

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4560616号
(P4560616)

(45) 発行日 平成22年10月13日(2010.10.13)

(24) 登録日 平成22年8月6日(2010.8.6)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
C O 7 K	14/47 (2006.01)	C O 7 K	14/47
C O 7 K	7/06 (2006.01)	C O 7 K	7/06
C O 7 K	7/08 (2006.01)	C O 7 K	7/08

請求項の数 10 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-536013
 (86) (22) 出願日 平成10年2月18日(1998.2.18)
 (65) 公表番号 特表2001-512319(P2001-512319A)
 (43) 公表日 平成13年8月21日(2001.8.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/003163
 (87) 国際公開番号 W01998/036070
 (87) 国際公開日 平成10年8月20日(1998.8.20)
 審査請求日 平成17年1月31日(2005.1.31)
 (31) 優先権主張番号 08/802,322
 (32) 優先日 平成9年2月18日(1997.2.18)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 509307635
 セルジーン コーポレイション
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
 901, サミット, モリス アベニュー
 86
 (73) 特許権者 504303573
 イッサム リサーチ ディベロプメント
 カンパニー オブ ザ ヘブリュー ユニ
 バーシティ オブ エルサレム リミテッ
 ド
 イスラエル国 91390 エルサレム,
 ピー.オー. ボックス 39135,
 ギヴァット ラム, エドモンド ジュ
 イ. サフラ キャンパス, ハイ テッ
 ク パーク

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞のNF-κB活性化を調節するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

I B および/または I B の E 3 依存性ユビキチン化を調節する因子を同定する方法であって、該方法は：

(a) 候補因子を、I B ポリペプチドおよび細胞抽出物とインキュベートする工程であって、ここで該インキュベートする工程は、I B ポリペプチドのリン酸化およびリン酸化 I B ポリペプチドと NF - B とを含む複合体の形成を可能にするに十分な条件下および時間の間実施され；および

(b) 次いで、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 または配列番号 9 のアミノ酸配列からなるポリペプチドによるユビキチン化の阻害と、該候補因子によるユビキチン化の阻害とを比較して該候補因子の、該複合体のユビキチン化を調節する能力を測定し、そしてそれから I B および/または I B のユビキチン化を調節する因子を同定する工程であって、該ポリペプチドのセリンの各々がリン酸化されたものである、工程を包含する方法。

【請求項2】

前記因子がペプチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記ペプチドが、E 3 ユビキチンリガーゼの認識ドメインを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

I B および/または I B の E 3 依存性ユビキチン化を調節する因子であって、該因子は、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 または配列番号 1 の残基 21 - 41 のアミノ酸配列からなるペプチドであって、該ペプチドのセリンの各々がリン酸化されたものである、因子。

【請求項 5】

前記因子が、E 3 ユビキチンリガーゼの認識ドメインを含む、請求項 4 に記載の因子。

【請求項 6】

請求項 4 または 5 に記載の少なくとも 1 つの因子をコードする、単離された DNA 分子。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の DNA 分子を含む、組換え発現ベクター。

10

【請求項 8】

請求項 7 に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた、宿主細胞。

【請求項 9】

前記宿主細胞が、細菌、酵母、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞および哺乳動物細胞からなる群から選択される、請求項 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

I B および/または I B の E 3 依存性ユビキチン化を調節する、請求項 4 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の因子を、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて含む、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

20

技術分野

本発明は、一般に、核因子 B (NF- κ B) の活性化を調節する組成物および方法に関する。より詳細には、本発明は、リン酸化 I B および/または I B のユビキチン化を調節する因子、このような因子を同定する方法、および NF- κ B 活性化と関連する疾患を処置する方法に関する。本発明に含まれる調節因子は、E 3 ユビキチンリガーゼの認識ドメインを含むペプチドを含む。

発明の背景

NF- κ B は、インターロイキン 1、インターロイキン 8、腫瘍壊死因子および特定の細胞接着分子を含む、免疫、炎症性および急性相応答遺伝子で観察される高度に特異的なパターンの遺伝子発現で中心的役割を果たす転写因子である。転写アクチベーターの RelB ファミリーの他のメンバーのように、NF- κ B は、大部分の細胞型の細胞質中で不活性形態で隔離されている。マイトゲン、サイトカイン、抗原、ストレス誘導剤、UV 光および生体タンパク質を含む種々の細胞外刺激は、最終的には NF- κ B 放出および活性化を導くシグナル伝達経路を開始する。

30

NF- κ B 活性化の重要なモジュレーターは、インヒボで NF- κ B と会合（そしてそれによってこれを不活性化）インヒビタータンパク質 I B および I B (本明細書で I B と呼ぶ) である。NF- κ B の活性化および核移行は、シグナルで誘導される I B のリン酸化の後で起こり、これは、ユビキチン経路を経由するタンパク質分解に至る。I B についていえば、刺激で誘導されたセリン 32 および 36 におけるリン酸化は、このインヒビターを、リジン 21 および 22 におけるユビキチン化の標的にし、その結果分解する。同様に、セリン 19 および 23 における I B のリン酸化は、このインヒビターを、リジン 9 におけるユビキチン化の標的にする。しかし、ユビキチン系により認識される I B の部位、および I B 認識を仲介するユビキチン系の成分のいずれも同定されていない。

40

ユビキチン経路を経由するタンパク質の分解は、以下の 2 つの別個の連続的な工程により進行する：(a) 複数ユビキチン分子のタンパク質基質への共有結合、および (b) 26S プロテオソーム複合体の標的となるタンパク質の分解である。ユビキチン経路は、協調し、かつ階層的な様式で作用するいくつかの成分からなる（レビューのために、Ciechanover, Cell 79:13, 1994; Hochstrasser, Curr. Op. Cell. Biol. 7:215, 1995; Jentsch および Schlenker, Cell 82:881, 1995; Deshaies, Trends Cell Biol. 5:428, 1995 を参照のこと）。

50

1つのこのような成分、単一のE1酵素は、ユビキチンの活性化を実施する。E2酵素のいくつかの主要な種が、哺乳動物細胞、植物および酵母で特徴付けられている。E2酵素は、おそらく、リガーゼE3に結合し(ReissおよびHersko、J.Biol.Chem.265:3685、1990;Dohmenら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7351、1991)、そして各E2酵素は、1つ以上のE3タンパク質とともに作用し得るようである(Nuberら、J.Biol.Chem.271:2795、1996;Orrianら、J.Biol.Chem.270:21707、1995;Stancovskiら、Mol.Cell.Biol.15:7106、1995;Gonenら、J.Biol.Chem.271:302、1996)。

ほんのわずかのE3酵素(ユビキチンリガーゼ)が記載されている。哺乳動物E3(酵母におけるUBR1)およびE3は、タンパク質基質の遊離のN末端アミノ酸残基を介してそれらを認識する(「N末端規則」;Varshavsky、Cell 69:725、1992;HershkoおよびCiechanover、Ann.Rev.Biochem.61:761、1992)。Cdc53は、おそらく、リン酸化G1サイクリンを標的にする際に関与するE3である(Willemsら、Cell 86:453、1996)。E6-APは、p53の認識に関与し(Scheffnerら、Cell 75:495、1993)、そして一連の特有のE6-AP相同タンパク質が同定されている(Huibregtseら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:2563、1995);Nedd4は、上皮Na⁺チャンネルの分解に関与し(Staubら、EMBO J.15:2371、1996)、そしてRSP5(NIP1)は、パーミアーゼGap1およびFur1をタグ化することに関与し(Heinら、Mol.Microbiol.18:77、1995)、その一方、PUB1は、Cdc25を標的にする(NefskyおよびBeach、EMBO J.15:1301、1996)。最近単離されたいくつかのその他のE3酵素は、筋肉タンパク質のサブセットであるc-Fosの分解に、およびNF- κ Bの前駆体であるp105のプロセッシングに関与するよう

である(Orrianら、J.Biol.Chem.270:21707、1995;Stancovskiら、Mol.Cell.Biol.15:7106、1995;Gonenら、J.Biol.Chem.271:302、1996)。従って、リガーゼ類は、大きな、大部分が解明されていない酵素のファミリーを示すようであり、「N末端規則」リガーゼ(E3およびE3)の認識の様式を除いて、ユビキチン系のすべてのその他の既知の基質の認識モチーフは同定されていない。

発明の要旨

簡単に述べれば、本発明は、リン酸化I κ Bおよび/またはI κ Bのユビキチン化を調節することにより核因子 κ B(NF- κ B)の活性化を調節する組成物および方法を提供する。1つの局面では、本発明は、インビボでユビキチン化を行うI κ Bポリペプチドの能力をアッセイする方法を提供し、この方法は、(a)I κ Bポリペプチドを細胞抽出物とインキュベートする工程であって、ここで該インキュベートする工程は、I κ Bポリペプチドのリン酸化およびリン酸化I κ BポリペプチドとNF- κ Bとを含む複合体の形成を可能にするに十分な条件下および時間の間実施され; (b)次いで該複合体をインビトロユビキチン化に供する工程; および(c)次いで該複合体のユビキチン化の程度を評価し、そしてそれによってI κ Bポリペプチドがインビボでユビキチン化を行う能力をアッセイする工程、を包含する。

