

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 532405

(P2003 - 532405A)

(43)公表日 平成15年11月5日(2003.11.5)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		45/00	4 B 0 2 4
45/00		48/00	4 B 0 5 0
48/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00		C 0 7 K 14/82	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求(全 39数) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001 - 582378(P2001 - 582378)	(72)発明者	マティアス・ゲオルク・クリスティアン・グスタイガー
(86)(22)出願日	平成13年5月11日(2001.5.11)		スイス、ツェーハー - 4054バーゼル、ビル
(85)翻訳文提出日	平成14年11月11日(2002.11.11)		ジッヒシュトラーセ127番
(86)国際出願番号	PCT/EP01/05403	(72)発明者	ヴィルヘルム・クレック
(87)国際公開番号	W001/085779		スイス、ツェーハー - 4125リーヘン、エル
(87)国際公開日	平成13年11月15日(2001.11.15)		レンシュトレスヒェン73番
(31)優先権主張番号	0011439.7	(74)代理人	弁理士 青山 葆 (外3名)
(32)優先日	平成12年5月12日(2000.5.12)		
(33)優先権主張国	イギリス(GB)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗癌剤をスクリーニングするためのタンパク質複合体およびアッセイ

(57)【要約】

S k p 2 結合タンパク質(S T A P 1)含有タンパク質複合体は、抗癌剤の同定に有用性を提供する。また提供されるのは、本方法を使用して同定された治療剤として使用するための薬剤である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 約18kD以下の分子量を有するSkp2結合タンパク質(STAP1)またはそのポリペプチドフラグメントと、1個以上の他のタンパク質またはポリペプチドを含む、複合体。

【請求項2】 Skp2結合タンパク質(STAP1)またはそのポリペプチドフラグメントが実質的に図2(配列番号1)に示すアミノ酸配列、またはそれと少なくとも60%の同一性を有する配列を含む、請求項1に記載の複合体。

【請求項3】 Skp2結合タンパク質(STAP1)またはそのポリペプチドフラグメントが実質的に図1(配列番号2または配列番号3)に示す核酸配列、またはそれと少なくとも70%の相同性を有する配列によりコードされている、請求項2に記載の複合体。

【請求項4】 Skp2結合タンパク質(STAP1)の少なくとも一つのアミノ酸が中性または保存的置換で置換されている、請求項3に記載の複合体。

【請求項5】 少なくとも1個の付加的アミノ酸をSkp2結合タンパク質(STAP1)配列に含む、および/または更に付加的アミノ酸配列またはドメインを含むみ、好ましくは、任意の付加的アミノ酸、配列またはドメインはアミノ酸66から119のSkp2結合領域以外に挿入される、請求項1から3のいずれかに記載の複合体。

【請求項6】 1個以上のTIP48、TIP49、RPB5およびRMP1を含む、請求項1から5のいずれかに記載の複合体。

【請求項7】 サブユニットSTAP1、TIP48、TIP49、RPB5、RMP1が約1:1:1:1:1の比率で存在する、請求項14に記載の複合体。

【請求項8】 免疫沈降により得られる、請求項1から7のいずれかに記載の複合体。

【請求項9】 実質的に他の細胞性不純物を含まない、請求項1から8のいずれかに記載の複合体。

【請求項10】 インビトロで構造タンパク質またはポリペプチドサブユニットからの凝集により得る、請求項1から9のいずれかに記載の複合体。

【請求項11】凝集が構造サブユニットを過剰発現するように形質転換した細胞で起こる、請求項1から10のいずれかに記載の複合体。

【請求項12】請求項1から11のいずれかに記載の通りの一定量の複合体と試験化合物を接触させ、1個以上の：(a)そのまま残る複合体の量、(b)損失したそのままの複合体の量、または(c)複合体から放出された遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニットの量を測定することを含む、抗癌剤の同定法。

【請求項13】複合体の量を複合体の1個以上の活性、好ましくは酵素および/またはリガンド活性の測定により測定する、請求項12に記載の方法。

【請求項14】リガンドが核酸またはタンパク質から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】酵素活性がATPase活性および/またはDNAヘリカーゼ活性である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニット量を酵素的および/またはリガンド結合活性の測定により測定する、請求項12に記載の方法。

【請求項17】試験化合物と接触させる前に、そのタンパク質サブユニット成分からの複合体の形成の段階を更に含む、請求項12から16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】抗癌剤のスクリーニング法、好ましくは、請求項12から17のいずれかに記載の方法における、RPB5および/またはSkp2結合タンパク質(STAP1)またはそのフラグメントの使用。

【請求項19】インビトロでの複合体の凝集のための、RPB5および/またはSkp2結合タンパク質(STAP1)またはそのフラグメントの使用。

【請求項20】請求項12から17のいずれかに記載の方法により同定された抗癌剤、好ましくは、抗増殖剤。

【請求項21】該薬剤がアンチセンス核酸である、請求項20に記載の薬剤。

【請求項22】該薬剤が核酸である、請求項20に記載の薬剤。

【請求項23】請求項12から17のいずれかに記載の方法により同定さ

れた薬剤の有効量を個体に投与することを含む、癌を予防または処置する方法。

【請求項24】 配列番号2または3の核酸の全てまたは一部に対する核酸アンチセンス、または配列番号2、配列番号3または配列番号4と少なくとも70%相同性を有し、低ストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズできる配列に対するアンチセンス。

【請求項25】 ヌクレオチド残基の数個がヌクレアーゼ分解に耐性であり、ホスホロチオエートおよび/またはメチルホスホネートから例えば選択される、請求項24に記載のアンチセンス核酸。

【請求項26】 医薬として使用するための、配列番号2、入れ得t番号3または配列番号4の核酸、それらと少なくとも70%相同性である配列、それらの配列またはそれらの相補鎖(complement)。

【請求項27】 配列番号2または3の核酸の全てまたは一部に対する核酸アンチセンス、または配列番号2または配列番号3と少なくとも70%相同性を有し、低ストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズできる配列に対するアンチセンスの有効量を個体に投与することを含む、癌を予防または処置する方法。

【請求項28】 SKP1結合タンパク質(STAP1)またはそのフラグメントを特異的に認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体。

【請求項29】 試験化合物非存在下の場合と比較した、試験化合物の存在下でのSKP2結合タンパク質(STAP1)またはそのポリペプチドフラグメントにおける結合または結合の変化を測定すること、所望によりコントロール化合物の結合の測定を含む、抗癌剤を同定する方法。

【請求項30】 好ましくはSKP2結合タンパク質(STAP1)またはそのポリペプチドフラグメントまたは変異体を支持体に固定化し、より好ましくは支持体はニッケルまたはニッケル被覆である固相アッセイである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 SKP2結合タンパク質(STAP1)、そのポリペプチドまたは変異体が標識されている、請求項29または30に記載の方法。

【請求項32】 標識が蛍光標識、酵素標識、ビオチン、金属ゾル粒子また

は放射標識から選択される、請求項31に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は癌診断および治療の分野に関する。本発明はまた、予防的であれ治療的であれ、抗癌活性の可能性のある化合物のスクリーニングに関する。考慮されるスクリーニングアッセイは、癌を発生させる細胞分裂、遺伝子発現および形質転換に関与するそのままの細胞のインビボの生化学的機構の部分を模倣すると考えられる。

【0002】

世界の豊かな国において、癌は概ね5人に1人の死亡の原因である。1993年に、米国癌学会は5種の最も一般的な癌は、肺、胃、胸部、結腸/直腸および子宮頸部のものであると報告している。癌は全ての例において致命的であるわけではなく、癌を発症した人の約半分のみがそれで死亡する。癌患者およびその医師らが対面する問題は、癌の治療をしようと努めることが雑草退治を試みているようであることである。癌細胞は外科的に除去するか、毒性化合物または照射により死滅できるが、癌性細胞の全ての除去は非常に困難である。一般的なゴールは、癌細胞を選択的に殺し、一方体の正常細胞は影響を受けずに残すことである。この努力の一部は、新規抗癌剤の同定に関与する。

