pharmaceutical and biotech companies to discover new drugs.

The term antibody used herein refers to monoclonal, polyclonal, Fab and F(ab)<sub>2</sub> fragments, genetically engineered antibodies or fragments thereof. Antibodies may be modified, for example, humanized to minimize cross species reaction. Pan antibodies as the term is used herein refers to antibodies that bind to phosphorylated and non-phosphorylated forms of the protein.

### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 illustrates specificity of the Anti-phospho Tau [pS<sup>199</sup>] phosphorylation site-specific antibody (PSSA).

Figure 2 illustrates Anti-phospho Tau [pS<sup>214</sup>] PSSA specificity.

Figure 3a and 3b illustrate detection of total Tau vs. Tau phosphorylated at the PKA/serine 214 site by ELISA.

Figure 4a-b illustrate detection of Tau phosphorylated at GSK-3 $\beta$ /serine 199/202 (4a) vs. total Tau (4b) sites by ELISA.

Figure 5 illustrates a dose-response curve generated in an ELISA using the Tau serine 214 PSSA.

Figure 6 illustrates the specificity of the Tau PSSAs in an ELISA to detect Tau phosphorylation catalyzed by PKA vs. GSK-3 $\beta$  enzymes.

Figure 7 illustrates that multiple GSK-3 $\beta$  phosphorylation sites on Tau can be detected by ELISA using Tau PSSAs.

Figure 8 illustrates that a specific inhibitor of PKA activity selectively inhibits the phosphorylation on serine 214 of Tau but does not interfere with GSK enzyme activity as demonstrated using Tau [pS<sup>214</sup>] and Tau [pS<sup>199</sup>] PSSAs as detected by ELISA.

Figure 9 defines the specificity of the anti-Rb [pT<sup>821</sup>].

Figure 10 shows studies to determine the specificity of the Rb [pT<sup>821</sup>] ELISA.

Figure 11 shows the specificity of the Rb [pT<sup>821</sup>] ELISA for threonine 821 as determined by peptide competition.

Figure 12 shows the application of the Rb [pT<sup>821</sup>] ELISA in evaluating kinase activity in Jurkat cells were grown in the presence of the kinase inhibitor, staurosporine.

Figure 13 illustrates the specificity of the EGFR PSSA [pY<sup>1173</sup>].

Figure 14 shows the specificity of the EGFR [pY<sup>1173</sup>] ELISA for tyrosine residue 1173 as determined by peptide competition.

Figure 15 demonstrates the response curve of phosphorylation of EGFR in A431 cells after treatment with EGF using the EGFR [pY<sup>1173</sup>] ELISA.

Figure 16 shows the application of the EGFR [pY<sup>845</sup>] ELISA in evaluating kinase activity in A431 cells were grown in the presence of the tyrosine kinase inhibitor, PD158780.

### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

**Tau System:** The Tau protein system demonstrates the utility of this invention on a protein that is found both intracellularly and extracellularly in normal and pathological conditions. The Tau protein has multiple phosphorylation sites acted upon by multiple protein kinases. Phosphoserine and phosphotyrosine residues exist. Both mono-phospho and dual-phosphoresidues are distinguishable in this model system.

**Tau Recombinant Protein:** Full length Tau-441 protein is purified recombinant protein derived through cloning of human Tau cDNA and expressed in *E.coli*. The protein is purified via standard methods. This protein is commercially available from multiple vendors.

**Tau pS<sup>199</sup> PSSA:** Rabbits were immunized with a chemically synthesized and KLH conjugated phosphopeptide corresponding to the region of the longest isoform of the Tau protein that includes serine 199. The chemically synthesized phosphopeptides (RSGYS(pS)PGSPG) is sequence ID #1. The Tau pS<sup>199</sup> PSSA was purified from rabbit serum by sequential epitope-specific chromatography. The antibody was negatively preadsorbed using a non-phosphopeptide corresponding to the site of phosphorylation to remove antibody that is reactive with non-phosphorylated Tau. The final product was generated by affinity chromatography using the peptide that is phosphorylated at serine 199. This antibody recognizes specifically the Tau protein when phosphorylated on serine 199, as demonstrated by peptide competition analysis in a western blotting assay. Serine 199 is phosphorylated *in vitro* and *in vivo* by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). This reagent is commercially available.

PSSA Tau specificity is shown in figure 1. Cell extracts from African green monkey kidney (CV-1) cells, stably expressing human four repeat tau and a protein phosphatase inhibitor, were resolved by SDS-PAGE on a 10% Tris-glycine gel. The proteins were transferred to nitrocellulose. Membranes were incubated with 0.50  $\mu\text{g/mL}$  anti-phosphoTau [pS<sup>199</sup>], following prior incubation in the absence (a) or presence of the peptide immunogen (b), or the non-phosphopeptide corresponding to the tau phosphopeptide (c). After washing, membranes were incubated with goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG alkaline phosphatase and

bands were detected using the Tropix WesternStar™ detection method. The data in Figure 1 show that only the phosphopeptide corresponding to this site blocks the antibody signal, illustrating the specificity of the anti-tau [pS<sup>199</sup>] antibody for this phosphorylation site.

Tau [pS<sup>214</sup>] PSSA. The procedures for generating this antibody were similar to those described above for the Tau pS<sup>199</sup> PSSA. The chemically synthesized phosphopeptide was derived from the region of the longest isoform of Tau protein that includes serine 214 (GSRSRTP(**pS**)LPTPP) sequence ID#2. This antibody recognizes specifically the Tau protein when phosphorylated on serine 214, as demonstrated by peptide competition analysis in a western blotting assay. Serine 214 is phosphorylated *in vitro* and *in vivo* by cAMP-dependent protein kinase (PKA). This reagent is commercially available Biosource International.

Tau pS<sup>214</sup> PSSA specificity is shown in Figure 2. SF-9 cell extracts, expressing human four repeat tau, were resolved by SDS PAGE on a 10% Tris-glycine gel. The proteins were transferred to nitrocellulose. Membranes were incubated with 0.50 µg/mL anti-phospho tau [pS<sup>214</sup>], following prior incubation in the absence (a) or presence of the peptide immunogen (b), or the non-phosphopeptide corresponding to the tau phosphopeptide (c). After washing, membranes were incubated with goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG alkaline phosphatase and bands were detected using the Tropix WesternStar™ detection method. The data in Figure 2 show that only the phosphopeptide corresponding to this site blocks the antibody signal, illustrating the specificity of the anti-Tau [pS<sup>214</sup>] antibody for this phosphorylation site. PSSAs to other Tau sites [pS<sup>202</sup>, pS<sup>396</sup>, pT<sup>181</sup>, pS<sup>199</sup>/pS<sup>202</sup>, pS<sup>404</sup>] are characterized using similar methods.

#### Pan-Tau polyclonal Antibody

Rabbits were immunized with the recombinant Tau protein. The antibody was purified from the rabbit serum using a protein-A affinity column. This antibody recognizes multiple antigenic sites on Tau protein. This antibody will bind to both non-phosphorylated and phosphorylated forms of Tau protein.