別の局面では、I κ Bおよび/またはI κ Bのユビキチン化を調節する因子を同定する方法が提供され、この方法は、(a)候補因子を、I κ Bポリペプチドおよび細胞抽出物とインキュベートする工程であって、ここで該インキュベートする工程は、I κ Bポリペプチドのリン酸化およびリン酸化I κ BポリペプチドとNF- κ Bとを含む複合体の形成を可能にするに十分な条件下および時間の間実施され; および(b)次いで該複合体のユビキチン化を調節する候補因子の能力を測定し、そしてそれからI κ Bおよび/またはI κ Bのユビキチン化を調節する因子を同定する工程を包含する。

本発明はまた、I κ Bおよび/またはI κ Bのユビキチン化を調節する因子を提供する。このような因子は、E3ユビキチンリガーゼの認識ドメインを含むペプチドを含み、例えば、配列番号5~配列番号9に記載のペプチドを包含する。ペプチド因子をコードす

10

20

30

40

50

る、単離されたDNA分子および組換え発現ベクター、ならびにこのような発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞もまた提供する。

別の局面では、本発明は、I B および/またはI B のユビキチン化を調節する1つ以上の因子を、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせる含む、薬学的組成物を提供する。

本発明はまた、さらなる局面で、患者におけるNF - B活性を調節する方法、およびNF - B活性化に関連する障害をもつ患者を処置する方法を提供し、これらの方法は、患者に上記の薬学的組成物を投与する工程を包含する。NF - B活性化に関連する障害には、炎症性疾患、自己免疫疾患、癌およびウイルス感染が包含される。

本発明のこれらおよびその他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照すれば明らかになる。本明細書に開示されるすべての参考文献は、各々が個々に援用されるように、それらの全体が参考として本明細書に援用される。

【図面の簡単な説明】

図1 A ~ 1 Dは、代表的な調節因子の存在下および非存在下で実施されたユビキチン化アッセイのSDS - PAGE分析の結果を示すオートラジオグラムである。他に示されていなければ、基質は、リン酸化され、そしてNF - Bが複合会合した、³⁵S標識、HAタグ化I Bポリペプチドであった。

図1 A中、レーン1は、32位および36位にアラニン残基を含むI Bポリペプチド(S32/36A; 配列番号13)のユビキチン化を示し、そしてレーン2は、非リン酸化野生型I Bポリペプチド(配列番号12)のユビキチン化を示す。レーン3 ~ 14では、ユビキチン化の基質は、野生型I B(配列番号12)であった。レーン3では、ユビキチン化は、ATPの非存在下で実施され;そしてレーン4 ~ 14では、反応は、ATP Sの存在下で、候補ペプチド調節因子とともに(レーン5 ~ 14)またはなしで(レーン4)実施された。示された候補因子は: 400 μMのc - Fosホスホペプチド(ppFos(配列番号10)、レーン5); 400 μMのセリン32、36をアラニンで置換したI Bペプチド(pp21S/A(配列番号11)、レーン6); 40 μMの二重リン酸化I Bペプチド(pp21(配列番号9、レーン7); 400 μMの非リン酸化I Bペプチド(p21(配列番号9、レーン8); 100 μMの1つのリン酸化I Bペプチド(ppS32(配列番号9、レーン9; ppS36(配列番号9)、レーン10); および40 μMの、より短い、二重リン酸化I Bペプチド(pp19(配列番号8)、レーン11); pp15(配列番号7)、レーン12; pp11(配列番号6)、レーン13; pp7(配列番号5)、レーン14)である。

図1 Bでは、ユビキチン化基質は、遊離の野生型I B(配列番号12、レーン1 ~ 3)または遊離のS32/36A置換I B(配列番号13、レーン4 ~ 6)であった。反応は、ATP Sの非存在下(レーン1および4)または存在下(レーン2、3、5および6)で実施された。40 μMの二重リン酸化I Bペプチド(pp21(配列番号9))を、レーン3および6に示された試料中の結合反応混合物に添加した。

図1 Cでは、HeLa抽出物中のバルク細胞タンパク質のユビキチン化が示される。レーン1は、ATP非存在下のユビキチン化を示し、そしてレーン5は、ATP存在下のユビキチン化を示す。レーン3 ~ 5では、以下の候補調節因子が添加された: 40 μMの二重リン酸化I Bペプチド(pp21(配列番号9)、レーン2); 400 μMのc - Fosホスホペプチド(ppFos(配列番号10)、レーン3); および400 μMの非リン酸化I Bペプチド(p21(配列番号9)、レーン4)。

図1 Dでは、ユビキチン化基質は、リン酸化(レーン2 ~ 7)または非リン酸化(レーン1)野生型I B(配列番号14)であった。反応は、ATP Sの非存在下(レーン2)または存在下(レーン1、3 ~ 7)で、かつ候補ペプチド調節因子とともに(レーン4 ~ 7)またはなしで(レーン1 ~ 3)実施された。示された候補因子は: 400 μMの二重リン酸化I Bペプチド(pp21(配列番号9)、レーン4); 400 μMのc - Fosホスホペプチド(ppFos(配列番号10)、レーン5); 40 μMの二重リン酸化I Bペプチド(pp19(配列番号8)、レーン6); および400 μMの非リ

10

20

30

40

50

ン酸化 I B ペプチド (p 2 1 (配列番号 9、レーン 7)) である。

図 2 は、刺激された He L a 細胞からの抽出物を用いて実施された、インビトロでのユビキチン依存性分解アッセイの結果を示すオートラジオグラムである。SDS - PAGE の各レーンにおいて、分解アッセイ後の、リン酸化 (上のバンド) および非リン酸化 (下のバンド) H A タグ化 I B ポリペプチド (配列番号 1 2) のレベルが示される。レーン 1 は、A T P なしで実施された分解アッセイ後のこれらのペプチドのレベルを示す。レーン 2 ~ 6 では、A T P を反応混合物中に含めた。4 0 μ M の候補調節因子が、レーン 3 ~ 6 に示される反応物に添加された：二重リン酸化 I B ペプチド (p p 2 1 (配列番号 9)、レーン 3)；二重リン酸化 I B ペプチド (p p 1 9 (配列番号 8、レーン 4)；c - F o s ホスホペプチド (p p F o s (配列番号 1 0)、レーン 5)；および非リン酸化 I B ペプチド (p 2 1 (配列番号 9、レーン 6)) である。

10

図 3 A は、調節因子カラム上で分画された He L a 細胞溶解物のフロースルー画分を用いて実施されたユビキチンアッセイの SDS - PAGE の結果を示すオートラジオグラムである。各場合において、基質は、リン酸化および NF - B 複合会合された、³⁵S 標識、H A タグ化 I B ポリペプチド (配列番号 1 2) であった。レーン 1 は、非分画抽出物を用いるユビキチン化のレベルを示す。レーン 2 ~ 9 では、抽出物は、ペプチド S e p h a r o s e^R カラム上で分画した。用いたペプチドは：c - F o s ホスホペプチド (p p F o s (配列番号 1 0)、レーン 2)；セリン 3 2、3 6 をアラニンで置換した I B ペプチド (p p 2 1 S / A (配列番号 1 1)、レーン 3)；二重リン酸化 I B ペプチド (p p 2 1 (配列番号 9、レーン 4 ~ 6)；および二重リン酸化 I B ペプチド (p p 1 9 (配列番号 8、レーン 7 ~ 9)) である。さらに、網状赤血球画分 II (1 6 0 μ g) を、レーン 5 および 8 に示されるユビキチン化反応物に添加し、そして画分 I (1 6 0 μ g) を、レーン 6 および 9 中の反応物に添加した。

20

図 3 B は、He L a 抽出物中のバルク細胞タンパク質のユビキチン化を示すオートラジオグラムである。レーン 1 は、A T P 非存在下のユビキチン化を示し、そしてレーン 2 は、A T P 存在下のユビキチン化を示し、しかし、候補調節因子なしである。レーン 3 ~ 6 では、以下の候補調節因子が添加された：4 0 μ M の二重リン酸化 I B ペプチド (p p 1 9 (配列番号 8)、レーン 3)；4 0 0 μ M の c - F o s ホスホペプチド (p p F o s (配列番号 1 0)、レーン 4)；4 0 0 μ M のセリン 3 2、3 6 をアラニンで置換した I B ペプチド (p p 2 1 S / A (配列番号 1 1)、レーン 5)；および 4 0 μ M の二重リン酸化 I B ペプチド (p p 2 1 (配列番号 9、レーン 6))。

30

図 4 A ~ 4 F は、核 NF - B 移行に対する候補調節因子の影響を示す顕微鏡写真である。図 4 A ~ 4 C では、p p 2 1 (図 4 A および 4 B) または p p F o s (図 4 C) が、He L a 細胞の細胞質にマイクロインジェクトされた。次いで細胞を、即座に TNF で活性化し、そして抗 p 6 5 抗体で免疫染色した。図 4 D ~ F では、p p 2 1 (図 4 D) または p p F o s (図 4 F) が、ヒト血管内皮細胞 (H U V E C) の細胞質に注入された。次いで細胞を、即座に TNF で活性化し、そして抗 E セレクチン抗体で免疫染色した。図 4 E は、図 4 D の位相差写真である。各顕微鏡写真において、注入された細胞は大きな矢印で記されている。図 4 D および 4 E では、小矢印によって、注入されていない E セレクチンネガティブ細胞が記されている。

40

図 4 G および 4 H は、図 4 A ~ 4 F に示されるマイクロインジェクション実験の要約を示すグラフである。図 4 G には、核 p 6 5 染色を示す He L a 細胞のパーセントが示される。9 0 および 4 2 細胞は、それぞれ p p 2 1 および p p F o s でマイクロインジェクトされた。図 4 H は、E セレクチン染色を示す H U V E C のパーセントを示す。1 6 0 および 3 6 細胞は、それぞれ、p p 2 1 および p p F o s でマイクロインジェクトされた。各グラフについて、カラム 1 は、候補調節因子および TNF 活性化の非存在下でのレベルを示す。カラム 2 ~ 4 は、候補調節因子の非存在下 (カラム 2)、p p 2 1 の存在下 (カラム 3) または p p F o s の存在下 (カラム 4) の TNF 活性化後のレベルを示す。