【0003】

癌細胞は細胞サイクルの正常制御を失っており、正常細胞と比較して、制御を超えて分裂する。細胞サイクルを制御する細胞下機構は、細胞の中身の複製および分裂の必須の工程を誘導および調和させる相互作用タンパク質のセットからなる複合生化学的デバイスである。正常細胞サイクルにおいて、制御システムは、サイクルの特異的ポイントで停止できるように制御される。停止ポイントは複製または分裂の工程からフィードバックのシステムを可能にする。それらはまた環境シグナルにより制御するためのポイントを提供する。

【0004】

遺伝子発現は細胞分裂およびその制御において不可欠な部分を担う。細胞分裂の損失は、ある場合、遺伝子発現の変更を本来有し得る。癌細胞における遺伝子変更の分析は、何らかの方法で細胞分裂の制御に関与するタンパク質をコードす

る多くの遺伝子で明らかになっている。

【0005】

癌遺伝子はこのような遺伝子の一つのファミリーである。癌遺伝子は、変異形で癌細胞で発現されるか、過剰発現される。このような癌遺伝子の生成物は細胞増殖を促進する。癌遺伝子の非変異または正常発現バージョンは原癌遺伝子として既知であり、これは正常細胞で発現させ、正常細胞機構の構造タンパク質をコードする。

【0006】

癌に関連する遺伝子生成物の他の種は、腫瘍抑制遺伝子により発現されるものであり、この遺伝子生成物は細胞増殖の抑制に働く。腫瘍抑制遺伝子の変異またはこの遺伝子生成物の機能の損失は、増殖の正常制御の損失および制御を超えた細胞分裂をもたらす。

【0007】

癌細胞およびそれらの癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子の研究は、成長因子が、細胞内シグナル伝達カスケードの複合ネットワークを介して正常細胞中で細胞増殖をどのように制御するかを示すのを助けている。これらのカスケードは、最終的に遺伝子転写および細胞サイクル制御システムの構築と活性化を制御する。細胞サイクル制御機構の成分部分およびどのようにそれが作動するかに関する知識が増えるに連れて、癌細胞における制御の損失を正すための可能性は増えている。制御の必須ポイントおよび必須タンパク質が制御ヒエラルキーで同定されており、必要に応じて、プロモーターまたは阻害剤として作用するように薬剤で標的化する可能性がある。

【0008】

細胞サイクル制御システムは、タンパク質の二つの主要なファミリーに基づく。第1は、サイクリン依存性タンパク質キナーゼ(CDK)であり、その多くの変異体、例えば、CDK1およびCDK2が存在する。CDKは選択タンパク質をセリンおよびスレオニン残基でリン酸化する。タンパク質の第2の種類はCDK分子に結合し、標的をリン酸化するその能力を制御するサイクリンと呼ばれる分化した活性化タンパク質のファミリーである。サイクリンそれ自体は細胞サイク

ルの各段階で合成および分解のサイクルに付される。サイクリンの種々の種、例えば、サイクリンAおよびサイクリンBが存在する。

【0009】

Chao Y et al (1998) Cancer Research 58:985-990は、正常サイクリンAレベルを発現する患者と比較した、患者におけるサイクリンAの過剰発現と、腫瘍細胞の増殖活性の間の相関を報告している。サイクリンAを過剰発現する患者は、過剰発現しない患者よりも短い平均無症候期間であった。Chao et al (1998)はまたサイクリンA相互作用タンパク質(Skp2)は過剰発現したとき、サイクリンAと同じ腫瘍細胞活性を示さないと報告した。Chao et al (1998)は、Skp2の発現が細胞サイクル進行にどのように関与するかに注目しているが、Skp2の実際の生化学的機能はまた未知である。

【0010】

より最近の文献において、Chao Y et al (1999) Cancer Letters 139:1-6は、サイクリンAが新規抗肝細胞癌(HCC)治療の検査の有用な標的を提供し得ると示している。例えば、アンチセンスmRNAを使用したSkp2の過剰発現の遮断を調査する実験の結果は、異常Skp2発現がHCC増殖と直接の相関がないことを示す。

【0011】

CDKの活性は細胞の制御の対象であり、CDK阻害タンパク質(p27)は同定されている。正常細胞において、p27はDNA複製に必須のCDKの白湯を制御することが示されている。p27のレベルは、静止細胞で高く、分裂の刺激を受けている細胞で低いことが判明している。p27はそれ自体細胞を分裂に駆動する活性化CDKの阻害により、細胞分裂のブレーキとして作用する。p27のレベルの減少は阻害から活性化CDKを離し、細胞を分裂に駆動する。このp27の活性と一致して、その不安定化が、腫瘍侵略性および癌患者の悪い予後と一般に相関している。

【0012】

細胞サイクル制御システムは動的システムであり、p27それ自体細胞中で一定レベルで残らない。レベルは細胞サイクルのポイントに依存して異なる。p2

7の低いレベルはユビキチン化および続くプロテアソーム仲介分解を介した破壊のためである。p27のユビキチン介在分解の必須条件は、活性化CDKによるスレオニン残基187(T187)のリン酸化である。リン酸化p27のユビキチン化に必要な酵素は知られていないが、酵母のようなシステムにおけるユビキチン化の知識から、p27に特異的なヒトユビキチンタンパク質リガーゼ(E3)が存在し得ると予測される。

【0013】

Sutterluety H et al (1999) Nature Cell Biology 1:207-214は、Skp2が、ユビキチン化経路を介して細胞中のp27の分解を促進することを報告している。Skp2はF-Box-タンパク質(FBP)ファミリーのタンパク質メンバーである。Skp2はSkp1、CluA(Cdc53)、F-Boxタンパク質(SCF)複合体のp27特異的レセプターであるように見える。このような複合体は酵母中で既知であり、FBPサブユニットがユビキチン化の基質に特異性を有するユビキチン-タンパク質リガーゼ(E3)として働く。E3は活性化ユビキチン分子のユビキチン接合酵素(E2)から分解する基質への移動を促進する。同様に、ヒトにおいて、SCF複合体が存在し、Skp2は、p27と特異的に相互作用する能力を有し、p27のユビキチン仲介分解に必須であるように見えるFBPである。インビボおよびインビトロの両方で、Skp2はリン酸化p27をユビキチン化し、分解する細胞性組織の律速成分であることが判明している。

【0014】

Skp2は一つの遺伝子の生成物であり、それ自体細胞を分裂に駆動する点で珍しい能力を有する。この能力は、他の既知の遺伝子生産物のわずか、例えば、E2F-1、c-My cおよびサイクリンE-CD2複合体のみしか共有しない。細胞サイクルのG1/S遷移時のSkp2の適時の蓄積は、哺乳類細胞におけるDNA複製開始の制御をする少数の律速段階の一つであり得る。Sutterluety et al (1999)は、SCF複合体に凝集しないSkp2の変異が、異所性に生成された野生型p27の排除の除外に不完全であることを発見した。また、変異Skp2はサイクリン-E/A関連キナーゼの活性化およびS相の導入を引き起こした。Skp2はまたCDKの独立した結合部位であり、活性化CDKはp27の

T187残基のリン酸化に關与するように見える。Sutterluety et al (1999)は、また、どのように正常Skp2が、サイクリンE/A依存的キナーゼの活性化およびS相への挿入が非分解可能p27変異体の発現により遮断されるときでさえ、サイクリンAタンパク質の蓄積を誘導するかに注目している。考慮されるのは、Skp2がサイクリンAを上方制御し、この下方制御されたp27とは無関係であると結論付けられている。Skp2がサイクリンAを上方制御する機構は未知である。形質転換細胞におけるSkp2の觀察される上昇したレベルは、腫瘍抑制作用因p27の分解の速度の増加をもたらすことにより、腫瘍発生(tumorigenesis)の工程に、少なくとも部分的に寄与するはずであるという示唆がある。p27発現の欠失は、結腸直腸および乳癌の患者の無症状生存と相関する。また、p27は腫瘍抑制にハプロ-不完全(haplo-insufficient)であることが判明している。