#### Tau-5 monoclonal Antibody (mAb)

The mouse mAb to Tau was raised using purified bovine microtubule-associated proteins (MAPs) as the immunogen. The resulting hybridoma was produced by fusing immunized BALB/c mouse splenocytes and mouse myeloma Sp2/0-Ag14 cells. It shows no cross-reaction with other MAPs or tubulin. It reacts with the non-phosphorylated as well as the phosphorylated forms of Tau and the reactive epitope maps to residues 210-230. This reagent is commercially available from Biosource International.

#### Total Tau ELISA and Phospho-Tau ELISA

A concentration of 2.5  $\mu\text{g/mL}$  of Tau-5 monoclonal antibody in carbonate buffer, pH 9.4, was incubated at 100  $\mu\text{L/well}$  in microtiter plates at 4°C overnight. The wells were washed with a PBS/Tween-20 solution three times followed by blocking on other sites on the plastic surface with a buffered solution containing unrelated proteins such as BSA for 2 hours at room temperature. GSK-3 $\beta$  phosphorylated Tau, PKA phosphorylated Tau, and non-phosphorylated Tau were added to the wells at various concentrations and incubated for 1 hour at room temperature. After three washings with Washing Buffer, the wells were incubated respectively with Tau pS<sup>214</sup> PSSA, Tau pS<sup>199</sup> PSSA and Pan-Tau antibodies at the optimized concentrations (ranging from 0.1 to 1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 1 hour at room temperature. The plates then were washed three times with Washing Buffer, followed by the addition of an HRP conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody at 1:5000 dilution for 1 hour at room temperature. After washing, 100  $\mu\text{L}$  of Stabilized Chromogen was added to each well and then incubated for 20 minutes at room temperature in the dark. The O.D. values at 450 nm were measured following the addition of stop solution to each well.

#### Kinase Reactions

Phosphorylation of Tau using PKA occurred as follows. PKA was purchased from New England Biolabs. Recombinant Tau protein (1  $\mu\text{g}$ ) was incubated with various concentrations of PKA enzyme in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 100  $\mu\text{M}$  ATP for 1 hour at 30°C.

#### Phosphorylation of Tau using GSK-3 $\beta$

GSK-3 $\beta$  was purchased from Upstate Biotechnology Inc. Recombinant Tau protein (1  $\mu\text{g}$ ) was incubated with various concentrations of the enzyme in buffer containing 40 mM

HEPES (pH 7.2), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 100 μM ATP, and 50 μg/mL heparin for 1 hour at 30°C.

Figures 3a and 3b show the assessment of total Tau and selective Tau phosphorylation at the PKA/ Ser<sup>214</sup> site by ELISA. In figure 3a, phosphorylated Tau was placed into an ELISA with detection either by PSSA specific for Tau pS<sup>214</sup> or by pan-Tau antibody. Both detection antibodies detected the phosphorylated Tau with equal signals. In figure 3b, non-phosphorylated Tau was placed into the same assay. As expected, the Tau pS<sup>214</sup> failed to detect the Tau protein without the phosphate group whereas the pan-Tau detector did quantitate the protein

Figures 4a and 4b show the assessment of total Tau and selective Tau phosphorylation at the GSK-3β/ Ser<sup>199/202</sup> sites by ELISA. Figure 4a uses either non-phosphorylated Tau or GSK-3β- phosphorylated Tau in the ELISA with a detector of Tau pS<sup>199/202</sup>. Non-phosphorylated Tau does not react positively in the ELISA whereas the phosphorylated Tau shows strong results. If pan-Tau is used as the detector, both proteins are readily detected (figure 4b).

Figure 5 shows the direct relationship between the amount of phosphoTau detected by ELISA as a relationship of the quantity of kinase activity added to the *in vitro* reaction. Various amounts of PKA enzyme were used to phosphorylate the Tau protein. Starting with the highest concentration of PKA, 5 units, (PKA tau 1), the PKA enzyme was then serially diluted 1:2 as shown, followed by a 1:1000 dilution and then applied to each well of the ELISA assay. Detection of phosphoTau was performed using a PSSA to Tau that is phosphorylated at Ser<sup>214</sup> (a PKA site). These data indicate that the lower the amount of kinase in the reaction, the lower the amount of phosphoprotein produced is detected in the ELISA. Thus, the ELISA is indirectly a measure of phosphokinase activity.

Figures 6a and 6b shows the specificity in detecting Tau protein phosphorylation catalyzed by PKA vs. GSK3β enzymes using the Tau PSSAs and ELISA. The results demonstrate that the Tau pS<sup>214</sup> PSSA ELISA only detects Tau when phosphorylated by PKA and the Tau pS<sup>199</sup> PSSA ELISA only detects Tau when phosphorylated by GSK3β.

Figure 7 shows that GSK3 $\beta$  enzyme can phosphorylate multiple sites on Tau protein and PSSAs can independently detect the phosphorylated sites at Tau pT<sup>181</sup>, Tau pS<sup>202</sup>, Tau pS<sup>199</sup>/pS<sup>202</sup>, Tau pS<sup>396</sup>, and Tau pS<sup>404</sup>. This provides evidence that the ELISA is useful in creating a profile of phosphorylation events on the protein subjected to kinase enzyme activity.

Figure 8 shows the specificity of kinase reaction when tested as a profile with two antibodies, one specific for a PKA phosphorylation site (pS<sup>214</sup>) and the other for a GSK site (pS<sup>199</sup>) on Tau protein. A PKA-specific inhibitor, PKI (heat-stable inhibitor of c-AMP-dependent protein kinase; New England Biolab), was mixed at various ratios of inhibitor to enzyme (either PKA or GSK) and the resultant mixture analyzed by ELISA using the Tau PSSAs. The PKA-specific inhibitor altered the kinase activity of the pS<sup>214</sup> site alone. These data again attest to the specificity of the ELISA and the ability to independently monitor kinase activities on the same protein at different sites. These data also show the capability of screening for drug interference of kinase activity.

Antibodies to other tau sites shown in Table II are also representative of the invention. Som of the phosphorylated sites are known to be associated with disease as further indicated in Table II.