発明の詳細な説明

上記の通り、本発明は一般的に、核因子 B (NF - B) の活性化の調節およびこのような

50

活性化に関連する疾患の処置に有用な組成物および方法に関する。特に、本発明は、リン酸化I B(すなわち、I B および/またはI B)のユビキチン化を調節する因子、ならびにそのような因子の同定の方法に関する。

刺激に応答して、NF- Bと会合したI Bは活性化され(すなわち、リン酸化され)、そしてI Bを分解の標的とし、それによってNF- Bを遊離および活性化する。本発明の状況において、リン酸化され、そしてNF- Bと会合したI Bは、特異的なユビキチンリガーゼE3により認識されることが見出されている。I B およびI B 間で機能的に保存されているN末端シグナル誘導リン酸化部位は、E3認識モチーフを構成し、そして近傍のユビキチン化部位と異なる。このモチーフに対応するペプチドおよびその改変体は、I Bのユビキチン化およびそれに続く分解を阻害し、そしてそのようなペプチドは本発明の範囲中の調節因子である。

10

1つの局面において、本発明は、インビボでのI B のユビキチン化を高い忠実度で再現するインビトロでのユビキチン化アッセイを提供する。インビボにおいて、I Bはセリン32およびセリン36のリン酸化による分解の標識となり、その一方で、32位と36位にアラニン残基を含有するI B の改変形態は、ユビキチン結合に供されない。同様に、セリン19およびセリン23のリン酸化は、I B のユビキチン化に必要とされる。しかし、遊離I Bは、ユビキチン系により非差別的様式で認識される(すなわち、リン酸化は必要とされない)。本明細書中で提供されるユビキチン化アッセイは、インビボにおいて観察される調節に対応するI Bユビキチン化の調節を可能とする。

本明細書中に記載されるユビキチン化アッセイに使用されるI Bポリペプチドは、ネイティブヒトI B (配列番号1)あるいはネイティブヒトI B (配列番号3)であり得、またはネイティブタンパク質の改変体であり得る。本明細書中で使用するように、改変体は、1つ以上の置換および/または改変を含有するポリペプチドである。改変体としては、短縮型ポリペプチドおよびポリペプチドの活性に最小の影響を有するさらなるアミノ酸配列を含有するポリペプチドが挙げられる。特に、改変体は、さらなるアミノ酸配列をアミノ末端および/またはカルボキシル末端に含有し得る。このような配列は、例えば、ポリペプチドの精製または検出を容易にするために、使用され得る。I Bのポリペプチド改変体は、本明細書中に記載するようなユビキチン化アッセイにおいてリン酸化およびユビキチン化される改変体の能力が、実質的に減少しないように、改変される。好ましくは、I Bポリペプチドは標識される。例えば、標準的な技術を用い、³⁵Sメチオニン存在下で、³⁵Sは、ポリペプチドのインビトロ翻訳によってI Bポリペプチド中に取り込まれ得る。

20

30

I Bポリペプチドは、一般的に、培養宿主細胞中のDNAの発現により、またはコムギ胚抽出物のようなインビトロ系を用いた翻訳により、ポリペプチドをコードするDNAから調製され得る。宿主細胞が用いられる場合、そのような細胞は、好ましくは、細菌、酵母、バキュロウイルス感染昆虫細胞または哺乳動物細胞である。組換えDNAは、当業者にとって周知である技術を用い、宿主細胞中での使用に適切な任意の発現ベクター中にクローン化され得る。ポリペプチドのインビトロ翻訳は、一般的に製造者の指示に従い、実施され得る。

この様式で発現されるDNA配列は、ネイティブI B あるいはI B をコードし得るか、またはこのDNA配列は、ネイティブI Bの一部あるいは改変体をコードし得る。改変体をコードするDNA分子は、一般的に、オリゴヌクレオチド指向性部位特異的変異誘発のような、標準的な変異誘発技術を用い調製され得る。あるいは、DNA配列のセクションはまた、短縮型ポリペプチドの調製を可能とするために除去され得、そして「タグ」のようなさらなる配列をコードするDNAは、DNA分子の5'または3'末端に付加され得る。例えば、I BポリペプチドをコードするDNAはまた、組換えタンパク質がN末端またはC末端にエピトープを含むように、エピトープをコードし得る。グルタチオン-Sトランスフェラーゼタンパク質(GST)、HA(赤血球凝集素)-タグ、FLAGおよびヒスチジン-タグのようなエピトープは、当業者に周知の技術を用い、付加され得る。

40

発現されたI Bポリペプチドは、インビトロ翻訳に続く精製をせずに用いられ得る。ある

50

いは、ポリペプチドは、実質的に純粋な形態で単離され得る。I Bポリペプチドは少なくとも80重量%の純度で単離され得、好ましくは、少なくとも95重量%の純度、より好ましくは、少なくとも99重量%の純度で単離され得る。一般的に、このような精製は、例えば、本明細書中に記載した代表的な精製方法または、硫酸分画、SDS-PAGE電気泳動、およびアフィニティークロマトグラフィーの標準的な技術を用い達成され得る。

本明細書中に提供したユビキチン化アッセイにおいて、刺激し、または刺激しないJurkat細胞、HeLa細胞、THP-1細胞、または内皮細胞由来の細胞抽出物は、インビトロにおいて、ATPおよびホスファターゼインヒビターのオカダ酸の存在下でI Bポリペプチドとインキュベートされる。細胞抽出物は、一般的に、Alkalayら、(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:10599,1995)の方法に従い調製され得る。インキュベーションは、I Bポリペプチドのリン酸化(I B およびその改変体についてはセリン32およびセリン36)およびリン酸化ポリペプチド(pI B)と細胞由来NF- B複合体との会合を生ずるのに十分な条件下で行われる。例えば、I Bポリペプチドは、HeLa細胞抽出物またはJurkat細胞抽出物、ATPならびにオカダ酸とインキュベートされ得る。90分、30 でのインキュベーションは、一般的に、I Bポリペプチドのリン酸化を可能とするのに十分である。このインキュベーションに続き、pI B/NF- B複合体は、例えば、抗p65抗体により免疫精製され得、そして、Alkalayら、(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:10599,1995)が記載したように、無細胞系でのインビトロユビキチン化に供され得る。次に、ユビキチン化のレベルは、SDS-PAGEとそれに続くオートラジオグラフィーの周知の技術を用い、評価され得る。

これらの条件下において、ATP Sの存在下で、野生型³⁵S-pI B ポリペプチドは、多重にユビキチン化された種を産生する(図1A、レーン4を参照)。I B の³⁵S標識されたS32/36A変異体(レーン1)も非リン酸化野生型³⁵S-I B (レーン2)もユビキチン化されない。しかし、遊離型変異体I B あるいは遊離型野生型I B のいずれも、容易に結合する(図1B)。同様に、I B の遊離型(しかし、複合体に会合していない)リジン21、22変異体は、インビトロでユビキチン化され得る。従って、遊離型I Bポリペプチドを用い行われるユビキチン化アッセイと異なり、本明細書中で提供されるユビキチン化アッセイは、複合体に会合し適切にリン酸化されたI Bポリペプチドのみを標的とする。本発明の別の局面において、上記のユビキチン化アッセイは、I Bのユビキチン化を調節する因子を同定するために使用され得る。調節因子としては、抗体(例えば、モノクローナル抗体)、ペプチド、およびI B および/またはI B ポリペプチドのユビキチン化を刺激または、好ましくは、阻害する他の薬物が挙げられ得る。一般的に、このような因子は、その他の点で上記のとおり実施され得るユビキチン化反応において調節因子候補を含ませること、および因子のユビキチン化レベルへの影響を評価することにより、同定され得る。候補因子のそのようなアッセイにおける使用での適切な濃度は、一般的に、約0.1 μM~約1mMの範囲である。ペプチド候補因子について、ベスタチンのようなペプチダーゼインヒビター(40 μg/mL)もまた、加えられ得る。そして、ペプチドの量は、好ましくは、約10 μM~約1mMの範囲である。ユビキチン化のレベルに統計学的に有意な効果を生じる候補因子は、本発明により包含される調節因子である。

上記のとおり、本発明の状況において、複合体に会合したI Bは、特異的ユビキチンリガーゼE3によって認識されることが見出された。従って、本発明の範囲内の調節因子として、E3ユビキチンリガーゼの認識ドメインを含有するペプチドが挙げられるが、これに限定されない。このようなペプチドは、N末端シグナルドメイン(ネイティブI B またはI B の残基1~54)より由来し得、そして、最低限、シグナルリン酸化部位(ネイティブI B の残基32~36またはネイティブI B の残基19~23)を含有すべきである。ペプチド調節因子は、一般的に、標準的な自動合成技術を用い、または所望のペプチドをコードする組換えDNAの発現により調製され得る。このような因子は、上記のように、1つ以上の置換および/または改変のために、ネイティブI B およびI B と配列が異なり得る。ただし、ペプチド改変体は、I Bポリペプチドのユビキチン化を阻害する。

最大限の阻害のために、ペプチド調節因子はリン酸化されるべきである;好ましくは、ネイティブなリン酸化部位の両方(例えば、I B のセリン32およびセリン36)がリン酸化