【0015】

Carrano A. C. et al (1999) Nature Cell Biology 1:193-199は、どのようにSkp2が物理的にリン酸化p27と、インビトロおよびインビボの両方で相互作用するかを報告している。p27ユビキチン化に機構的に必須であるリガーゼの全ての成分が発見しなければならないままであるが、Carrano et al (1999)は、Skp2がこの機構の重要な部分であり、基質認識およびp27への特異性を提供することを証明している。Skp2に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが細胞においてSkp2発現を減少させ、それにより内因性p27のレベルの増加をもたらすことが判明している。Carrano et al (1999)は、p27のユビキチン化が起こるためには、サイクリンE-CDK2またはサイクリンA-CDK2の更なる必要性を確認している。細胞におけるp27分解は、有糸分裂刺激に続くSkp2およびサイクリンの両方の蓄積による二重制御に付されるように見える。

【0016】

癌の分子ベースを解明している科学者に興味深いのは、遺伝子発現の制御の分子ベースに關連する研究の分野である。癌におけるSkp2およびp27の見かけの必須の役割と以前は非關連であったのは、Bauer A. et al (1998) Proc. Na

tl. Acad. Sci. USA 95:14787-17492において報告されたPontin 52である。Pontin 52は、TATAボックス結合タンパク質(TBA)の結合部位を有する核タンパク質である。Pontin 52はまた - カテニンの結合部位を有する。Pontin 52は遍在し、非常に保存されたATP依存的ヘリカーゼタンパク質である。 - カテニンは通常細胞間接続に関与する他の分子の細胞質アンカーを提供する一つの役割を有する、細胞質タンパク質である。 - カテニンはまたWntシグナル伝達経路における参与物であることが既知である。Wntシグナル伝達経路において、 - カテニンは細胞質において安定化されるようになり、したがって、リンパ球エンハンサー因子-1/T細胞因子(LEF-1/TCF)ファミリーの転写因子と相互作用できる、これらの転写因子との相互作用は、 - カテニンが核で局在化し始める原因である。 - カテニンとPontin 52の結合は、 - カテニンとTBPの間の必要な分子架橋を提供する。TBPは、DNA、特に、遺伝子プロモーターのTATAボックス領域に結合する。

【0017】

Pontin 52のタンパク質等価物は、TIP49と呼ばれる。Wood M. A. et al (2000) Molecular Cell 5:321-300 は、培養ラット胚線維芽細胞のc-Myc腫瘍形成製性形質転換が、TIP49を必須補助因子として必要とすることを観察している。TIP49は、インビボでc-Mycと複合体化することが判明した。TIP49は非常に保存性のタンパク質であり、ATPaseおよびDNAヘリカーゼ活性を有する。他の類似補助因子タンパク質であるTIP48も必須であるように見える。本明細書において、TIP48またはTIP49のいずれかの言及は、ヒトまたは任意の動物種において関連タンパク質(例えば、Pontin 52)を言及するとみなすべきである。

【0018】

Genebank配列AF083242は726塩基対を含み、図1に配列番号2として示す。本DNA配列は、任意の構造的または機能的タンパク質をコードすることも既知でなく、ゲノムにおいて任意の調節性または他の効果を有することが知られている配列でもない。また利用可能なのは、cDNA配列に由来する配列である。これは図2に配列番号1として明示する。

【0019】

また図1に示す、Genebank配列(配列番号2または配列番号3)と種々の程度の相同性を有する多くの発現配列標識(EST)が存在する。しかし、ESTの全て任意の遺伝子または遺伝子生成物と相関しない。

【0020】

本発明者らはSkp2およびp27の発現レベルに関して、種々の異なる癌細胞タイプのスクリーニングをしている。発明者らはまたSkp2およびH-RAS^{G12V}の両方と、一次齧歯類線維芽細胞の共形質転換を行なっている。これらの実験のほかに、発明者らは、Skp2が多くのヒト癌を担う癌遺伝子であることを発見している。

【0021】

Skp2の癌原性機能の調査において、発明者らはSkp2-関連タンパク質1(STAP1)と呼ばれる新規タンパク質を予想外に発見した。発明者らはSTAP1に対する抗体を生成し、これらの抗体をHeLa細胞からのSTAP1を免疫沈降するための抗体として使用した。免疫沈降物は、驚くべきことに、いくつかのSTAP1-共免疫沈降タンパク質を含むことが判明した。STAP1を含むタンパク質は、複合体を形成することが判明した。タンパク質の分子量を質量分析により測定し、対でタンパク質および遺伝子配列のデータベースをタンパク質の試みおよび同定のために調査した。全く予想外に、タンパク質のSTAP1含有複合体は、TIP48、TIP49、RPB5(RNA pol IIサブユニット5)、RMP1(RNA pol IIメディエータータンパク質)、プレフォルディン、ならびに他の現在まで未知のタンパク質を含むことが判明している。

【0022】

任意の理論に縛れることを望ずに、発明者らはSkp2がSTAP1および、転写制御アパレイタスの既知の要素、特にTIP49(およびTIP48)との複合体を介して相互作用できる腫瘍遺伝子を代表し、この連結がタンパク質-タンパク質結合および酵素的活性の阻害剤としての攻撃の新しいポイントを提供することを理解する。このような阻害剤は、抗増殖性およびしたがって、抗癌特性を有することが期待される。この発見の観点から、適当なスクリーニングアッセイ

は、本発明により、新規抗癌剤の同定のために開発できる。

【0023】

本発明の一つの態様において、したがって、約18kD以下の分子量を有するSkp2結合タンパク質(STAP1)またはそのポリペプチドフラグメントを提供する。分子量の測定は、好ましくは、Laemlli SDS-PAGEでの標準変性電気泳動を使用して行なう。

【0024】

本発明は、また、Skp2結合タンパク質(STAP1)または実質的に図2(配列番号1)に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドフラグメント、またはそれと実質的に相同の、特に少なくとも60%の同一性の程度(相同性)の配列を提供する。Skp2結合タンパク質は、好ましくは、約18kD以下の分子量を有する。

【0025】

アミノ酸配列同一性は少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より更に好ましくは95%、最も好ましくは少なくとも99%である。

【0026】

本発明のSkp2結合タンパク質(STAP1)またはそのポリペプチドフラグメントは、実質的に図1(配列番号2)、配列番号2または4に明示の核酸配列、または低ストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズでき、Skp2結合タンパク質またはそのフラグメントをコードできる、それと少なくとも70%相同性(同一性)を有する配列によりコードされる。低ストリンジェンシー条件は、約0.01×SSC緩衝剤を用い、比較して、高ストリンジェンシーは約10倍多い濃度を用いる。配列相同性は少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より更に好ましくは97.5%、最も好ましくは少なくとも99%であり得る。

【0027】

本発明にしたがい、STAP1をコードする他のヌクレオチド配列を配列番号4に明示する。配列番号2および3に対する全ての言及が別法として配列番号4

に対する言及も含むと解釈すべきである。

【0028】

本発明のSTAP1タンパク質およびその変異体は、少なくとも一つの制御因子、所望により細胞の他のタンパク質またはポリペプチドに結合親和性、および/または会合親和性を有する。また含まれるのは、STAP1タンパク質のポリペプチドフラグメントである。