TABLE II

Phospho Site	Disease Linked (Y/N/?)	Notes (NGD = Neurodegenerative disease; FTD = )
T39	?	Phosphorylated by Casein kinase II
T181, hu	?	Involved in pretangle process?
S184	Y	Phosphorylated by GSK-3b; disrupts microtubule network
S195	Y	Phosphorylated by GSK-3b; disrupts microtubule network
S198	Y	Phosphorylated by GSK-3b; disrupts microtubule network
S199	Y	Phosphorylated by GSK-3b; linked to hereditary FTD
S202	Y	Microtubule-dependent phosphorylation by CDK 5 and GSK-3b; linked to hereditary NGD
T205	?	Microtubule-dependent phosphorylation by CDK 5 and GSK-3b
T212	Y	Specific for NGD processes; phosphorylated by GSK-3b and PKA
S214	Y	Specific for NGD processes; may block aggregation; phos'd by PKA
2T17	?	
T231	Y	Involved in pretangle process?; phos'd by GSK-3b and cdc2/CDK1
S235	?	Microtubule-independent phosphorylation by GSK-3b
S262	Y	May block aggregation; phosphorylated by CAM K II and GSK-3b; major site in AD brain
S320	?	
S324	?	
S356	Y	Involved in pretangle process?; AD pathway; major site in AD brain; phosphorylated by GSK-3b
S361	?	
S396	N	Phos'd by GSK-3b
S400	?	Phos'd by GSK-3b
T403	?	
S404	?	Involved in pretangle process?; microtubule-independent phosphorylation; phosphorylated by GSK-3b
S409	Y	AD pathway; phosphorylated by PKA
S412	?	AD pathway
S413	Y	AD pathway; phosphorylated by GSK-3b
S416	?	Phosphorylated by CAM K II
S422	Y	Linked with several NGD's; phosphorylated by MAPK

**Rb System:** This model system presents an intra-nuclear protein that is large with multiple phosphorylation sites acted upon by multiple protein kinases. Phosphoserine and phosphotyrosine residues exist. Both mono-phospho and dual-phosphoresidues are distinguishable in this model system.

Rb protein: Full length Rb protein is purified recombinant protein derived through cloning of human Rb cDNA and expressed in *E. coli*. The protein is purified via standard methods. This protein is commercially available from multiple vendors.

Rb [pT<sup>821</sup>] PSSA: The rabbit antiserum was produced against a chemically synthesized phosphopeptide derived from a region of human Rb that contains threonine 821. Antibody was purified from rabbit serum by sequential epitope-specific chromatography. The antibody has been negatively preadsorbed using a non-phosphopeptide corresponding to the site of phosphorylation to remove antibody that is reactive with non-phosphorylated pRb. The final product is generated by affinity chromatography using a pRb-derived peptide that is phosphorylated at threonine 821. Figure 9 defines the specificity of the anti-Rb [pT<sup>821</sup>]. SDS-PAGE on a 7.5% Tris-glycine gel resolved cell extracts, prepared from MCF-7 cells. The proteins were then transferred to PVDF. Membranes were incubated with 0.5 µg/mL anti-RB [pT<sup>821</sup>], following prior incubation in the absence (a) or presence of the peptide immunogen (b), the non-phosphopeptide corresponding to the RB phosphopeptide (c), the phosphopeptides corresponding to threonine 356 (d), serine 807/811 (e), serine 249/threonine 252 (f), and serine 751 (g) on phospho-RB. After washing, membranes were incubated with goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG alkaline phosphatase and bands were detected using the Tropix WesternStar™ detection method. The data show that only the phosphopeptide corresponding to this site blocks the antibody signal, therefore demonstrating the specificity of the anti-Rb [pT<sup>821</sup>] antibody for this phosphorylated residue.

Total Rb [pan] Detection Antibody: the detection antibody is a monoclonal, clone G3-245, available commercially from BD/Pharmingen (San Diego, CA). It recognizes an epitope between amino acids 332-344 of Rb protein. This antibody will bind to both non-phosphorylated and phosphorylated forms of Rb protein.

Rb monoclonal antibody: the capture antibody [linked to the solid phase] is a monoclonal, clone 3C8, available commercially from QED Biosciences (San Diego, CA). It reacts with epitope on near the C-terminal end of the Rb protein (aa886-aa905). This antibody will bind to both non-phosphorylated and phosphorylated forms of Rb protein.

Total Rb and Rb [pT<sup>821</sup>] ELISA: A concentration of 1.25 µg/mL of Rb monoclonal antibody in carbonate buffer, pH 9.4, was incubated at 100 µL/well in microtiter plates at 4°C overnight. The wells were washed with a PBS/Tween-20 solution three times followed by blocking on other sites on the plastic surface with a buffered solution containing unrelated proteins such as BSA for 2 hours at room temperature. Jurkat cell lysate containing phosphorylated Rb or non-phosphorylated recombinant Rb were added to the wells at various concentrations and incubated for 2 hour at room temperature. After three washings with Washing Buffer, the wells were incubated, respectively, with Rb [pT<sup>821</sup>] PSSA and biotinylated Pan-Rb antibodies at the optimized concentrations (ranging from 0.1 to 1 µg/mL) for 1 hour at room temperature. The plates then were washed three times with Washing Buffer, followed by the addition of an HRP conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody at 1:5000 dilution or 0.25 µg/mL of streptavidin-HRP for 1 hour at room temperature. After washing, 100 µL of Stabilized Chromogen was added to each well and then incubated for 20 minutes at room temperature in the dark. The OD values at 450 nm were measured following the addition of stop solution to each well.

Figure 10 shows studies to determine the specificity of the Rb [pT<sup>821</sup>] ELISA. In the first study, solutions containing Rb protein at a concentration of 20 ng/mL from Jurkat, U2OS, and Colo205 were analyzed with the Rb [pT<sup>821</sup>] ELISA kit, along with a solution containing 20 ng/mL purified full length Rb protein expressed in *E. coli* (non-phosphorylated). Figure 11 shows that the Rb protein isolated from the cell lines was strongly recognized. These data provide evidence that appropriate phosphorylation of the Rb protein is requisite for reactivity in this assay.

In the second study, specificity for threonine 821 was determined by peptide competition. The data presented in Figure 11 show that only the peptide corresponding to the region surrounding threonine 821, containing the phospho-threonine, could block the ELISA signal.

Kinase reactions for Rb: Natural sources for Rb were obtained for these studies from exponentially growing cells. Endogenous cellular kinases provided the phosphorylation of the natural Rb protein. Figure 12 shows the application of this ELISA to study kinase

reactions. Jurkat cells were grown in the presence of the kinase inhibitor, staurosporine, at various concentrations for 36 hours prior to lysis. Lysates were normalized for total Rb content using the BioSource Total Rb ELISA (catalog #KHO0011). Levels of Rb phosphorylation at threonine 821 were determined. These data show that staurosporine inhibits the phosphorylation of Rb at threonine 821, possibly through the inhibition of cdk.

**EGFR System:** This model system presents a cell surface receptor protein. This protein is large with multiple phosphorylation sites consisting of phospho-threonine, phospho-serine and phospho-tyrosine residues.

**EGFR protein:** Human EGFR protein was purified from human carcinoma A431 cells by affinity purification. The product is purchased from Sigma (St. Louis, MO cat # E-2645).