10

20

30

40

50

されるか、一方がリン酸化されたペプチドも用いられ得る。リン酸化ペプチドは周知の技術により調製され得る。例えば、ホスホセリン残基は、合成中にペプチドに取り込まれ得る。あるいは、ペプチドは、合成後に標準的な技術を用いリン酸化され得る。

一般的に、ペプチド調節因子は、アミノ酸および/またはアミノ酸アナログを取り込む標準的な技術を用い調製され得る。合成中に、アミノ酸および/またはアミノ酸アナログの活性基は、必要な場合、例えば、*t*-ブチルジカルボネート (*t*-BOC) 基またはフルオレニルメトキシカルボニル (FMOC) 基を用い保護され得る。アミノ酸およびアミノ酸アナログは、市販品を購入し得る (例えば、Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtec) か、または当該分野において公知の方法を用いて合成され得る。ペプチドは固相法を用い合成され得る。固相法では、ペプチドは、4 - メチルベンズヒドリルアミン (MBHA)、4 - (オキシメチル) - フェニルアセトアミドメチル - および 4 - (ヒドロキシメチル) フェノキシメチル - コポリ (スチレン - 1%ジビニルベンゼン) (Wang樹脂) (全て市販されている)、または De Grado および Kaiser (J. Org. Chem. 47:3258, 1982) によって記述されたように合成され得る *p* - ニトロベンゾフェノンオキシムポリマー (オキシム樹脂) のような樹脂に付着される。当業者は、アミノ酸および/またはアミノ酸アナログの選択が、所望の特定の物理学的、化学的または生物学的な特徴に部分的に依存することを理解する。このような特徴は、投与方法および患者における標的位置により、部分的に決定される。

ペプチド中の反応性基の選択的改変はまた、所望の特徴を与え得る。ペプチドは、アセチル化ペプチドのように N 末端改変した化合物を得るために、まだ樹脂に付着している間に、操作され得る。または、ペプチドは、フッ化水素または同等の切断因子を用い樹脂から取り出され、そして改変され得る。合成された C 末端カルボキシル基を含む化合物 (Wang樹脂) は、樹脂からの切断後、またはいくつかの場合には溶液相合成に先立って、改変され得る。ペプチドの N 末端または C 末端を改変する方法は、当該分野において周知である。この方法としては、例えば、N 末端のアセチル化または C 末端のアミド化が挙げられる。同様に、アミノ酸側鎖またはアミノ酸アナログ側鎖を改変する方法は、ペプチド合成における当業者にとって周知である。ペプチド上に存在する反応性基に対してなされる改変の選択は、所望の特徴によって決められる。

調節因子はまた、環状ペプチドであり得る。環状ペプチドは、例えば、ペプチドの N 末端のアミノ基と C 末端のカルボキシル基との間の共有結合の形成を誘導することにより得られ得る。あるいは、環状ペプチドは、末端の反応性基と反応性アミノ酸側鎖との間、または 2 つの反応性側鎖間での共有結合の形成により得られ得る。所望の特徴に基づき環状ペプチドが選択されることは、当業者にとって明らかである。例えば、環状ペプチドは、増加した安定性、増加した可溶性、減少した免疫原性または減少したインビボクリアランスを提供し得る。

新たに合成されたペプチドは、逆相高性能液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) またはサイズもしくは電荷に基づき分離する他の方法のような方法を用い、精製され得る。さらに、精製ペプチドは、これらの方法およびアミノ酸分析および質量分析のような他の周知の方法を用いることにより、特徴づけられ得る。

ペプチド調節因子のいくつかの代表的な例は表 I に提供される。

10

20

30

表 I
代表的なペプチド調節因子

ペプチド	配列
pp7	CDS*GLDS*M
pp11	CDDRHDS*GLDS*M
pp15	CDDRHDS*GLDS*MKDEE
pp19	CERLLDDRHDS*GLDS*MKDEE
pp21	CKKERLLDDRHDS*GLDS*MKDEE

10

*は、リン酸化残基を示す。

調節因子のさらなる特徴づけは、ユビキチン依存性インビトロ分解アッセイを用いることにより、達成され得る。そのようなアッセイは、一般的には、Alkalayら (Proc.Natl.Aca d.Sci.USA 92:10599,1995) が記載したように実施され得る。このアッセイにおいて、刺激された細胞由来のpI B は、インビトロでユビキチン依存性様式で分解され、他方、同一の細胞抽出物由来の非リン酸化I B は、分解を受けない。I B のユビキチン化を阻害する調節因子はまた、このようなインビトロ分解アッセイでpI B の安定化を生ずるべきである。

20

本明細書中で記載する調節因子は、一般的に、細胞のNF- B機能を特異的に阻害するために用いられ得る。このような阻害は、一般的に、因子(例えば、約5mg/mLのペプチド因子)の適切な細胞(例えば、HeLa細胞、または初代ヒト血管内皮細胞)へのマイクロインジェクションにより示され得る。マイクロインジェクションに続き、細胞は、NF- Bの活性化を可能にするように刺激され(例えば、TNF を用い)そしてインキュベートされる。HeLa細胞において、TNF は、NF- Bの核中への迅速な核移行を誘導し、この核移行はp65 特異的抗体での染色により検出され得る。調節因子は、NF- B移行の統計学的に有意な減少を誘導し、そしてこのような移行を検出可能なレベルまで減少させ得る。

30

初代ヒト血管内皮細胞(HUVEC)は、NF- Bにより調節される接着タンパク質(例えば、ICAM-1、V-CAM-1およびEセレクトリン(Readら、Immunity 2:493,1995;Chenら、J.Immunol 155:3538,1995))の表面発現により、TNF 刺激に応答する。Eセレクトリンの発現は特にNF- B依存性であり、そしてEセレクトリンは、最初の好中球付着および活性化内皮上のローリングに主要な誘導性内皮接着分子である。刺激された細胞は、1つ以上のNF- Bに調節される接着タンパク質の発現を検出するために、固定され、そして染色され得る。調節因子のマイクロインジェクションは、そのような発現の統計学的に有意な阻害を生じるが、ICAM2のようなNF- B非依存性接着タンパク質の発現には影響しない。

調節因子はまた、患者におけるI B および/またはI B のユビキチン化を調節するのに用いられ得、それによりインビボでNF- B細胞機能を調節する。本明細書中で使用するように、「患者」は、ヒトを含む任意の哺乳動物であり得、そしてNF- Bの活性化に関連する疾患に苦しんでいてもよく、または検出可能な疾患に罹患していなくてもよい。従って、処置は現存の疾患について、または予防的なものであり得る。NF- B活性化に関連する疾患として、炎症性疾患、自己免疫疾患、ガンおよびウイルス感染が挙げられる。

40

処置とは、本明細書中に記載の調節因子の投与をいう。患者への投与について、1つ以上のこのような化合物は、一般的に、薬学的組成物として処方される。薬学的組成物は、生理学的に受容可能なキャリア(すなわち、活性成分の活性を妨害しない非毒性物質)をさらに含有する、滅菌の水溶性もしくは非水溶性溶液、懸濁液あるいはエマルジョンであり得る。当業者にとって公知である任意の適切なキャリアが、本発明の薬学的組成物に用いられ得る。代表的なキャリアとして、生理食塩水溶液、ゼラチン、水、アルコール、天然ある

50

いは合成油、糖類溶液、グリコール、オレイン酸エチルのような注射用有機エステル、またはこのような物質の組み合わせが挙げられる。必要に応じて、薬学的組成物は、さらに、保存剤および/または他の添加物（例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤および/または不活性ガス）、および/または他の活性成分を含有し得る。

あるいは、薬学的組成物は、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて、調節因子をコードするポリヌクレオチドを含有し得る（その結果、調節因子がインサイチュで産生される）。そのような薬学的組成物において、ポリヌクレオチドは、当業者に公知である任意の種々の送達系内に存在し得る。送達系としては、核酸、細菌およびウイルス発現系、ならびにリポソームを含むコロイド分散系が挙げられる。適切な核酸発現系は、患者内での発現に必要なポリヌクレオチド配列（例えば、適切なプロモーターおよびターミネーターシグナル）を含有する。DNAはまた、例えば、Ulmerら（Science 259:1745-1749, 1993）が記載したように、「裸」であり得る。

標的化された患者の細胞へ核酸配列を導入するために使用され得る種々のウイルスベクターとして、ワクシニアもしくは他のポックスウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、またはアデノウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。DNAをこのようなベクターへ組み込む技術は、当業者にとって周知である。好ましくは、レトロウイルスベクターは、マウスレトロウイルスまたはトリレトロウイルスの誘導體である。レトロウイルスとしては、モロニーマウス白血病ウイルス（MoMuLV）、ハーベイマウス肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳ガンウイルス（MuMTV）、およびラウス肉腫ウイルス（RSV）が挙げられるが、これらに限定されない。レトロウイルスベクターは、選択マーカー遺伝子（形質導入細胞の同定または選択を助けるため）および/あるいは特定の標的細胞上のレセプターについてのリガンドをコードする遺伝子（ベクターを標的的特異的にするため）をさらに導入または取り込み得る。例えば、レトロウイルスベクターは、糖、糖脂質またはタンパク質をコードするヌクレオチド配列を挿入することにより、標的的特異的とされ得る。標的化はまた、当業者に公知の方法により、抗体を用いて達成され得る。