【0029】

好ましいSTAP1タンパク質は、TIP48(EP092615A1)、TIP48(EP092615A1)、プレフォルジン、PRB5(Cheong et al., 1995, EMBO J. 14:143-150)およびRMP1(Dorjsuren et al., 1998, Mol. Cell Biol. 18:7546-7555)の1個以上、所望により他のタンパク質またはポリペプチドに結合親和性、および/または会合親和性を有する。これらのSTAP1タンパク質のポリペプチドフラグメントは、本発明の一部である。

【0030】

STAP1タンパク質およびポリペプチドの変異体はまた有用であり、本発明は、例えば、少なくとも1個のアミノ酸が欠失または置換されている、変異体の全ての形を含む。Skp2結合領域は、アミノ酸残基66から119により形成され、したがって、好ましい変異体において、天然配列と比較してこの領域の配列に変化がない。

【0031】

したがって、任意の欠失または置換は、アミノ酸66から119のSkp2結合部位領域以外である。

アミノ酸の置換が関与する任意の変化は、好ましくは中性または保存的置換である。

【0032】

他の変異体は、少なくとも1個の付加的アミノ酸を配列に含む、および/または更に付加的アミノ酸配列またはドメインを含むタンパク質またはポリペプチドを含む；好ましくは、任意の付加的アミノ酸、配列またはドメインはアミノ酸66から119のSkp2結合領域以外に挿入される。

【0033】

本発明によりまた提供されるのは、機能的 S k p 2 結合領域のみを含むポリペプチドである。

【0034】

S T A P 1 タンパク質またはポリペプチドの更なる変異体は、配列中の少なくとも1個のアミノ酸が天然または非天然アナログであるものを含む。また、配列中の1個以上のアミノ酸を、例えば、物理的安定性を増加させるために、または酵素、特にプロテアーゼまたはキナーゼ活性に対する感受性を低下させるために、化学的に修飾し得る。

【0035】

他の態様において、本発明は配列番号2または3の核酸の全てまたは一部に対する核酸アンチセンス；または配列番号2または配列番号3と少なくとも70% 相同性を有し、低ストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズでき、前記の S T A P 1 タンパク質またはポリペプチドをコードする配列に対するアンチセンスを提供する。核酸がそれに対してアンチセンスである配列は、配列番号2または配列番号3と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より更に好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%の相同性を有し得る。

【0036】

アンチセンス核酸は、好ましくは少なくとも10塩基長、より好ましくは少なくとも15、よりさらに好ましくは少なくとも50塩基長である。

【0037】

ある実施態様において、アンチセンス配列の少なくとも数個のヌクレオチド残基をヌクレアーゼ分解に耐性に作り得、これらはホスホロチオエートおよび/またはメチルホスホネートのような残基から選択できる。

【0038】

前記のアンチセンス核酸は、有利には医薬として使用でき、好ましい医薬適用は癌の予防または治療用の医薬の製造のためである。任意の特定の理論に縛れることを望まずに、発明者らは癌細胞における S T A P 1 発現のアンチセンス阻害

が、STAP1を含む転写制御複合体のレベルを減少し得ると考える。これは、順番に増殖に関連する遺伝子のスイッチを切り得る。

【0039】

本発明はまた配列暗号2または配列番号2の核酸、または低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズでき、医薬として使用するための本発明のSTAP1タンパク質またはポリペプチドをコードする、それらと少なくとも70%相同性の配列を提供する。配列番号2との配列相同性は少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より更に好ましくは97.5%、最も好ましくは少なくとも99%であり得る。ヌクレオチド残基の数個は、ヌクレアーゼ分解に耐性にし得、ホスホロチオエートおよび/またはメチルホスホネートから例えば選択する。核酸は、癌の予防または処置用の医薬の製造のために特に価値がある。任意の理論に縛れることを望まずに、発明者らは、核酸の抗癌活性はセンス抑制の機構を経由し得ると考える。

【0040】

したがって、本発明はまた、配列番号2または3の核酸の全てまたは一部に対する核酸アンチセンス、または配列番号2または配列番号3と少なくとも70%相同性を有し、低ストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズでき、前記のSTAP1タンパク質またはポリペプチドをコードする配列に対するアンチセンスの有効量を個体に投与することを含む、癌を予防または処置する方法を提供する。

【0041】

本発明はまた配列番号2または3の核酸、または配列番号2または配列番号3と少なくとも70%相同性を有し、低ストリンジェンシー条件下でそれとハイブリダイズでき、前記のSTAP1タンパク質またはポリペプチドをコードする配列の有効量を個体に投与することを含む、癌を予防または処置する方法を提供する。

【0042】

本発明の他の実施態様は、(a)前記の通りのSTAP1をコードする少なくとも一つの核酸配列部分、またはそれと少なくとも70%相同の配列、(b)前記の

通りのアンチセンス核酸、または(c)前記の通りの核酸および本発明のSTAP1タンパク質またはポリペプチドをコードしない少なくとも一つの核酸を含む、核酸構築物を含む。このような構築物は、天然に存在しない配列である。構築物は人工的であるが、ベクターとしての機能をそれらに与えるであろうDNAの必須配列を欠く。それらはリンカーまたは制限部位として機能する核酸配列を含み得る。好ましい構築物は当業者に既知のオリゴヌクレオチド合成の方法を使用して合成する。

【0043】

また提供されるのは、(a)前記の通りのSTAP1をコードする少なくとも一つの核酸配列部分、またはそれと少なくとも70%相同の配列、(b)前記の通りのアンチセンス核酸、(c)前記の通りの核酸、または(d)前記の通りの構築物を含むベクターである。

【0044】

好ましいベクターは、発現ベクター、好ましくはプラスミドまたはウイルスであるが、クローニングベクターも、所望によりプラスミドの形で提供される。

【0045】

本発明はベクターを含む宿主細胞を提供する；好ましくは、宿主細胞は本発明のSTAP1タンパク質またはポリペプチドを発現する。好ましい宿主細胞は真核細胞、より好ましくは昆虫細胞または哺乳類細胞である。

【0046】

本発明の構築物、ベクターおよび形質転換宿主細胞は、医薬、特に、癌の予防または処置用の医薬として使用する。

【0047】

本発明は、更に、本発明のSTAP1タンパク質またはポリペプチドに対して反応性の抗体を提供し、好ましくは本抗体はSTAP1タンパク質またはポリペプチドに対して特異的に反応性である。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得、他の形、例えば、ヒト化も本発明の範囲内で可能である。抗体はまた医薬として有用である。

【0048】

本発明は、個体に本発明の構築物、ベクター、宿主細胞または抗体の有効量を投与することを含む、癌を予防または処置する方法を提供する。

【0049】

他の実施態様において、本発明は試験化合物の、本発明のSTAP1タンパク質またはポリペプチドへの結合を測定することを含み、所望によりまたSTAP1タンパク質またはポリペプチドへのコントロール化合物の結合の測定も含む、抗癌化合物の同定法を提供する。

【0050】

抗癌化合物の同定の他の方法において、Skp2、またはSkp2のフラグメントまたは変異体への、試験化合物の存在下での、本発明のSTAP1タンパク質またはポリペプチドの結合の測定があり、所望により、試験化合物非存在下での結合の測定を含む。

【0051】

好ましい方法は固相アッセイであり、好ましい実施態様において、本発明のSTAPタンパク質またはポリペプチド、またはSkp2タンパク質、そのフラグメントまたは変異体を支持体に固定化する。最も好ましい支持体はニッケルまたはニッケル被覆、例えば、ニッケル被覆マイクロタイタープレートである。本発明のSTAP1タンパク質(またはポリペプチド)またはSkp2(Skp2フラグメントまたはSkp2変異体を含む)のいずれかを標識する。

【0052】

標識は蛍光標識、酵素標識、ビオチン、金属ゾル粒子または放射標識であり得る。好ましい実施態様において、標識はユーロピウムである。

【0053】

あるいは、抗癌剤のスクリーニング法は、好ましくは本発明のSTAP1タンパク質またはポリペプチドおよびSkp2(Skp2フラグメントまたはSkp2変異体も)の各々の蛍光標識、すなわち、二重標識を用いた、液相アッセイであり得る。