**EGFR [pY<sup>1173</sup>] PSSA:** Rabbit antiserum was produced against a chemically synthesized phosphopeptide derived from the region of EGFR that contains tyrosine 1173. The sequence is conserved in human, mouse, and rat. Antibody was purified from serum by sequential epitope-specific chromatography. The antibody has been negatively preadsorbed using (i) a non-phosphopeptide corresponding to the site of phosphorylation to remove antibody that is reactive with non-phosphorylated EGFR enzyme, and (ii) a generic tyrosine phosphorylated peptide to remove antibody that is reactive with phospho-tyrosine (irrespective of the sequence). The final product is generated by affinity chromatography using an EGFR-derived peptide that is phosphorylated at tyrosine 1173. Figure 13 illustrates the specificity of the EGFR PSSA [pY<sup>1173</sup>]. Cell extracts prepared from NIH3T3 cells expressing EGFR were starved for 30 hours, then stimulated for 10 minutes with 30 ng/mL EGF (+), or left unstimulated (-), then resolved by SDS-PAGE on a 6% Tris-glycine gel, and transferred to nitrocellulose. Membranes were incubated with 0.50 µg/mL anti-EGFR [pY<sup>1173</sup>] antibody, following prior incubation in the absence (lanes 1 & 2), or presence of the peptide immunogen (lanes 3 & 4), or the non-phosphopeptide corresponding to the EGFR phosphopeptide (lanes 5 & 6). After washing, membranes were incubated with goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG alkaline phosphatase and bands were detected using the Tropix WesternStar™ detection method. The data show that only the phosphopeptide

corresponding to this site blocks the antibody signal, demonstrating the specificity of the anti-EGFR [pY<sup>1173</sup>] antibody for this phosphorylated residue.

EGFR [pY<sup>845</sup>] PSSA: Prepared essentially as EGFR [pY<sup>1173</sup>] PSSA but using chemically synthesized phosphopeptides from the region that contains tyrosine 845.

EGFR [Pan] monoclonal antibody: The capture antibody is a mouse monoclonal antibody, clone 199.12, available commercially from Neomarkers, Inc. (Union City, CA). It is specific for human EGFR and does not react with HER2/neu, HER3 and HER4. This antibody will bind to both non-phosphorylated and phosphorylated forms of EGFR protein.

EGFR [Pan] Detection Antibody: This rabbit antibody was prepared by immunization with a synthetic peptide corresponding to C-terminus of human EGFR. The antibody was purified using protein A affinity column. It shows no cross-reactivity with HER2/neu, HER3 and HER4.

EGFR PSSA and Full Length ELISA: A concentration of 2.5 µg/mL of pan-EGFR monoclonal antibody in carbonate buffer, pH 9.4, was incubated at 100 µL/well in microtiter plates at 4°C overnight. The wells were washed with a PBS/Tween-20 solution three times followed by blocking on other sites on the plastic surface with a buffered solution containing unrelated proteins such as BSA for 2 hours at room temperature. Autophosphorylated EGFR or non-phosphorylated EGFR were added to the wells at various concentrations and incubated for 1 hour at room temperature. After three washings with Washing Buffer, the wells were incubated, respectively, with EGFR [pY<sup>845</sup>] PSSA, EGFR [pY<sup>1173</sup>] PSSA, and Pan-EGFR antibodies at the optimized concentrations (ranging from 0.1 to 1 µg/mL) for 1 hour at room temperature. The plates then were washed three times with Washing Buffer, followed by the addition of an HRP conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody at 1:2000 dilution for 1 hour at room temperature. After washing, 100 µL of Stabilized Chromogen was added to each well and then incubated for 20 minutes at room temperature in the dark. The OD values at 450 nm were measured following the addition of stop solution to each well.

The specificity of the EGFR [pY<sup>1173</sup>] ELISA for tyrosine residue 1173 was determined by peptide competition. The data presented in Figure 14 show that only the peptide corresponding to the region surrounding tyrosine residue 1173, containing the phospho-threonine, could block the ELISA

Kinase Reactions: (autophosphorylation)

EGFR was incubated (auto-phosphorylated) in the buffer of 15 mM HEPES (pH7.4), 6 mM MnCl<sub>2</sub> and 15 mM MgCl<sub>2</sub> containing 1uM ATP for 30 minutes at 30oC.

Figure 15 demonstrates the response curve of phosphorylation of EGFR in A431 cells after treatment with EGF at 1-500 ng/mL for 10 minutes. The phosphorylation of EGFR tyrosine was detected with EGFR [pY<sup>1173</sup>] ELISA.

Figure 16 demonstrates use of the described invention to detect protein kinase activity associated with EGFR at residue pY845 and inhibition of that activity by a protein kinase inhibitor. 2 ng/ vial of purified human EGFR was incubated (auto-phosphorylated) in the buffer of 15 mM HEPES (pH7.4), 6 mM MnCl<sub>2</sub> and 15 mM MgCl<sub>2</sub> containing 1uM ATP for 30 minutes at 30oC. For phosphorylation inhibition of EGFR [pY<sup>845</sup>], tyrosine kinase inhibitor PD158780 (Calbiochem, cat #. 513035) was added to the vials at indicated concentration. EGFR [pY<sup>845</sup>] phosphorylation was measured at 4ng/mL using EGFR [pY<sup>845</sup>] phosphorylation site specific ELISA.

Table 1: List signal transduction proteins the phosphorylation of which can be determined by methods of the present invention.

**TABLE 1**

Examples of Signal Transduction Proteins

**Protein**

**A**

alpha-actinin  
 alpha-synuclein  
 ABL/c-Abl (Abelson nonreceptor protein tyrosine kinase)  
 Acetylcholine Receptor  
 Ack nonreceptor protein tyrosine kinase;  
 Akt/PKB serine/threonine protein kinase  
 AP-1 (Activator protein-1 jun/fos dimeric transcription factors  
 AP-2 (Activator protein-2 transcription factor  
 Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1)  
 Apaf-2 (Apoptosis protease-activating factor-2/cytochrome C)  
 Apaf-3 (Apoptosis protease-activating factor-3/caspase-9  
 Arp2/3 (Actin related protein)  
 Atf-1 (Activating transcription factor-1)  
 Atf-2 (Activating transcription factor-2)  
 Atf-3 (Activating transcription factor-3)  
 Atf-4 (Activating transcription factor-4)  
 ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated. Protein)

**B**

B-ATF nuclear basic leucine zipper protein/transcription factors  
 Bad  
 Bak  
 Bax  
 Bcl-2 (B-cell chronic lymphocytic leukemia 2)  
 Bcl-xL  
 Bcl-xS  
 BCR/ABL protein tyrosine kinase  
 beta-Catenin  
 BID (BH-3 Interacting Death Domain)  
 Blk (B Lymphocyte Src non-receptor protein tyrosine kinase family member)  
 BMK-1 (Big Map Kinase/ERK5)  
 Btk (Bruton's Tyrosine Kinase)