ウイルスベクターは、代表的には、非病原性（欠損性）の、複製能力のあるウイルスであり、これは感染性のベクター粒子の産生のために補助を必要とする。この補助は、例えば、LTR内の調節配列の制御下にレトロウイルスの全ての構造遺伝子をコードするプラスミドを含有するが、パッケージング機構がカプセル化のためのRNA転写物を認識することを可能にするヌクレオチド配列を欠くヘルパー細胞株を用いることにより、提供され得る。このようなヘルパー細胞株としては、2、PA317、およびPA12が挙げられるが、これらに限定されない。このような細胞に導入されたレトロウイルスベクターは、パッケージされ得、そしてベクターピリオンを産生し得る。次に、この方法により産生されたベクターピリオンは、NIH3T3細胞のような組織細胞株への感染に用いられ、大量のキメラレトロウイルスピリオンを産生し得る。

ポリヌクレオチドのための別の標的化送達系は、コロイド分散系である。コロイド分散系としては、高分子複合体、ナノカプセル（nanocapsule）、ミクロスフェア、ビーズ、および脂質ベースの系（水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む）が挙げられる。インビトロおよびインビボでの送達ビヒクルとして用いるのに好ましいコロイド系は、リポソーム（すなわち、人工膜小胞）である。0.2~4.0 μ mのサイズ範囲の大きな単層小胞（LUV）は、大きな高分子を含有する水性緩衝液のかなりの割合をカプセル化し得ることが示されている。RNA、DNAおよびインタクトなピリオンは、水性内部にカプセル化され、そして細胞へ生物学的に活性な形態で送達され得る（Fraleyら、Trends Biochem.Sci.6:77,1981）。哺乳動物細胞に加え、リポソームは、ポリヌクレオチドの植物細胞、酵母細胞および細菌細胞への送達にも使用されてきた。リポソームが効率的な遺伝子導入ビヒクルであるために、以下の特徴が存在すべきである：（1）目的遺伝子を高効率でカプセル化するが、生物学活性を損なわない；（2）非標的細胞と比べ標的細胞への優先的および実質的な結合；（3）小胞の水性内容物の標的細胞細胞質への高効率送達；および（4）遺伝情報の正確で効果的な発現（Manninoら、Biotechniques 6:882,1988）

リポソームの標的化は、解剖学上の因子および機械論的な因子に基づき、分類され得る。解剖学上の分類は、選択性のレベルに基づき、そして例えば、器官特異的、細胞特異的、および/またはオルガネラ特異的であり得る。機械論的な標的化は、受動的であるかまたは能動的であるかに基づき区別され得る。受動的な標的化は、リポソームが、洞様毛細血管を含む器官における細網内皮系 (RES) の細胞に分布する天然の傾向を利用する。一方、能動的な標的化としては、天然に生じる局在部位以外の器官および細胞型への標的化を達成するための、リポソームと特異的なリガンド (例えば、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、またはタンパク質) の結合による、またはリポソームの組成もしくはサイズの変更によるリポソームの改変が挙げられる。

投与の経路および頻度、ならびに用量は、患者により異なる。一般的に、薬学的組成物は、静脈内に、腹腔内に、筋肉内に、皮下に、腔内にまたは経皮的に投与され得る。1 ~ 6 の間の用量が、毎日投与され得る。適切な用量は、NF- κ B活性化と関連した疾患に苦しむ患者の症状の改善を示すのに十分な量である。このような改善は、炎症応答 (例えば、浮腫、移植片拒絶、過敏症) をモニターすることにより、または疾患と関連した臨床症状の改善を通して検出され得る。一般的に、用量中に存在する調節因子の量、または用量中に存在するDNAによりインサイチュで産生される調節因子の量は、宿主1kgあたり約1 μ g ~ 約100mgの範囲である。適切な用量サイズは、患者のサイズにより異なるが、代表的には、10 ~ 60kgの動物について約10mL ~ 約500mLの範囲である。

以下の実施例は、例示のみを目的として提供され、そして限定することを意図しない。

実施例

実施例 1

ユビキチン化アッセイを使用する調節因子の同定

この実施例は、代表的なユビキチン化アッセイ、および候補調節因子を評価するためのこのようなアッセイの使用を例示する。

A. インビトロでのユビキチン化アッセイ

HAタグ化I κ B またはHAタグ化I κ B cDNA (Haskillら、Cell 65:1281-1289, 1991) を、コムギ胚芽抽出物においてインビトロで³⁵Sメチオニンの存在下で、製造業者の指示 (Promega, Madison, WI) に従って翻訳した。I κ B またはI κ B をリン酸化するために、標識したタンパク質を含有する1 μ lの抽出物を、90分間30°Cで、最終容量30 μ lを有する反応混合物 (100 μ g HeLa細胞またはJurkat細胞抽出物 (Alkalayら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10599, 1995に記載されるように調製した)、2mM ATP、および1 μ Mオカダ酸) 中でインキュベートした。このインキュベーションの間、標識したI κ Bポリペプチドを、セリン32および36においてリン酸化し、そして内因性のNF- κ B複合体に会合させた (データ示さず)。

インキュベーション後、1 μ lの抗p65血清を添加し、そしてNF- κ B免疫複合体を、Protein A-Sepharose^R に固定化し、そしてAlkalayらによって記載されるように、HeLa細胞抽出物においてインビトロでのユビキチン化に供した。ユビキチン化したタンパク質を、SDS-PAGEによって分離し、そしてオートラジオグラフィーによって可視化した。

図1Aに示すように、野生型³⁵S-pI κ Bのみが多様に (multiply) ユビキチン化した種を生成した (レーン4)。I κ Bの³⁵S標識したS32/36A変異体 (レーン1) も、非リン酸化野生型³⁵S-I κ B (レーン2) もいずれも、ユビキチン化されず、そしてpI κ Bのユビキチン化は、ATPの非存在下で観察されなかった (レーン3)。

このアッセイの生理学的な関連性を、遊離の³⁵S-I κ Bのインビトロでのユビキチン化の、複合体に会合したリン酸化基質のユビキチン化との比較によってさらに記録した。複合体に会合したS32/36A変異体が、そのインビトロでの運命に従ってユビキチン結合に供されなかったのに対し、変異体または野生型I κ Bの遊離の形態は、容易に結合した (図1B)。同様に、遊離のI κ Bのみがインビトロでユビキチン化され得たが、複合体に会合したりジン21、22変異体のI κ Bは、インビトロでユビキチン化され得た (データは示さず)。従って、遊離のI κ Bが、無差別的に、ユビキチン系によって認識されるのに対し、複合体に会合したインヒビターは、適切にリン酸化されていない限り、マスクされる。

10

20

30

40

50

B. ペプチド調節因子の同定

I B ユビキチンリガーゼ認識モチーフを同定するために、種々のペプチドを、種々の濃度で、ペプチダーゼインヒビターBestatin (40 µg/ml) の存在下で、反応混合物に添加した。ペプチドは、タンパク質のN末端シグナリングドメインにわたり、そして1つまたは両方のセリン残基 (32および36) でリン酸化されるか、または改変されないかもしくはセリン置換された。これらのペプチドを、種々の濃度でユビキチン反応に含ませ、そしてpI

B 特異的ユビキチン化のインヒビターについて試験した。遊離のI B の結合をモニターした場合、翻訳されたタンパク質を、結合反応混合物に直接添加した。

両方のセリン32および36でリン酸化されたペプチド (pI B ペプチド) のみが、pI B ユビキチン化を効果的に阻害した (図1A、レーン7、11~14)。c-Fosホスホペプチド (pFos、レーン5)、セリン32、36をアラニンで置換したI B ペプチド (p21S/A、レーン6)、および非リン酸化ペプチド (p21、レーン8) は、400 µMの濃度で、pI Bのユビキチン化に対して検出可能な効果を有さなかった。リン酸化I B ペプチドのIC₅₀を計算した。そして代表的な阻害濃度を図1Aに示す。二重にリン酸化されたI B ペプチドは、pI

B結合反応を、5 µMのIC₅₀で阻害した (レーン7、11~14)。これらのペプチドの配列を上記表I、および配列番号5~9に提供する。対照的に、一重リン酸化ペプチド (レーン9、10) は、400 µMのIC₅₀でpI B 結合を阻害した。試験した最小サイズのペプチド (シグナリングリン酸化部位に広がるのみである) (pp7、レーン14) は、いくらか高いC₅₀ (10 µM) であったが、ユビキチン化を効果的に阻害するのに十分であった。従って、配列番号1の残基21~41を含むペプチドは、E3ユビキチンリガーゼについての認識ドメインを含む。興味深いことに、リジン残基21および22は、阻害について必須ではなく、ユビキチン系認識部位は、実際の認識部位とは異なることを示唆する。

ペプチド調節因子の特異性を、2つの他のユビキチン結合反応において試験した：遊離の野生型の結合 (図1B、レーン1~3) またはS32/36A変異体I B (図1B、レーン4~6)、およびHeLa抽出物中の細胞性タンパク質のバルクへのユビキチン結合 (Alkalayらに従って¹²⁵I標識化ユビキチンによって検出される、図1C)。いずれの反応も、ペプチド調節因子またはコントロールペプチドの添加によって影響を受けなかった。

ペプチド調節因子は、pI B に関連する基質pI B のユビキチン化を消滅させることを見出した (図1D)。pI B の結合と同様に、I B の特異的結合もまた、会合したNF-B複合体 (示さず) およびI B 相同性残基Ser19および23で予めリン酸化することを必要とした。ホスファターゼインヒビターの非存在下で調製されたI B 基質は、ユビキチン化に供されなかった (図1D、レーン1)。ペプチド調節因子は、pI B について観察されたものと類似のIC₅₀でpI B ユビキチン化に影響を与えた (図1D、レーン4~7)。従って、同一の酵素が、ユビキチン依存性分解について両方のI Bを標的化するようである。