【0054】

本発明は、したがって、前記の通りの抗癌剤の同定法における、Skp2、S

k p 2 フラグメント、または S k p 2 変異体またはフラグメントの使用を含む。

【0055】

本発明はまた、前記の通りの抗癌剤の同定法における、S T A P 1 タンパク質またはポリペプチドの使用を含む。

【0056】

本発明のアンチセンス核酸はまた細胞における S T A P 1 タンパク質の発現の測定のためのプローブとして使用できる。これは、宿主細胞を S T A P 1 遺伝子でトランスフェクトしており、遺伝子の転写のチェックが望まれる状況において、特に有用である。またアンチセンス核酸は癌細胞サンプルにおける S T A P 1 遺伝子の転写レベルの同定のための研究ツールとして使用できる。

【0057】

配列番号2または配列番号3、または少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、より更に好ましくは95%、最も好ましくは99%それと相同である配列、理想的にはそれらのフラグメントは、S T A P 1 タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸のプライマーまたはプローブとして使用できる。

【0058】

核酸プライマーは、S T A P 1 をコードする核酸のサンプルの P C R 増幅の実施に使用し得る。P C R は分析ツールとして、所望により、S T A P 1 に特異的な核酸プローブと共に、S T A P 1 遺伝子および/またはその発現の検出に使用できる。

【0059】

他の態様において、本発明は前記の通りの S T A P 1 タンパク質またはポリペプチドおよび1個以上の他のタンパク質またはポリペプチドを含む複合体を提供する。好ましい複合体において、少なくとも一つの他のタンパク質またはポリペプチドは A T P a s e 活性を有する。他の好ましい複合体において、少なくとも一つの他のタンパク質またはポリペプチドは D N A ヘリカーゼ活性を有する。

【0060】

特に好ましい複合体は、1個以上の T I P 4 8、T I P 4 9、プレフォルディ

ン、R P B 5 および R M P 1、所望により1個以上の異なるタンパク質またはポリペプチドを含む。サブユニット S T A P 1、T I P 4 8、T I P 4 9、R P B 5、R M P 1 は約 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で存在し得るが、他の比率も可能である。所望により、付加的タンパク質またはポリペプチドは 1 : 1 の化学量論的比率で存在し得るが、また他の比率も可能である。

【0061】

本発明は、T I P 4 8 および / または T I P 4 9 および 3 個以上の他のタンパク質またはポリペプチドを含む、転写制御タンパク質複合体を提供する。これらの他のタンパク質またはポリペプチドは、前記の通りであり得る。

【0062】

前記の本発明の任意の複合体において、タンパク質またはポリペプチドサブユニット成分は、各々、5 から 5 0 0 k D、好ましくは 5 から 3 0 0 k D、より好ましくは 1 0 から 2 0 0 k D、より更に好ましくは 1 0 から 1 0 0 k D の分子量を有し得る。S D S - P A G E または質量分析は、分子量を確立する方法を提供する。

【0063】

前記の通りの本発明の複合体は、S T A P 1 または S T A P 1 のポリペプチドフラグメントに対して反応性の抗体を使用した免疫沈降により得られ得る。理想的に、本発明の複合体は他の細胞性不純物を実質的に含まない。したがって、単離複合体は、少なくとも 8 0 % 純度、好ましくは 9 0 % 純度、より好ましくは 9 5 % 純度、より更に好ましくは 9 9 % 純度である。純度は種々の方法、例えば、S D S - P A G E で測定できる。

【0064】

本発明の複合体を生成する別法は、それらを構造タンパク質またはポリペプチドサブユニットから凝集することであり得る。一つの方法は、各構造サブユニットの過剰発現をするように細胞を形質転換し、細胞中で複合体の凝集が起こるようにすることである。好ましい発現システムは形質転換昆虫細胞を用いる。

【0065】

他の方法は、インビトロで構造サブユニットと一緒に複合体の自己凝集に十分

な条件下で混合することである。好ましくは、サブユニットの混合は実質的に同じに起こる。形質転換細胞の粒子複合体の集合、続く単離およびそれらのインビトロでの全複合体の自己凝集を促進する条件下での残りのサブユニットとの混合を含む、混合の多くの他の可能性が存在する。また、粒子複合体はインビトロで、混合し、次いで残りのサブユニットと混合することにより製造できる。サブユニットまたは粒子複合体のインビトロでの混合の程度は複合体を生成するために重要でないと考える。

【0066】

他の態様において、本発明は、前記の通りの一定量の複合体と試験化合物を接触させ、1個以上の：(a)そのまま残る複合体の量、(b)損失したそのままの複合体の量、または(c)複合体から放出された遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニットの量を測定することを含む、抗癌剤の同定法を提供する。

【0067】

複合体の量は、複合体の1個以上の活性、好ましくは、酵素的および/またはリガンド結合活性の測定により決定し得る。リガンド結合を測定する場合、リガンドは核酸またはタンパク質から選択され得、好ましくはタンパク質結合活性は腫瘍遺伝子生成物である。例えばc-My cまたはSkp2結合活性、ベータ-カテニン結合活性、Hbx結合アッセイまたはRNAポリメラーゼII結合アッセイ。酵素活性を測定する場合、それはATPase活性、および/またはDNAヘリカーゼ活性であり得る。

【0068】

複合体から損失した遊離タンパク質またはポリペプチドの量を測定する方法において、遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニットは1個以上のRBP5、RMP1、プレフォルディン、TIP48、TIP49または前記の通りのSTAP1タンパク質またはポリペプチドであり得る。遊離タンパク質またはポリペプチドサブユニット量は、酵素的および/またはリガンド結合活性の測定により決定し得る。リガンド結合アッセイの場合、リガンドは核酸またはタンパク質から選択され得、好ましくはタンパク質結合活性は、腫瘍遺伝子生成物、例えばc-My cまたはSkp2結合活性、ベータ-カテニン結合活性、Hbx結合ア

ッセイまたはRNAポリメラーゼII結合であり得る。酵素活性を測定する場合、それはATPase活性、および/またはDNAヘリカーゼ活性であり得る。

【0069】

抗癌剤スクリーニングの全ての方法において、試験化合物と接触させる前に、そのタンパク質サブユニット成分からの複合体の形成の更なる段階が存在し得る。

【0070】

他の態様において、本発明は、試験化合物とTIP49および/またはTIP48と接触させ、ATPase活性を測定し、所望によりまた試験化合物非存在下でのATPaseの測定も含む、抗癌剤であるが、c-Mycにより仲介される癌に対する薬剤ではない抗癌剤の同定法を提供する。

【0071】

別の態様において、本発明は、TIP49および/またはTIP48とS件化合物を接触させ、ATPase活性を測定し、所望によりまた試験化合物非存在下でのATPase活性を測定することを含む、Skp2を発現する癌細胞に対して活性の薬剤の同定法を提供する。

【0072】

この方法が同定できる好ましい活性剤は、Skp2を過剰発現する癌細胞に対して活性のものである。本発明の方法により同定される他の好ましい薬剤は、c-Mycにより仲介されない癌に対して活性のものである。

【0073】

本発明の他の態様は、TIP48、TIP49、RPB5、RMP1または前記の通りのSTAP1タンパク質またはポリペプチド1個以上のタンパク質の、抗癌剤のスクリーニング法、好ましくは前記の任意の方法における使用である。本発明のこの態様と関連があるのは、前記の通りの複合体のインビトロ凝集のための、1個以上のTIP48、TIP49、RPB5、RMP1または本発明のSTAP1タンパク質またはポリペプチドの使用である。