**C**

Cadherin  
 CADTK (calcium activated protein tyrosine kinase/Cakbeta/Pyk2/FAK2/RAFTK)  
 CAK (Cdk-Activating Kinase)  
 Cak-beta (Cell adhesion kinase beta/ CADTK/Pyk2/FAK2/RAFTK)  
 caldesmon  
 calmodulin  
 calpain cysteine proteases  
 CaM kinase II (Calmodulin-dependent protein kinase II)  
 CB1 (Cannabinoid Receptor 1)

CB2 (Cannabinoid Receptor 2)  
caspase-2 (Cysteine Aspartyl Protease-2/ ICH-1/NEDD-2)  
caspase-3 (Cysteine Aspartyl Protease-3/LICE/ CPP32/YAMA/apopain/SCA-1)  
caspase-8 (Cysteine Aspartyl Protease-8/MACH/FLICE/Mch5)  
caspase-9 (Cysteine Aspartyl Protease-9/ICE-LAP6/Mch6/APAF-3)  
Caveolin 1, 2, and 3)  
CD45 transmembrane tyrosine phosphatase  
CD45AP (CD45-associated protein)  
c-fos transcription factor  
CDK1/cdc2 (Cyclin-dependent kinase-1)  
CDK2 (Cyclin dependent kinase-2)  
CDK4 (Cyclin dependent kinase-4)  
CDK5 (Cyclin dependent kinase-5)  
c-Jun transcription factor  
c-myc transcription factor  
Cortactin  
COX-2 (Cyclooxygenase-2/prostaglandin-endoperoxide synthase-2)  
c-kit receptor protein  
c-raf protein serine/threonine kinase  
CREB transcription factor  
Crk SH2 and SH3 domain-containing adaptor protein  
CSK (Carboxyl-terminal Src Kinase)  
cytochrome-c

## D

DAPK (Death Associated Protein Kinase)  
desmin  
DNA-PK (DNA dependent protein kinase)

## E

E2F-1 DNA binding protein  
EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor)  
eIF-2alpha (Eukaryotic translation Initiation Factor 2alpha)  
ERK1/MAPK (Extracellular signal-Regulated/Mitogen-Activated Protein Kinase 1)  
ERK2/MAPK (Extracellular signal-Regulated/Mitogen-Activated Protein Kinase 2)  
ERK3 (Extracellular signal-Regulated/p62 Mitogen-Activated Protein Kinase 3)  
ERK4 (Extracellular signal-Regulated Protein Kinase 4)  
ERK5 (Extracellular signal-Regulated Protein Kinase 5/Big MAP Kinase 1)  
ERK6 (Extracellular signal-Regulated Protein Kinase 6/p38gamma)  
ERK7 (Extracellular signal-Regulated Protein Kinase 7)  
ERK8 (Extracellular signal-Regulated Protein Kinase 8)

## F

F-actin  
FADD (Fas-associated Death Domain)  
FAK (Focal Adhesion Kinase/pp125FAK)  
FAS (FAS-Ligand Receptor)  
Fgr non-receptor Src family tyrosine kinase  
Fos B  
Fra-1 (Fos-related antigen-1)  
Fra-2 (Fos-related Antigen-2)  
FRK (Fos-Regulating Kinase)  
FYB (Fyn binding protein)  
Fyn non-receptor Src family tyrosine kinase

**G**

Gab 1 (Grb2-associated binder 1)  
Gab 2 (Grb2-associated binder 2)  
GCK (Germinal Center Kinase)  
GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor)  
Gi $\alpha$  inhibitory guanine nucleotide regulatory protein  
Gi $\beta$  inhibitory guanine nucleotide regulatory protein  
Gi $\gamma$  inhibitory guanine nucleotide regulatory protein  
Gq/11 guanine nucleotide-binding protein  
Gq/11 $\beta$  guanine nucleotide-binding protein  
Gq/11 $\gamma$  guanine nucleotide-binding protein  
Grb2 (Growth factor Receptor Binding protein-2)  
Grk2 (G protein-coupled Receptor Kinase)  
GSK-3 $\alpha$  (Glycogen Synthase Kinase 3alpha)  
GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3beta)

**H**

Hck (Hematopoietic cell kinase)  
HGF-R (Hepatocyte growth factor receptor)  
Hrk (3-Hydroxy-3-methyl glutaryl-coenzyme A Reductase Kinase)

**I**

I $\kappa$ B $\alpha$  NF $\kappa$ B inhibitory protein  
I $\kappa$ B $\beta$  NF $\kappa$ B inhibitory protein  
IKK $\alpha$  (I $\kappa$ B kinase alpha)  
IKK $\beta$  (I $\kappa$ B kinase beta)  
IKK $\gamma$  (I $\kappa$ B kinase gamma/NEMO)  
IGF-1 receptor (Insulin-like growth factor-I receptor)  
Insulin receptor  
Integrins  
Integrin-Associated Protein (IAP/CD47)  
IRAK (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase)  
IRK (Insulin Receptor Kinase)  
IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1)  
IRS-2 (Insulin Receptor Substrate 2)

**J**

JAB1 (Jun-Activation domain Binding protein 1)  
JAK1 (Janus Activating Kinase 1)  
JAK2 (Janus Activating Kinase 2)  
JAK3 (Janus Activating Kinase 3)  
JNK1/SAPK $\gamma$  (c-Jun amino-terminal kinase 1/Stress-Activated Protein Kinase  $\gamma$ )  
JNK2/SAPK $\beta$  (c-Jun amino-terminal kinase 2/Stress-Activated Protein Kinase  $\beta$ )  
JNK3/SAPK $\alpha$  (c-Jun amino-terminal kinase 3/Stress-Activated Protein Kinase  $\alpha$ )

**L**

LAT (Linker for Activation of T cells)  
Lck non-receptor Src family protein tyrosine kinase  
Lyn non-receptor Src family protein tyrosine kinase

**M**

MEF2c transcription factor  
MEK1 (Mitogen-activated ERK-activating Kinase 1)  
MEK2 (Mitogen-activated ERK-activating Kinase 2)  
MEK3 (Mitogen-activated ERK-activating Kinase 3)  
MEK4 (Mitogen-activated ERK-activating Kinase 4)

MEK5 (Mitogen-activated ERK-activating Kinase 5)  
 MEKK1 (MEK kinase 1)  
 Met (c-met/HGF-receptor)  
 MKP 1 (MAP Kinase Phosphatase 1)  
 MKP 2 (MAP Kinase Phosphatase 2)  
 MKP 3 (MAP Kinase Phosphatase 3)  
 MKP 4 (MAP Kinase Phosphatase 4)  
 MKP 5 (MAP Kinase Phosphatase 5)  
 MKP 6 (MAP Kinase Phosphatase 6)  
 MLCK (Myosin light chain kinase)  
 MuSK (Muscle specific serine/threonine kinase)  
 Myosin  
 MLCK PPase (Myosin Light Chain Kinase Phosphatase)