阻害性pI B ペプチドを、相補的ユビキチン依存性インビボ分解アッセイにおいて試験した (Orlanら、J.Biol.Chem.270:21707,1995;Stancovskiら、Mol.Cell.Biol.15:7106,1995)。このアッセイを使用して、刺激された細胞由来のpI B のみが、ユビキチン依存的にインビボで分解するのに対し、同一の細胞抽出物由来の非リン酸化I B は、分解に供されない。結合阻害ホスホペプチド調節因子の分解アッセイへの組み込みは、pI B 基質の安定化を生じた (図2、レーン3、4) のに対し、非リン酸化ペプチド因子またはコントロールホスホFosペプチドは、特異的pI B 分解に対して効果を有さなかった (レーン5、6)。ペプチドをLys21/22でトリムすることは、分解阻害効果を減退させなかった (レーン4)。これは、ペプチドが結合可能な基質としてのユビキチンプロテアーゼ系を消耗させることによってpI B 分解を消滅させないことを示す。

実施例 2

基質認識に関与するユビキチン系成分の同定

この実施例は、pI Bポリペプチドの認識を担う特定のE3の同定を例示する。

pI B ユビキチン結合および分解は、ユビキチン系酵素：E1、ユビキチン系画分Iに由来する特定のE2、E2F1 (Alkalayら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:10599,1995;Chenら、Cell

10

20

30

40

50

84:853,1996)、および画分IIの成分E3の全ての成分を必要とする。基質認識に關与するユビキチン系成分を同定するために、HeLa溶解物を、I B ホスホペプチド調節因子カラムにかけて分画し、そしてフロースルー画分をpI B 結合についてアッセイした。ペプチドを、製造業者の指示に従って、2 mg/mlの濃度でNHS-Sepharose^R (Pharmacia) に結合させた。100 μgのHeLa抽出物を、2.5 μlの結合化樹脂とともに、0.1%NP40および3%オボアルブミンの存在下で1時間、4 でインキュベートした。樹脂を捨て、そして未結合の物質を上記のユビキチン化アッセイで試験した。

コントロールホスホペプチドカラムおよびS32/36Aペプチドカラムからのフロースルー画分は、全I B 結合能力を維持した(図3A、レーン2、3)が、2つの異なるpI B ペプチド由来のフロースルー画分は、そのI B 特異的結合能力を失った(レーン4、7) 10。欠失した結合活性は、E3酵素の全ての公知の種を含む網状赤血球画分II(レーン5、8)によって補足され得た(Ciechanover, Cell 79:13,1994)。相補化は、画分Iまたは画分IおよびE1の添加によって得られず(それぞれ、レーン6および9)、このことはペプチドカラムがE2またはE1よりむしろE3を涸渇させたことを示している。再び、I B リジン残基21および22は、E3を維持するために不必要であり(図3A、レーン7~レーン4を比較のこと)、基質認識と結合部位との間の区別を強調した。ペプチドカラム涸渇は、I B E3に特異的であることを見出した。なぜなら、全てのフロースルー画分が、ランダムHeLaタンパク質結合において全活性を維持したからである(¹²⁵Iユビキチンの結合を測定することによって検出した。図3B)。これは、特定のE3が、同定されたモチーフにおいてpI Bの認識を担うことを示す。 20

実施例 3

細胞性NF- B活性化に対する代表的なペプチド調節因子の効果

この実施例は、細胞性NF- B活性化の、ペプチド調節因子の微量注入による阻害を例示する。

HeLa細胞を、微量注入の18時間前にグリッドのカバースリップ(Cellocate, Eppendorf)上に置いた。微量注入を、22アミノ酸pI B ペプチド(pp21; 表Iおよび配列番号9)またはコントロールホスホFosペプチド(配列番号10)を用いて、半自動化装置(Eppendorf)を使用して行った。ペプチドを細胞の細胞質中に、5 mg/mlの濃度で、100mM KCl、5mM Na₂HPO₄ (pH7.2)で注入し、そしてTNF (200ユニット/mL)で20分間(NF- B移行)または3時間(Eセレクチン発現)のいずれかで、迅速に活性化した。活性化の後、細胞を 30 固定し、そしてp65特異的抗体(Mercurioら、Genes & Dev.7:705,1993; Santa Cruz)またはモノクローナル抗Eセレクチン抗体(R & D Systems)で染色した。

ペプチド調節因子の非存在下で、TNF は、90%の細胞のp65核染色によって示されるように、NF- Bの核内への迅速な核移行を誘導する(図4G、カラム2を参照のこと)。pp21ペプチドは、いくつかの実験において微量注入した細胞の50~70%において、TNF 刺激によるNF- B活性化を消滅させた(図4Aおよび4Bにおける代表的な視野; および図4G、カラム3を参照のこと)。対照的に、コントロールpp-Fosペプチドは、微量注入されていない細胞と比較して、NF- B誘導性核移行の割合に対して効果を有さなかった(図4Cおよび4G、カラム4)。

NF- B阻害の機能的コンセンサスをさらに評価するために、I B-E3阻害ペプチドを、原 40 発性ヒト血管内皮細胞中に微量注入した(HUVEC; Chenら、J. Immunol 155:3538,1995)。これらの細胞は、Eセレクチンのような、NF- B調節接着タンパク質の表面発現によってTNF 刺激に応答する。HUVEC細胞を上記のようにプレートし、微量注入し、そして刺激した。刺激の3時間後、細胞を固定し、そしてNF- B依存性Eセレクチンの発現について染色した。HUVEC細胞の75%~85%を、いくつかの実験において、TNF 刺激後にEセレクチンについて強度に染色した。pp21ペプチドの微量注入は、微量注入した細胞の70~80%のEセレクチン発現を阻害した(図4D; および図4H、カラム3)。対照的に、コントロールpp-Fosペプチドは、微量注入していない細胞と比較して、Eセレクチン発現に対して効果を有さなかった(図4Fおよび4H、カラム4)。コントロールの、S32/36A置換されたI B ペプチドの微量注入は、Eセレクチン発現の割合に対して効果を有さなかった(データ示さ 50

ず)。

これらの結果は、シグナル誘導リン酸化I B およびI B のサブユニット特異的分解が、特定のE3によって媒介されることを示す。E3ユビキチンリガーゼの認識ドメインは、短い配列であり、両方のI B にて保存されている2つのシグナル獲得ホスホセリンを中心を置き、第1の生物学的に関連性のあるE3認識モチーフを表す。I B 認識における特異性は、リン酸化基質の状況によって支持される：会合した細胞性複合体は、非特異的E3から基質をマスクする。この特徴は、NF- Bインヒビター分解を刺激後相に制限し、ここで部位特異的リン酸化事象を介して特定のリガーゼに曝露される。NF- B活性化およびその得られる機能が、本明細書中で提供される調節因子を使用して、I B リガーゼのインビボ阻害によって特異的に消滅させられ得る。

10

上記から、本発明の特定の実施態様が例示の目的で記載されているが、種々の改変が本発明の精神および範囲を逸脱することなくなされ得ることが理解される。従って、本発明は、添付の請求の範囲による以外は限定されない。

配列表の要旨

配列番号1は、I B のアミノ酸配列である。

配列番号2は、I B のDNA配列である。

配列番号3は、I B のアミノ酸配列である。

配列番号4は、I B のDNA配列である。

配列番号5は、pp7のアミノ酸配列である。

配列番号6は、pp11のアミノ酸配列である。

20

配列番号7は、pp15のアミノ酸配列である。

配列番号8は、pp19のアミノ酸配列である。

配列番号9は、pp21のアミノ酸配列である。

配列番号10は、ホスホFosペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号11は、pp21 S/Aのアミノ酸配列である。

配列番号12は、HAタグ化I B のアミノ酸配列である。

配列番号13は、HAタグ化S32,36I B のアミノ酸配列である。

配列番号14は、HAタグ化I B のアミノ酸配列である。

配列表

(1) 一般的情報：

30

(i) 出願人：アルカレイ，イリット

ベン・ネリー，イノン

シエチャノバー，アーロン

マニング，アンソニー

マーキュリオ，フランク

ヤロン，アブラハム

(ii) 発明の名称：細胞のNF- B活性化を調節するための組成物および方法

(iii) 配列数：14

(iv) 連絡住所：

(A) 名称：シード アンド ベリー エルエルピー

40

(B) 番地：コロンビア センター 6300，フィフス アベニュー 701

(C) 市：シアトル

(D) 州：ワシントン

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：98104

(v) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピー ディスク

(B) コンピューター：IBM PC 互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0，バージョン #1.30

50

- (vi) 現在の出願データ：
 - (A) 出願番号：US
 - (B) 出願日：1997年2月14日
 - (C) 分類：
- (viii) 代理人/事務所情報：
 - (A) 氏名：マキ, デイビット ジェイ.
 - (B) 登録番号：31,392
 - (C) 照会/記録番号：860098.418
- (ix) 電話回線情報：
 - (A) 電話：(206) 622-4900
 - (B) テレファックス：(206) 682-6031
- (2) 配列番号1の情報：
 - (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：317アミノ酸
 - (B) 型：アミノ酸
 - (C) 鎖の数：
 - (D) トポロジー：直鎖状
 - (xi) 配列：配列番号1：