【0074】

本発明は、前記の任意のスクリーニング法の実施により、抗癌剤の同定を可能

にする。好ましい抗癌剤は、癌細胞の増殖を阻害し、一般的な抗増殖剤であり得るものである。本発明は、アンチセンス核酸および抗体を含む、本方法を行なうことにより同定された全ての薬剤、および、医薬としての、特に、癌の予防または処置のための医薬としてのこれらの薬剤の使用を含む。

【0075】

本発明は、上記の本発明のスクリーニング法により同定された化合物の有効量を個体に投与することを含む、癌を予防または処置する方法を含む。

【0076】

本発明の好ましい実施態様を実施例の方法でここに記載し、それは簡便には図面を参照する：

図1はSTAP1の核酸配列(配列番号2)を示す。

図2はSTAP1の誘導されるアミノ酸配列(配列番号1)を示す。

図3はSTAP1の他のヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。

図4はSTAP1の他のヌクレオチド配列(配列番号4)を示す。

【0077】

実施例1 - 細胞のSkp2およびH-Ras^(G12V)トランスフェクションは、それらを形質転換する。

Skp2はH-Ras^(G12V)と協同し、軟観点におけるコロニー形成で採点して一次齧歯類線維芽細胞の細胞形質転換、およびヌードマウスにおける腫瘍形質転換をもたらす。このような形質転換体は、正常線維芽細胞またはE1A/H-Ras^{G12V}-形質転換誘導体よりも有意に低いレベルのp27を発現する。

【0078】

候補腫瘍遺伝子の機能的特性の感受性アッセイは、これらの遺伝子単独で、または組み合わせてトランスフェクトできる胚細胞培養の使用に由来する。ラット胚線維芽細胞に挿入したとき、E1AまたはR2F1のような腫瘍遺伝子は、Gly¹²がValに変えられた(G12V)H-Rasの腫瘍形成バージョンのような、共挿入された、協力する腫瘍細胞の存在下でのみそれらを形質転換できる。Skp2およびH-Ras^{G12V}をコードする哺乳類発現プラスミドを単独でまたは組み合わせて、一次ラット胚線維芽細胞にトランスフェクトした。3週間の

G418における選択の後、プレートを形態学的に形質転換されたコロニーに関して採点する。H-Ras^{G12V}の非存在下で、Skp2単独は形態学的に形質転換された増殖巣の発生に失敗した。対照的に、Skp2遺伝子と一緒にH-Ras^{G12V}は、実質的に増加した数の形態学的に形質転換されたコロニーを発生させ、プレート当たり平均70-110コロニーを発生させた。Skp2とH-Ras^{G12V}のトランスフェクションにより製造したコロニーは、容易に確立され、培養で急速に増殖する細胞系を発生させた。これらのSkp2/H-Ras^{G12V}発現細胞は、半固体培地(0.3%寒天含有新鮮培地)で平板培養した。2週間後、プレートをコロニーの存在に関して分析した。Skp2/H-Ras^{G12V}発現細胞は軟寒天で容易にコロニーを形成し、それは培養細胞形質転換の強い基準であった。加えて、 1×10^6 Skp2/H-Ras^{G12V}発現細胞を、2-3週齢ヌードマウスの脇腹に注射した。マウスを、注射部位の腫瘍の存在に関して採点した。それから2週間後、腫瘍形成が、Skp2/H-Ras^{G12V}発現細胞を注射した全ての実験動物で検出されたが、コントロールREFではなかった。共トランスフェクション実験の結果は、Skp2が腫瘍遺伝子として働くことができることを示す。

【0079】

実施例2 - 細胞の免疫組織化学的分析は、腫瘍細胞におけるSkp2とp27の間の有意な逆関係を示す。

Skp2発現を、ヒト一次口腔扁平上皮癌細胞癌、乳癌、リンパ腫および前立腺癌のシリーズで分析した。一般に、5マイクロメートルの厚さのホルマリン固定およびパラフィン包埋組織セクションを、p27に対するモノクローナル抗体およびSkp2に対するポリクローナル抗体を使用して免疫組織化学的にp27およびSkp2タンパク質に関して染色した。

【0080】

p27に対するモノクローナル抗体はTransduction Laboratories¹から入手可能である。Skp2に対するポリクローナル抗体は、適当に精製したSkp2町生物で動物を免疫化することにより、平均的当業者により容易に生成される。ポリクローナル抗体は、ポリクローナル抗体は、更に、Lisztwaig J et al (1998)

EMBO J 17:368-363に記載のように親和性精製できる。

【0081】

結果は、p27およびSkp2の発現が、試験した全ての癌に反比例することを示す。これは、Skp2が最も腫瘍遺伝子として機能しそうであることを確認する。

【0082】

これらの結果は、ヒト癌の進行におけるSCFユビキチンタンパク質リガーゼ複合体の基質認識サブユニットが関係しているとみなす。

【0083】

実施例3 - Skp2関連タンパク質(STAP1)をコードするcDNAの単離およびクローニング。

酵母2ハイブリッドスクリーニングを、ベイトとしてSkp2を使用して行なった。これから、約18kDaのタンパク質をコードするcDNAがクローン化され、それはここで我々はSTAP1(Skp2関連タンパク質1)と呼ぶ。STAP1タンパク質は現在まで未知である。

【0084】

約 1×10^6 クローンをpGAD-GH(Clontech)において構築されたHeLa細胞ライブラリーからスクリーニングし、それはGAL4 DNA結合ドメインベクターはS2-1にクローン化されたヒトSkp2の残基101-423をコードするベイトである。相互作用クローンは、トリプルドロップアウト媒体(Leu/Trp/Hisがなく25mM 3-アミノ-トリアゾールを伴う)での選択後に同定され、強いガラクトシダーゼ活性に関してアッセイした。35陽性クローンを配列決定した。配列比較は、全てのクローン化cDNAは、約18kDの分子量を有する、新規タンパク質STAP1をコードすることを明らかにした。

【0085】

実施例4 - 組換えSTAP1の製造。

ヒトSTAP1完全長バージョンを、Eshcherichia coli BL21において、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として発現させ、グ

ルタチオン - セファロースで精製し、グルタチオンで溶出した。方法は、Kaelin et al (1991) Cell. 64:521-532およびまたKrek et al (1994) Cell. 78:161-172に記載されている。

【0086】

実施例5 - STAP1に対して反応性の抗体の製造。

上記実施例4からの溶出STAP1物質をマウスに注射し、モノクローナル抗体を生成した。慣用のモノクローナル抗体製造プロトコールは当業者に既知のように行なった。ポSTAP1に対するリクローナル抗血清および抗体もまた当業者に良く知られた標準形のプロトコールにしたがった、上記実施例4のSTAP1溶出物質のウサギへの注射により生成した。

【0087】

実施例6 - HeLa細胞からのSTAP1含有複合体の免疫沈降および電気泳動的分離。

大規模免疫沈降を、HeLa全細胞抽出物で行なった。100 µgのプロテインAに結合したモノクローナル抗-STAP1抗体を、50mlのHeLa核抽出物(約2から10⁹)に添加し、2時間、4で回転させた。免疫沈降物を次いで25mlのTNN[20mM トリス-HCl(pH8.0)、0.1M NaCl、1mM EDTA、0.5% NP-40]で4回洗浄した。沈殿タンパク質を300 µlの0.2Mグリシン(pH2.5)でLaemlli緩衝液に輸出し、10%SDSポリアクリルアミドゲルで分離した。ゲルを次いで銀で染色した。

【0088】

実施例7 - 質量分析によるSTAP1関連タンパク質の分析。

SDS-PAGE分離タンパク質を、Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Anal. Chem., 68:850-858に記載のように、実施例6のゲルから切除し、DTTで還元し、ヨードアセトアミドでアルキル化し、トリプシンで開裂した。切除したトリプティックペプチドを5%ギ酸、5%メタノールのH₂O溶液で、1 µl Poros P20カラムで脱塩し、1 µlに5%ギ酸、50%メタノールのH₂O溶液と共に、直接ナノエレクトロスプレーイオン化(NanoESI)針中に濃縮する。NanoESI質量分析(MS)は、Wilm, M. and Mann, M. (1996) Anal