## N

Beta-NAP (Beta-Neuron Adaptor Protein/AP-3)  
 NAT1/DAP-5 (Novel APOBEC-1 Target no.1/Death-Associated Protein-5)  
 NCK SH2 and SH3 domains-containing transforming protein  
 Nek2 (Nima-related Kinase2)  
 NFAT-1 (Nuclear Factor of Activated T-cells)  
 NfkappaB (Nuclear Factor Kappa B transcription factor)  
 NIK (NFKappaB Inducing Kinase)  
 NTK (Nervous Tissue and T cell Kinase)

## P

p130cas  
 p190RhoGAP GTPase  
 P2Y2 purinoceptor  
 p36 CAK assembly/activation factor  
 p38 (ERK6 MAPK/SAPK)  
 p38d (SAPK4)  
 p53 Tumor suppressor gene.  
 p58 IPK (Inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated Protein Kinase, PKR)  
 p62dok GAP-associated protein  
 p62 lck ligand/ZIP  
 p68 kinase  
 p96  
 PAK1 (p21-Activated protein Kinase 1)  
 PAK2 (p21-Activated protein Kinase 2)  
 PAK3 (p21-Activated protein Kinase 3)  
 PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymerase)  
 Paxillin  
 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)  
 PDGF Receptor (Platelet Derived Growth Factor Receptor)  
 PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase-1)  
 PDK-2 (Phosphoinositide-Dependent Kinase-2/ Integrin-linked kinase)  
 PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)  
 PI3K (Phosphatidyl Inositol-3-Kinase)  
 PIAS (Protein Inhibitors of Activated STATs)  
 PTP alpha (Phosphatidylinositol Transfer Protein alpha)  
 PKA alpha/cAMP-dependent protein kinase  
 PKB (Protein kinase B)  
 PKC alpha (Protein Kinase C alpha)  
 PKC beta (Protein Kinase C beta)  
 PKC delta (Protein Kinase C delta)  
 PKC gamma (Protein Kinase C gamma)  
 PKD (Protein Kinase D)  
 PKR (Protein Kinase R or double-stranded RNA-activated protein kinase)

PLC-gamma1 (Phospholipase C-gamma1)  
 PRK (Proliferation Related Kinase)  
 PTEN (MMAC1 tumor suppressor gene/protein phosphatase)  
 Pyk2 (CAKbeta/FAK2/RAFTK) Protein tyrosine Kinase

## R

Rac/cdc42 GTPase  
 Raf1 (C-raf) serine/threonine protein kinase  
 A-Raf serine/threonine protein kinase  
 B-raf serine/threonine kinase  
 V-Raf viral serine/threonine protein kinase  
 RAFTK (Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase)  
 RAIDD (RIP-Associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a Death Domain)  
 Rap2 GTPase  
 Rap1-GAP (C3G) inactivator of Rap-1  
 Rapsyn  
 Ras GTPase  
 Rb (Retinoblastoma tumor suppressor protein)  
 Rho Small molecular weight GTPase  
 RIP (Receptor Interacting Protein)  
 ROCK (Rho-activated kinase)

## S

S6k (S6 Kinase)  
 Shc  
 SHIP (SH2 domain containing inositol phosphatase)  
 SH-PTP1 Protein Tyrosine Phosphatase  
 SH-PTP2 Protein Tyrosine Phosphatase  
 SIRPalpha1 (Signal Related Protein Alpha)  
 SIP1 (Smad Interacting Protein 1)  
 Smad2 (Sma and Mad-related 2)  
 Smad3 (Sma and Mad-related 3)  
 Smad5 (Sma and Mad-related 5)  
 Smad7 (Sma and Mad-related 7)  
 SOCS-1 (Suppressor of Cytokine Signaling-1)  
 SOCS-2 (Suppressor of Cytokine Signaling-2)  
 SOCS-3 (Suppressor of Cytokine Signaling-3)  
 SOS (Son of Sevenless)  
 Src non-receptor tyrosine kinase  
 SRF (Serum Response Factor)  
 SRPK1 (SR protein-specific Kinase1)  
 SRPK2 (SR protein-specific Kinase2)  
 STAT1alpha (Signal Transducer and Activator of Transcription 1)  
 STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription 2)  
 STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)  
 STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4)  
 STAT5alpha (Signal Transducer and Activator of Transcription 5alpha)  
 STAT5beta (Signal Transducer and Activator of Transcription 5 beta)  
 STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6)  
 Syk (Spleen tyrosine kinase)  
 Syndecans transmembrane proteoglycan

## T

Tak1 (TGF-b1 activated kinase)  
 Talin  
 TANK/I-TRAF (TNF Receptor Activating Factor)  
 Tau microtubule-associated protein  
 TBK-1/T2K (TANK Binding Kinase 1)

**T**

Tensin  
TNF-RI (Tumor Necrosis Factor Receptor I)  
TRADD (TNF-Receptor Associated Death Domain protein)  
TRAF1 (TNF-Receptor Associated Factor 1)  
TRAF2 (TNF-Receptor Associated Factor 2)  
TRAF3 (TNF-Receptor Associated Factor 3)  
TRAF4 (TNF-Receptor Associated Factor 4)  
TRAF5 (TNF-Receptor Associated Factor 5)  
TRAF6 (TNF-Receptor Associated Factor 6)

TrkA protein tyrosine receptor kinase A  
TrkB protein tyrosine receptor kinase B  
TrkC protein tyrosine receptor kinase C

**V**

VEGF-receptor (vascular endothelial growth factor receptor, types 1, 2, 3)  
Vinculin

**W**

WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein)

**Z**

ZIP (Zeta Interacting Protein)  
ZIP kinase (zipper serine/threonine kinase)  
ZRP-1 (Zyxin Related Protein)  
Zyxin

Antibodies of the present invention are also useful for inactivating phosphorylated polypeptides for therapeutic purposes. The examples illustrate the present invention and are not intended to limit the invention in spirit or scope. Similarly, the description of these reagents and methods can be used in an inverse function to analyze the activity of protein specific phosphatases, enzymes that remove phosphate groups from specific amino acid residues.

## CLAIMS

What is claimed:

1. A method for measuring phosphokinase activity on a protein comprising:
  - (a) subjecting a protein to a phosphokinase to phosphorylate a phosphorylation site on the protein
  - (b) providing an antibody specific to a phosphorylated phosphorylation site on the protein;
  - (c) contacting the protein from (a) with the antibody of (b); and
  - (d) detecting the antibody bound to the phosphorylation site.
2. A method according to claim 1 wherein the protein is the Tau protein.
3. A method according to claim 2 wherein the phosphokinase is GSK-3 $\beta$ , PKA, PKC, CDK-5, MARK, JNK, p38MAPK, or casein kinase II.
4. The method according to claim 2 wherein the antibody is specific to a phosphorylated site at a specific location in the Tau protein, selected from the sites shown in Table II.
5. A method according to claim 1 wherein the protein is selected from the proteins in Table I.
6. The method of claim 1 wherein the protein is EGFR.
7. The method of claim 1 wherein the protein is Rb.
8. An antibody prepared from a polypeptide immunogen having a phosphorylated serine.
9. An antibody raised to a polypeptide immunogen having a phosphorylated threonine.
10. An antibody raised to a polypeptide immunogen having a phosphorylated tyrosine.
11. An antibody specific for sequence ID #1.
12. An antibody specific for sequence ID #2.