Met	Phe	Gln	Ala	Ala	Glu	Arg	Pro	Gln	Glu	Trp	Ala	Met	Glu	Gly	Pro	
1				5					10					15		
Arg	Asp	Gly	Leu	Lys	Lys	Glu	Arg	Leu	Leu	Asp	Asp	Arg	His	Asp	Ser	
		20						25					30			
Gly	Leu	Asp	Ser	Met	Lys	Asp	Glu	Glu	Tyr	Glu	Gln	Met	Val	Lys	Glu	
		35					40					45				
Leu	Gln	Glu	Ile	Arg	Leu	Glu	Pro	Gln	Glu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Glu	
	50					55					60					
Pro	Trp	Lys	Gln	Gln	Leu	Thr	Glu	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	His	Leu	
65					70					75				80		10
Ala	Ile	Ile	His	Glu	Glu	Lys	Ala	Leu	Thr	Met	Glu	Val	Ile	Arg	Gln	
			85						90					95		
Val	Lys	Gly	Asp	Leu	Ala	Phe	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Asn	Leu	Gln	Gln	
			100					105					110			
Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Val	Ile	Thr	Asn	Gln	Pro	Glu	Ile	Ala	Glu	
		115					120					125				
Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Asp	Pro	Glu	Leu	Arg	Asp	Phe	Arg	Gly	
	130				135						140					
Asn	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Cys	Glu	Gln	Gly	Cys	Leu	Ala	Ser	Val	
145					150					155					160	20
Gly	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Cys	Thr	Thr	Pro	His	Leu	His	Ser	Ile	Leu	
				165					170					175		
Lys	Ala	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	His	Thr	Cys	Leu	His	Leu	Ala	Ser	Ile	
			180					185					190			
His	Gly	Tyr	Leu	Gly	Ile	Val	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Ala	Asp	
		195					200					205				
Val	Asn	Ala	Gln	Glu	Pro	Cys	Asn	Gly	Arg	Thr	Ala	Leu	His	Leu	Ala	
	210					215					220					
Val	Asp	Leu	Gln	Asn	Pro	Asp	Leu	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Lys	Cys	Gly	
225					230					235					240	30
Ala	Asp	Val	Asn	Arg	Val	Thr	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Ser	Pro	Tyr	Gln	Leu	
				245					250					255		
Thr	Trp	Gly	Arg	Pro	Ser	Thr	Arg	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln	Leu	
		260						265						270		
Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Met	Leu	Pro	Glu	Ser	Glu	Asp	Glu	Glu	Ser	
		275					280					285				
Tyr	Asp	Thr	Glu	Ser	Glu	Phe	Thr	Glu	Phe	Thr	Glu	Asp	Glu	Leu	Pro	
	290					295					300					40
Tyr	Asp	Asp	Cys	Val	Phe	Gly	Gly	Gln	Arg	Leu	Thr	Leu				
305					310						315					

(2) 配列番号2の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1550塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号2:

TGCCGCCGTC	CCGCCCGCCA	GCGCCCCAGC	GAGGAAGCAG	CGCGCAGCCC	GCGGCCCAGC	60
GCACCCGCAG	CAGCGCCCGC	AGCTCGTCCG	CGCCATGTTC	CAGGCGGCCG	AGCGCCCCCA	120
GGAGTGGGCC	ATGGAGGGCC	CCCGCGACGG	GCTGAAGAAG	GAGCGGCTAC	TGGACGACCG	180
CCACGACAGC	GGCCTGGACT	CCATGAAAGA	CGAGGAGTAC	GAGCAGATGG	TCAAGGAGCT	240
GCAGGAGATC	CGCCTCGAGC	CGCAGGAGGT	GCCGCGCGGC	TCGGAGCCCT	GGAAGCAGCA	300
GCTCACCGAG	GACGGGGACT	CGTTCCTGCA	CTTGGCCATC	ATCCATGAAG	AAAAGGCACT	360
GACCATGGAA	GTGATCCGCC	AGGTGAAGGG	AGACCTGGCT	TTCTCAACT	TCCAGAACAA	420
CCTGCAGCAG	ACTCCACTCC	ACTTGGCTGT	GATCACCAAC	CAGCCAGAAA	TTGCTGAGGC	480
ACTTCTGGGA	GCTGGCTGTG	ATCCTGAGCT	CCGAGACTTT	CGAGGAAATA	CCCCCTACA	540
CCTTGCCCTGT	GAGCAGGGCT	GCCTGGCCAG	CGTGGGAGTC	CTGACTCAGT	CCTGCACCAC	600
CCCGCACCTC	CACTCCATCC	TGAAGGCTAC	CAACTACAAT	GGCCACACGT	GTCTACACTT	660
AGCCTCTATC	CATGGCTACC	TGGGCATCGT	GGAGCTTTTG	GTGTCCTTGG	GTGCTGATGT	720
CAATGCTCAG	GAGCCCTGTA	ATGGCCGGAC	TGCCCTTCAC	CTCGCAGTGG	ACCTGCAAAA	780
TCCTGACCTG	GTGTCACTCC	TGTTGAAGTG	TGGGGCTGAT	GTCAACAGAG	TTACCTACCA	840
GGGCTATTCT	CCCTACCAGC	TCACCTGGGG	CCGCCPAAGC	ACCCGATAAC	AGCAGCAGCT	900
GGGCCAGCTG	ACACTAGAAA	ACCTTCAGAT	GCTGCCAGAG	AGTGAGGATG	AGGAGAGCTA	960
TGACACAGAG	TCAGAGTTCA	CGGAGTTCAC	AGAGGACGAG	CTGCCCTATG	ATGACTGTGT	1020
GTTTGGAGGC	CAGCGTCTGA	CGTTATGAGT	GCAAAGGGGC	TGAAAGAACA	TGGACTTGTA	1080
TATTTGTACA	AAAAAAAGT	TTTATTTTTC	TAAAAAAGA	AAAAAGAAGA	AAAAATTTAA	1140
AGGGTGTACT	TATATCCACA	CTGCACACTG	CCTAGCCCAA	AACGTCTTAT	TGTGGTAGGA	1200
TCAGCCCTCA	TTTTGTGCT	TTTGTGAACT	TTTTGTAGGG	GACGAGAAAG	ATCATTGAAA	1260
TTCTGAGAAA	ACTTCTTTTA	AACCTCACCT	TTGTGGGGTT	TTTGGAGAAG	GTTATCAAAA	1320
ATTTCATGGA	AGGACCACAT	TTTATATTTA	TTGTGCTTCG	AGTGACTION	CCCAGTGGTA	1380
TCCTGTGACA	TGTAACAGCC	AGGAGTGTTA	AGCGTTCAGT	GATGTGGGGT	GAAAAGTTAC	1440
TACCTGTCAA	GTTTTGTGTT	ACCCTCCTGT	AAATGGTGTA	CATAATGTAT	TGTTGGTAAT	1500
TATTTTGGTA	CTTTTATGAT	GTATATTTAT	TAAAGAGATT	TTTACAAATG		1550

10

20

30

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 359アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号3:

40

Met Ala Gly Val Ala Cys Leu Gly Lys Thr Ala Asp Ala Asp Glu Trp
 1 5 10 15
 Cys Asp Ser Gly Leu Gly Ser Leu Gly Pro Asp Ala Ala Ala Pro Gly
 20 25 30
 Gly Pro Gly Leu Gly Ala Glu Leu Gly Pro Glu Leu Ser Trp Ala Pro
 35 40 45
 Leu Val Phe Gly Tyr Val Thr Glu Asp Gly Asp Thr Ala Leu His Leu
 50 55 60
 Ala Val Ile His Gln His Glu Pro Phe Leu Asp Phe Leu Leu Gly Phe
 65 70 75 80 10
 Ser Ala Gly His Glu Tyr Leu Asp Leu Gln Asn Asp Leu Gly Gln Thr
 85 90 95
 Ala Leu His Leu Ala Ala Ile Leu Gly Glu Ala Ser Thr Val Glu Lys
 100 105 110
 Leu Tyr Ala Ala Gly Ala Gly Val Leu Val Ala Glu Arg Gly Gly His
 115 120 125
 Thr Ala Leu His Leu Ala Cys Arg Val Arg Ala His Thr Cys Ala Cys
 130 135 140
 Val Leu Leu Gln Pro Arg Pro Ser His Pro Arg Asp Ala Ser Asp Thr
 145 150 155 160 20
 Tyr Leu Thr Gln Ser Gln Asp Cys Thr Pro Asp Thr Ser His Ala Pro
 165 170 175
 Ala Ala Val Asp Ser Gln Pro Asn Pro Glu Asn Glu Glu Glu Pro Arg
 180 185 190
 Asp Glu Asp Trp Arg Leu Gln Leu Glu Ala Glu Asn Tyr Asp Gly His
 195 200 205
 Thr Pro Leu His Val Ala Val Ile His Lys Asp Ala Glu Met Val Arg
 210 215 220
 Leu Leu Arg Asp Ala Gly Ala Asp Leu Asn Lys Pro Glu Pro Thr Cys
 225 230 235 240 30
 Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Val Glu Ala Gln Ala Ala Ser Val
 245 250 255
 Leu Glu Leu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Pro Thr Ala Arg Met Tyr
 260 265 270
 Gly Gly Arg Thr Pro Leu Gly Ser Ala Leu Leu Arg Pro Asn Pro Ile
 275 280 285
 Leu Ala Arg Leu Leu Arg Ala His Gly Ala Pro Glu Pro Glu Asp Glu
 290 295 300 40
 Asp Asp Lys Leu Ser Pro Cys Ser Ser Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser
 305 310 315 320
 Asp Asn Arg Asp Glu Gly Asp Glu Tyr Asp Asp Ile Val Val His Ser
 325 330 335
 Gly Arg Ser Gln Asn Arg Gln Pro Pro Ser Pro Ala Ser Lys Pro Leu
 340 345 350
 Pro Asp Asp Pro Asn Pro Ala
 355