. Chem., 68:1-8の公開されている方法にしたがって行なった。マスマスペクトルは、NanoESI源(Protana, Odense, Denmark)を備えたAPI 300マスマスペクトロメーター(PE Sciex, Toronto, Ontario, Canada)に獲得した。またW. R. Pearson & D. J. Lipman (1998) PNAS, 85:2444-2448参照。

【0089】

STAP1含有複合体は、多数の、約20程度のタンパク質を含むことが判明している。STAP1のみならず、複合体はまたTIP48、TIP49(二つの進化的に保存されたATPaseおよびDNAヘリカーゼ)、RPB5(RNA pol IIサブユニット5)、RMP1(RNA pol IIメディエータータンパク質)および少なくとも3個の他の現在未知のタンパク質を含むことが判明している。

【0090】

実施例8 - スクロース密度勾配遠心およびウェスタン・プロテイングによるSTAP含有複合体の分析。

粗HeLa細胞抽出物を5-30%および10-30%(w/v)密度遠心に付した。サンプルを、10mMトリス(pH7.5)、250mM NaCl、0.5%NP40、1mM DTT、バナジウム酸ナトリウム、PMSFおよびアプロチニンから成るTNN緩衝液に充填した。緩衝液はまたスクリース勾配でも使用したが、NP40は除いた。

【0091】

フラクションの各々をサンプル緩衝液と混合し、標準Laemlli変性SDS-PAGEで12%で付した。多数のゲルを流し、ついで各々を抗体とプロットした。RMP1およびTIP49に対するポリクローナルを、RPB5、TIP48、STAP1およびSkp2に対するモノクローナルのように使用した。プロットしたゲルのレーンをその各々のシュクロースフラクションで配置し、明らかになるのは、STAP1含有複合体の成分が明らかに互いに会合し、勾配におけるタンパク質の主ピークの部分ではないことである。複合体の成分は、全て、高分子量タンパク質沈殿物の早い溶出フラクションに全て見られる。Skp2はSTAP1含有複合体と比較して勾配において異なるパターンを有し、タンパク質

の主ピークの直前にピークである。

【0092】

また最初に記載されたのは、どのようにTIP49抗体がSDS-PAGE上でのダブレットを認識するかである。わずかに高い分子量の免疫学的に関連したTIP49変異体がある。

【0093】

実施例9 - STAP1関連DNAヘリカーゼ複合体の阻害剤である、抗癌剤のスクリーニング。

STAP1含有TIP49、TIP48、RPB5、RMP1、STAP1およびSkp2の成分の間の特異的相互作用を破壊する小分子化合物が、例えば、抗癌剤と推定される。複合体の成分タンパク質は、組換えバキュロウイルスを使用してSf9昆虫細胞に発現する。複合体のサブユニットの間のペアを成す相互作用の全ての可能な組合せを構築し、合成および天然化合物のスクリーニングに使用する。実際には、昆虫細胞の共感染、続く適当な抗体での免疫沈降は、スクリーニングアッセイに使用する複合体基質を提供する。上記の成分の二つの間の共免疫沈降は、直接相互作用を示し、したがって、推定される抗癌剤による相互作用の破壊の標的である。例えば、STAP1およびSkp2は、このシステムで共発現されたときに共免疫沈降し、何らかの方法でその結合を破壊する号し得または天然化合物のスクリーニングアッセイの基盤として適当な結合対を提供する。小分子化合物をスクリーニングするために、組換えヘキサヒスチジン-標識STAP1を昆虫細胞から精製し、ニッケル被覆96ウェルプレートの表面に固定する。固定化STAP1を精製ビオチニル化Skp2とインキュベートし、洗浄する。続いて、ユーロピウム標識ストレプトアビジンを添加する。ついで、ユーロピウムの時間分解蛍光を合成化学ライブラリーおよび天然生成物の非存在下または存在下で追跡する。

【0094】

実施例10 - TIP48および/またはTIP49 ATPase活性の阻害剤である抗癌剤のスクリーニング。

組換えTIP48およびTIP49を、Makino Y et al (1999) J Biol. Chem

. 274:15329-15335に記載の実験法を使用して、E. coliに発現させる。組換えTIP48およびTIP49の精製、ならびにATPase活性およびDNAヘリカーゼ活性のアッセイは、またMakino Y et al (1999)に記載されている。精製組換えタンパク質を使用して、TIP48および/またはTIP49の正常酵素活性を干渉する天然生成物または合成化合物をスクリーニングする。

【0095】

スクリーニングアッセイは、簡便にはマイクロタイタープレートで行なう。TIP48および/またはTIP49タンパク質をウェルに入れ、一方または両方の酵素アッセイを天然または合成化学ライブラリー由来の化合物の存在下または非存在下で行なう。有利には、ATPaseマイクロアッセイ形式を、Henkel R D et al (1988) Anal. Biochem. 169:312-318に記載のように使用できる。

【0096】

本明細書および2000年5月12日出願の優先権主張出願GB0011439.7に記載の全ての引用文献は、個々に言及したのと同程度に出典明示により本明細書に包含させる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 STAP1の核酸配列(配列番号2)を示す。

【図2】 STAP1の誘導されるアミノ酸配列(配列番号1)を示す。

【図3】 STAP1の他のヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。

【図4】 STAP1の他のヌクレオチド配列(配列番号4)を示す。

【图1】

J1: AF083242 . Homo sapiens HSPC0...[gi:5106778]

Protein, Related Sequences

LOCUS AF083242 726 bp mRNA PRI 21-JUN-1999
 DEFINITION Homo sapiens HSPC024-iso mRNA, complete cds.
 ACCESSION AF083242
 VERSION AF083242.1 GI:5106778
 KEYWORDS FLI_CDNA.
 SOURCE human.
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 726)
 AUTHORS Zhou,J., Ye,M., Fu,G., Zhang,Q., Shen,Y., Huang,Q., Xu,S., He,K.,
 Chen,S., Mao,M. and Chen,Z.
 TITLE Human HSPC024-iso gene, complete cds
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 726)
 AUTHORS Zhou,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-AUG-1998) Shanghai Second Medical University, Rui-Ji
 Hospital, Shanghai Institute of Hematology, 197, Rui-Jin Road II,
 Shanghai, P. R. China, 200025
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..726
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /cell_type="CD34+"
 CDS
 156..665
 /codon_start=1
 /product="HSPC024-iso"
 /protein_id="A039840.1"
 /db_xref="GI:5106778"
 /translation="MVPFLPTPQEPIMATPPKRRAVEATGKVLRYETFFISDVLQRI
 RKVLDHRDKVYEQIAXYQLRNVIERLQEAHSELYMQVDLGCNFFVDTVVVDTSRV
 VALGYGFFLELTLAEALKFIDRKSLLTELSNSLTKDSMNIKAHIHMLLEGLRELQ
 QNFPEKPHH"
 BASE COUNT 193 a 186 c 198 g 149 t
 ORIGIN
 1 ggaggtaaag gccgcgcttg ggtgtccctg ggtggtcggg tccccgagtt gggaggggcg
 61 gaaggctgaa cctccagctt gagccggaca agccgattcc cagcgttgag agggtagaga
 121 tgaactgtgt gtgaggccaa actggatcgg tcaacatggt ctccccctc cccactcccc
 181 aggagcccat catggcgacg ccccctaagc ggcggcggg ggagggcacg ggggagaaag
 241 tgctgcgcta cgagacctt atcagtacg tgctgcagcg gacttgca aaggtgctgg
 301 accatcgaga caaggtatat gagcagctgg ccaaatacct tcaactgaga aatgtcattg
 361 agcgactcca ggaagctaag cactcggagt tatatatgca ggtggatttg gctgtaact
 421 tcttcggtga cacagtggc ccagatactt cagcatcta tgtggcctg gyatatggtt
 481 ttttcctgga gttgacactg gcagaagctc tcaagttcat tgatcgttag agctctctc
 541 tcacagagct cagcaacagc ctcaccaagg actccatgaa tatcaaagcc catatccaca
 601 tgttgctaga ggggcttaga gaactacaag gctgcagaa tttccagag aagcctcacc
 661 attgacttct tcccccatc ctcagacatt aaagagcctg aaaaaaaaa aaaaaaaaa
 721 aaaaaa