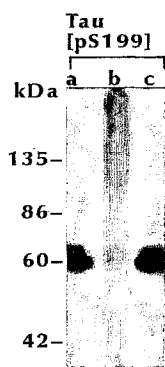
13. An antibody to EGFR phosphorylated tyrosine 1173 or tyrosine 845 site.
14. An antibody to phosphorylated threonine 821 site.
15. A kit for the measurement of phosphokinase activity on a protein comprising
  - (a) a first pan antibody specific and that binds to both phosphorylated and non-phosphorylated forms of the protein ;
  - (b) a second pan antibody that binds to an independent site on the protein from the first pan antibody, wherein the second pan antibody is labeled;
  - (c) non-phosphorylated and phosphorylated protein standards;
  - (d) a phosphorylation site-specific antibody (PSSA) which binds to the protein only when the target site on the protein is phosphorylated and wherein the PSSA antibody is labeled; and
  - (e) buffers.
16. A kit according to claim 11 where the protein is Tau.
17. A kit according to claim 11 where the protein is selected from the proteins listed in Table I.
18. A kit for the measurement of different kinase activities on a protein by quantitating phosphorylation site profiles comprising:
  - (a) a first pan antibody that binds to both phosphorylated and non-phosphorylated forms of the protein;
  - (b) a second pan antibody that binds to an independent site on the protein from the first pan antibody and wherein the second pan antibody is labeled;
  - (c) protein standards for the non-phosphorylated and phosphorylated forms of the protein;
  - (d) two or more PSSAs which bind to the protein only when the target sites on the protein which are phosphorylated wherein antibody is labeled so as to be ; and
  - (e) buffers.
19. A kit according to claim 14 where the protein is Tau.
20. A kit according to claim 14 where the proteins are as defined in Table I.

**(57) Abstract:** The invention involves a method for measuring phosphorylation of proteins and, as such, is an indicator of protein kinase activity. The method involves the *in vitro* phosphorylation of a target protein but subjecting that protein (non-phosphorylated) to reaction mixture containing all reagents, including phosphokinase which allow the creation of a phosphorylated form of protein. The phosphorylated protein is measured by contacting it with an antibody specific for the phosphorylation sites(s). The invention includes antibodies useful in practicing the methods of the invention. The invention particularly relates to phosphorylation of Tau, Rb and EGFR proteins and antibodies specific for the site of phosphorylation of the Tau, Rb or EGFR proteins.

Representative Drawing

None

Figure 1



2/12

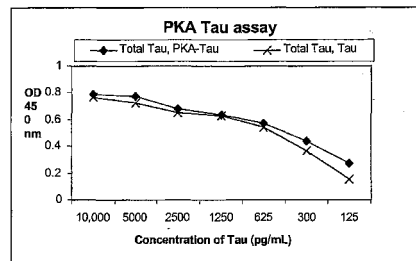


FIGURE 3a

Tau pS214



FIGURE 2

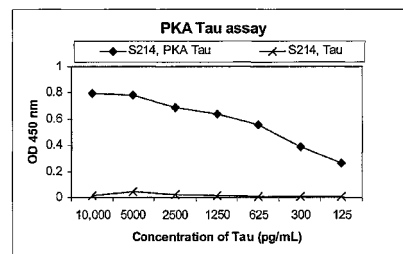


FIGURE 3b

3/12

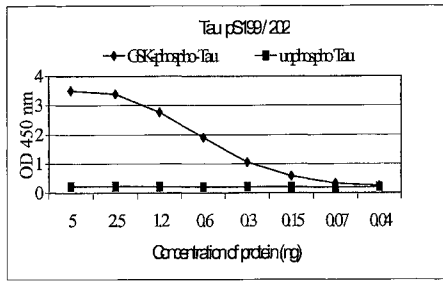


Figure 4a

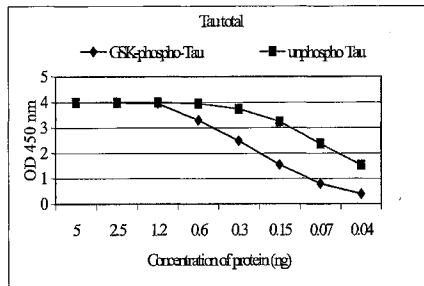


Figure 4b

4/12

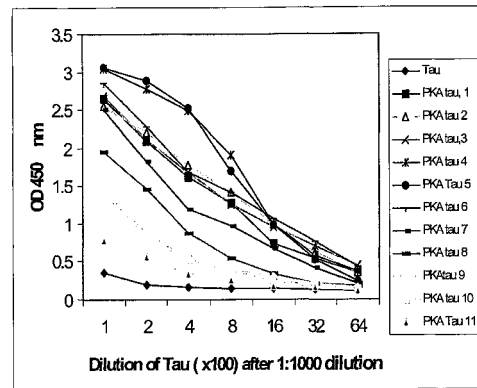


Figure 5

5/12

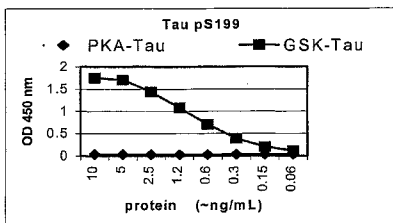


Figure 6a

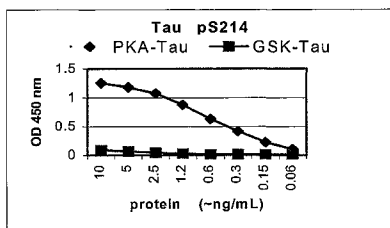


Figure 6b

6/12

Figure 7

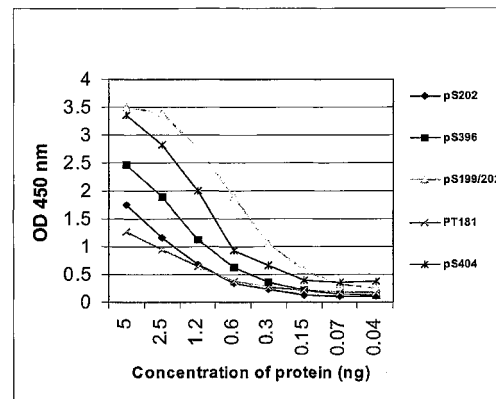


Figure 8

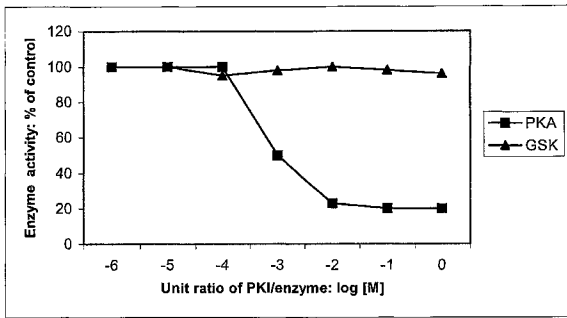


Figure 10

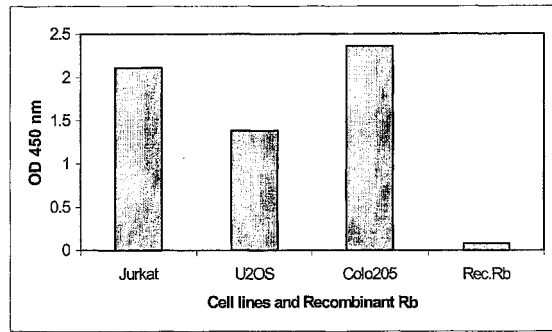


Figure 9

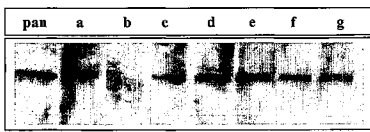


Figure 11

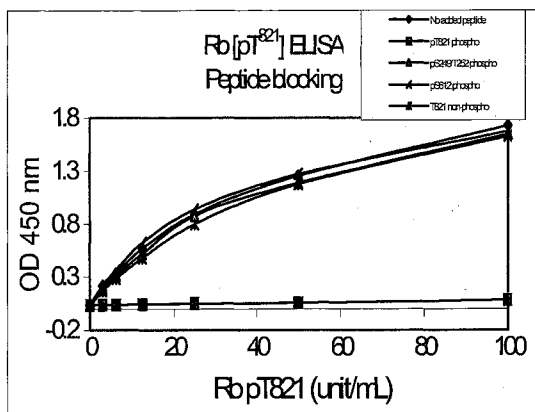


Figure 12

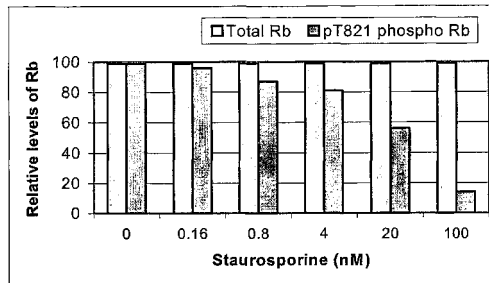


Figure 13

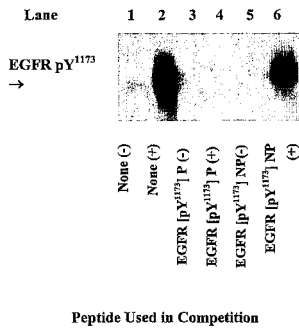


Figure 14

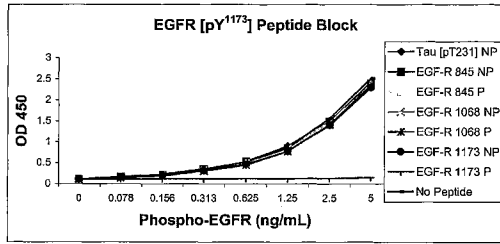


Figure 15

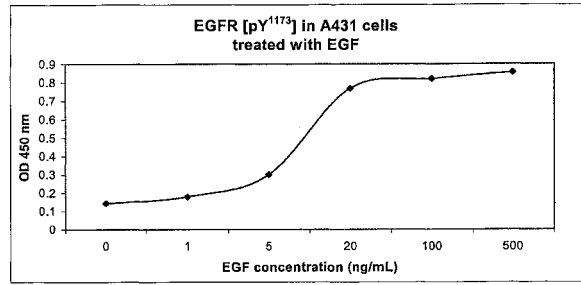
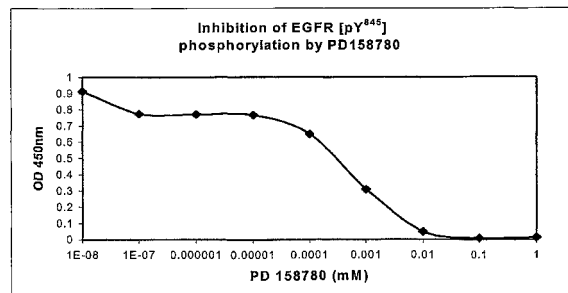


Figure 16



专利名称(译)	定量蛋白质上磷酸激酶活性的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006225396A</a>	公开(公告)日	2006-08-31
申请号	JP2006079226	申请日	2006-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	矿泉国际		
申请(专利权)人(译)	矿泉国际		
[标]发明人	レーガンケヴィンジェイ シェーフェーエリック ワンジミン		
发明人	レーガン、ケヴィン ジェイ. シェーフェー、エリック ワン、ジミン		
IPC分类号	C07K16/00 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/40 C12Q1/48 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/2863 C07K16/18 C07K2317/34 C12Q1/485 G01N2333/4709		
FI分类号	C07K16/00 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/40 C12Q1/48.Z G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ27 4B063/QQ79 4B063/QR07 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR57 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	三好秀		
优先权	60/235620 2000-09-27 US		
其他公开文献	JP2006225396A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种测量蛋白质磷酸化的方法。一种包含靶蛋白体外磷酸化的反应，该反应包含所有试剂，包括使该蛋白（非磷酸化的）被制成该蛋白的磷酸化形式的磷酸激酶。它必须是混合物。通过与对该磷酸化位点具有特异性的抗体缀合来测量该磷酸化蛋白。包括可用于测量的抗体。特别地，它由对tau蛋白，Rb蛋白和EGFR蛋白的磷酸化位点和tau蛋白，Rb蛋白或EGFR蛋白的磷酸化位点具有特异性的抗体组成。  
[选择图]无

(43) 公開日 平成18年8月31日(日)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(記)
<b>C07K 16/00 (2006.01)</b>	C07K 16/00	4B063
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18	4B064
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	4H045
<b>C07K 16/40 (2006.01)</b>	C07K 16/40	
<b>C12Q 1/48 (2006.01)</b>	C12Q 1/48	Z
審査請求 未請求 請求項の数 20 O L 外国語出願 (全 57 頁) 最		
(21) 出願番号	特願2006-79226 (P2006-79226)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成18年3月22日 (2006. 3. 22)	バイオソース インターナショナル
(62) 分割の表示	特願2002-530779 (P2002-530779) の分割	アメリカ合衆国 カリフォルニア 012 カマリーロ フリン ロ 20
原出願日	平成13年9月27日 (2001. 9. 27)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	60/235, 620	弁理士 三好 秀和
(32) 優先日	平成12年9月27日 (2000. 9. 27)	(72) 発明者
(33) 優先権主張国	米国 (US)	レーガン、ケヴィン ジェイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 301 アゴーラ ヒルズ ミド スト ドライブ 5833
		(72) 発明者
		シェーフェー、エリック