//

FIGURE 1

(31)

```
Program:          blastp
Database:         nrncrc
Number:           5083
e-mail:
Format:           plain_text
Sequence:
MATEPKRRAVEATGKVKLRYEYTFISDVLDQRDLKRVLDHRDKVYEQLAQYLQLRNVLERLQBAKHSLEYMÖV
DLGCNFFVD
TVVFDTSRITYVALGYGFLELLPLAEALKFIDKSSLLPELSNSLWYDSVNTKAHIMLLEGLREHÖGLÖNF
PEKPHH
```

FIGURE 2

【 2 】

```

Program:          blastn
Database:         dbest
Number:          5571
e-mail:
Format:          plain_text
Sequence:
ctgaggagcccatcatggcgagcgcgccctttaaaccgcccccgggtgagggccacgggggagaaagtctgccc
TACGAGACC

TTCATTCAGTGAAGTGTGTGCAAGCCGGACTTTCGAAAGGTTGCTGGAACATCGAGACAGGTATATGAGCAGCT
GGCCAAAT
A

CCTTCACTGAGAAATGTCATTGAGCGACTTCAGGAAGCTTAAACAATCGGAGTTATATATGCAAGTGCATT
TGGGCTGT
A

ACTTCTTCGTGACACAGTGTGCCAGATATTTCAAGCATATGTGSCCTGGGATATGTTTTTCCITG
GAGTTGAC
A

CTGGCAGAAGCTTCTCAAGTTTCATTTGATTCGTAAGAGCTTCTCTGACAGAGCTCAGACAGCCCTCACAA
GGACTCCA
T

GAATATCAAAAGCCCATATTCACATGTTGCTAGAGCGGCTTAAAGACTACAAAGCCCTGCAATTTCCCAg
AgAAgCCCT
C

ACCATTTGACTTCTTCCCCCATCTCAGACATTAAGAAGCTTGAATAAAAAA
AA

```

【 3 】

FIGURE 3

```

equenced p18.new -> List
NA sequence      553 b.p.      ctgagagagccca ... AAAAAAAAAA linear
1 ctgagagagcc c|atc|atg|q|c|q| ACC|CCCC|CCT|A AG|CG|GG|CG|GG|GC G|GT|G|A|G|G|CC 100
101 GCGG|G|A|C|T|T|G CG|A|A|A|G|G|T|G C|T|G|A|C|C|A|T|G AG|A|C|A|A|G|T|A T|T|G|A|G|C|A|G|C 200
201 AAG|C|A|C|T|G|G A|G|T|T|A|T|A|T|T G|C|A|G|G|T|G|G|A|T T|T|G|G|G|C|T|G|T|A A|C|T|T|C|T|G|T| 300
301 G|T|T|T|T|T|C|C|T G|G|A|G|T|T|G|A|C A|C|A|T|G|T|G|C|T|T AG|A|G|G|G|G|C|T|T A|G|A|G|A|C|T|A|C 400
401 G|A|T|A|T|G|A|A G|C|C|C|A|T|A|T|C A|C|A|T|G|T|G|C|T|T AG|A|G|G|G|G|C|T|T A|G|A|G|A|C|T|A|C 500
501 A|T|C|C|T|C|A|G|A|C A|T|T|A|A|G|A|G|A|C C|T|G|A|A|T|G|C|C|T T|T|G|A|A|A|A|A|A A|A|A|A|A|A|A|A|A 553
      | 10      | 20      | 30      | 40      | 50      | 60      | 70      | 80      | 90      | 100

```

FIGURE 4

【 4 】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 01/05403
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C07K16/30 A61K31/7088 A61P35/00 C07K16/32		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) INSPEC, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	MATTHIAS GSTAIGER ET AL.: "Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 98, no. 9, 24 April 2001 (2001-04-24), pages 5043-5048, XP002180864 the whole document	1-32
X	US 5 972 654 A (CORLEY NEIL C ET AL) 26 October 1999 (1999-10-26) the whole document	20-22
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2001		Date of mailing of the international search report 05/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Döpfer, K-P

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/05403

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DORJSUREN, D. ET AL.: "RMP, a Novel Polymerase II Subunit 5-Interacting Protein, Counteracts Transactivation by Hepatitis B Virus X Protein" MOL. CELL. BIOL., vol. 18, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 7546-7555, XP002180865 cited in the application -----	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 23 and 27 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Present claim 1 relates to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many options and possible permutations that a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear, namely complexes comprising STAPI with a MW < 18kD and other proteins.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 01/05403

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5972654 A	26-10-1999	US 6037163 A	14-03-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 0 7 K	14/82	C 0 7 K	16/32	4 C 0 8 4
	16/32	C 1 2 N	9/16	Z 4 C 0 8 6
C 1 2 N	9/16	C 1 2 P	21/08	4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/08	C 1 2 Q	1/34	
C 1 2 Q	1/34	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50		33/53	D
	33/53		33/574	Z
	33/574	C 1 2 N	15/00	Z N A A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C O , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E C , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(71)出願人	Novartis Forschungs stiftung Zweigniede rlassung Friedrich Miescher Institute for Biomedical Rese arch			
(72)発明者	マティアス・ゲオルク・クリスティアン・ グスタイガー スイス、ツェーハー - 4054パーゼル、ビル ジッヒシュトラーセ127番			
(72)発明者	ヴィルヘルム・クレック スイス、ツェーハー - 4125リーヘン、エル レンシュトレスヒェン73番			

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03
4B024 AA01 AA11 BA36 BA80 DA02
EA02 EA04 GA11 HA12
4B050 CC07 DD07 LL03
4B063 QA20 QQ79 QR10 QR56 QS02
QS33 QX02 QX07
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA05
4C084 AA07 AA13 AA17 NA14 ZB262
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01
MA04 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40
DA75 DA76 EA28 EA51 FA72
FA74

专利名称(译)	用于筛选抗癌剂的蛋白质复合物和测定法		
公开(公告)号	JP2003532405A	公开(公告)日	2003-11-05
申请号	JP2001582378	申请日	2001-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯研究基金会弗里德里克·米谢尔生物医学研究所		
申请(专利权)人(译)	诺华公司·フォルシュングスシュティフトゥング·ツヴァイクニーダーラッスング·フリードリッヒ·寛松谢·安装的红茶トゥート·米面、生物医药ー		
[标]发明人	マティアスゲオルククリスティアングスタイガー ヴィルヘルムクレック		
发明人	マティアス·ゲオルク·クリスティアン·グスタイガー ヴィルヘルム·クレック		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K31/711 A61K31/7125 A61K35/12 A61K35/64 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14 /47 C07K14/82 C07K16/18 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12N9/00 C12N9 /16 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/25 C12Q1/34 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47 G01N33/574		
FI分类号	A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 C12N9/16.Z C12P21/08 C12Q1/34 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/574.Z C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/BA80 4B024 /DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B050/CC07 4B050/DD07 4B050/LL03 4B063/QA20 4B063/QQ79 4B063/QR10 4B063/QR56 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QX02 4B063 /QX07 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086 /MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2000011439 2000-05-12 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

含Skp2结合蛋白 (STAP1) 的蛋白复合物可用于鉴定抗癌药。 还提供了用作使用该方法鉴定的治疗剂的药剂。