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特徴:

50

(xi) 配列：配列番号 6：

Cys Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp Ser Met
 1 5 10

(2) 配列番号 7 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：16アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 7：

Cys Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp Ser Met Lys Asp Glu Glu
 1 5 10 15

10

(2) 配列番号 8 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 8：

Cys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp Ser Met
 1 5 10 15

20

Lys Asp Glu Glu
 20

(2) 配列番号 9 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：22アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 9：

Cys Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu Asp
 1 5 10 15

30

Ser Met Lys Asp Glu Glu
 20

(2) 配列番号 10 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：19アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 10：

Ile Gly Arg Arg Gly Lys Val Glu Gln Leu Ser Pro Glu Glu Glu Glu
 1 5 10 15

40

Lys Arg Arg

(2) 配列番号 11 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：22アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

50

Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val
 1 5 10 15
 Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Phe
 20 25 30
 Gln Ala Ala Glu Arg Pro Gln Glu Trp Ala Met Glu Gly Pro Arg Asp
 35 40 45
 Gly Leu Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser Gly Leu
 50 55 60
 Asp Ser Met Lys Asp Glu Glu Tyr Glu Gln Met Val Lys Glu Leu Gln
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Leu Glu Pro Gln Glu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Trp
 85 90 95
 Lys Gln Gln Leu Thr Glu Asp Gly Asp Ser Phe Leu His Leu Ala Ile
 100 105 110
 Ile His Glu Glu Lys Ala Leu Thr Met Glu Val Ile Arg Gln Val Lys
 115 120 125
 Gly Asp Leu Ala Phe Leu Asn Phe Gln Asn Asn Leu Gln Gln Thr Pro
 130 135 140
 Leu His Leu Ala Val Ile Thr Asn Gln Pro Glu Ile Ala Glu Ala Leu
 145 150 155 160
 Leu Gly Ala Gly Cys Asp Pro Glu Leu Arg Asp Phe Arg Gly Asn Thr
 165 170 175
 Pro Leu His Leu Ala Cys Glu Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val Gly Val
 180 185 190
 Leu Thr Gln Ser Cys Thr Thr Pro His Leu His Ser Ile Leu Lys Ala
 195 200 205
 Thr Asn Tyr Asn Gly His Thr Cys Leu His Leu Ala Ser Ile His Gly
 210 215 220
 Tyr Leu Gly Ile Val Glu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Asp Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gln Glu Pro Cys Asn Gly Arg Thr Ala Leu His Leu Ala Val Asp
 245 250 255
 Leu Gln Asn Pro Asp Leu Val Ser Leu Leu Leu Lys Cys Gly Ala Asp
 260 265 270
 Val Asn Arg Val Thr Tyr Gln Gly Tyr Ser Pro Tyr Gln Leu Thr Trp
 275 280 285
 Gly Arg Pro Ser Thr Arg Ile Gln Gln Gln Leu Gly Gln Leu Thr Leu
 290 295 300
 Glu Asn Leu Gln Met Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Asp
 305 310 315 320
 Thr Glu Ser Glu Phe Thr Glu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro Tyr Asp
 325 330 335
 Asp Cys Val Phe Gly Gly Gln Arg Leu Thr Leu
 340 345

10

20

30

40

(2) 配列番号13の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 347アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

50

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 1 3 :

Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val
 1 5 10 15
 Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Phe
 20 25 30
 Gln Ala Ala Glu Arg Pro Gln Glu Trp Ala Met Glu Gly Pro Arg Asp
 35 40 45
 Gly Leu Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ala Gly Leu
 50 55 60
 Asp Ala Met Lys Asp Glu Glu Tyr Glu Gln Met Val Lys Glu Leu Gln
 65 70 75 80
 Glu Ile Arg Leu Glu Pro Gln Glu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Trp
 85 90 95
 Lys Gln Gln Leu Thr Glu Asp Gly Asp Ser Phe Leu His Leu Ala Ile
 100 105 110
 Ile His Glu Glu Lys Ala Leu Thr Met Glu Val Ile Arg Gln Val Lys
 115 120 125
 Gly Asp Leu Ala Phe Leu Asn Phe Gln Asn Asn Leu Gln Gln Thr Pro
 130 135 140
 Leu His Leu Ala Val Ile Thr Asn Gln Pro Glu Ile Ala Glu Ala Leu
 145 150 155 160
 Leu Gly Ala Gly Cys Asp Pro Glu Leu Arg Asp Phe Arg Gly Asn Thr
 165 170 175
 Pro Leu His Leu Ala Cys Glu Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val Gly Val
 180 185 190
 Leu Thr Gln Ser Cys Thr Thr Pro His Leu His Ser Ile Leu Lys Ala
 195 200 205
 Thr Asn Tyr Asn Gly His Thr Cys Leu His Leu Ala Ser Ile His Gly
 210 215 220
 Tyr Leu Gly Ile Val Glu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Asp Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gln Glu Pro Cys Asn Gly Arg Thr Ala Leu His Leu Ala Val Asp
 245 250 255
 Leu Gln Asn Pro Asp Leu Val Ser Leu Leu Leu Lys Cys Gly Ala Asp
 260 265 270
 Val Asn Arg Val Thr Tyr Gln Gly Tyr Ser Pro Tyr Gln Leu Thr Trp
 275 280 285
 Gly Arg Pro Ser Thr Arg Ile Gln Gln Gln Leu Gly Gln Leu Thr Leu
 290 295 300
 Glu Asn Leu Gln Met Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Asp
 305 310 315 320
 Thr Glu Ser Glu Phe Thr Glu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro Tyr Asp
 325 330 335
 Asp Cys Val Phe Gly Gly Gln Arg Leu Thr Leu
 340 345

10

20

30

40

(2) 配列番号 1 4 の情報 :

50

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：389アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 1 4：

Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val
1 5 10 15

Pro Asp Tyr Ala Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Ala
20 25 30

Gly Val Ala Cys Leu Gly Lys Thr Ala Asp Ala Asp Glu Trp Cys Asp
35 40 45

Ser Gly Leu Gly Ser Leu Gly Pro Asp Ala Ala Ala Pro Gly Gly Pro
50 55 60

Gly Leu Gly Ala Glu Leu Gly Pro Glu Leu Ser Trp Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Phe Gly Tyr Val Thr Glu Asp Gly Asp Thr Ala Leu His Leu Ala Val
85 90 95

Ile His Gln His Glu Pro Phe Leu Asp Phe Leu Leu Gly Phe Ser Ala
100 105 110

Gly His Glu Tyr Leu Asp Leu Gln Asn Asp Leu Gly Gln Thr Ala Leu
115 120 125

His Leu Ala Ala Ile Leu Gly Glu Ala Ser Thr Val Glu Lys Leu Tyr
130 135 140

Ala Ala Gly Ala Gly Val Leu Val Ala Glu Arg Gly Gly His Thr Ala
145 150 155 160

Leu His Leu Ala Cys Arg Val Arg Ala His Thr Cys Ala Cys Val Leu
165 170 175

Leu Gln Pro Arg Pro Ser His Pro Arg Asp Ala Ser Asp Thr Tyr Leu
180 185 190

Thr Gln Ser Gln Asp Cys Thr Pro Asp Thr Ser His Ala Pro Ala Ala
195 200 205

Val Asp Ser Gln Pro Asn Pro Glu Asn Glu Glu Glu Pro Arg Asp Glu
210 215 220

Asp Trp Arg Leu Gln Leu Glu Ala Glu Asn Tyr Asp Gly His Thr Pro
225 230 235 240

Leu His Val Ala Val Ile His Lys Asp Ala Glu Met Val Arg Leu Leu
245 250 255

Arg Asp Ala Gly Ala Asp Leu Asn Lys Pro Glu Pro Thr Cys Gly Arg
260 265 270

Thr Pro Leu His Leu Ala Val Glu Ala Gln Ala Ala Ser Val Leu Glu
275 280 285

Leu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Pro Thr Ala Arg Met Tyr Gly Gly
290 295 300

Arg Thr Pro Leu Gly Ser Ala Leu Leu Arg Pro Asn Pro Ile Leu Ala
305 310 315 320

Arg Leu Leu Arg Ala His Gly Ala Pro Glu Pro Glu Asp Glu Asp Asp
325 330 335

Lys Leu Ser Pro Cys Ser Ser Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser Asp Asn
340 345 350

Arg Asp Glu Gly Asp Glu Tyr Asp Asp Ile Val Val His Ser Gly Arg
355 360 365

Ser Gln Asn Arg Gln Pro Pro Ser Pro Ala Ser Lys Pro Leu Pro Asp
370 375 380

Asp Pro Asn Pro Ala
385

10

20

30

40

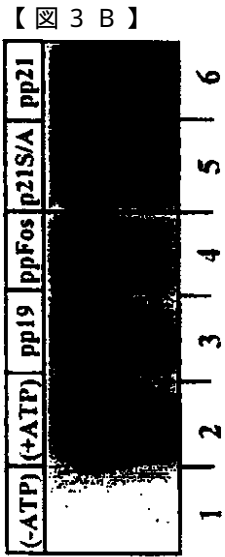


Fig. 3B

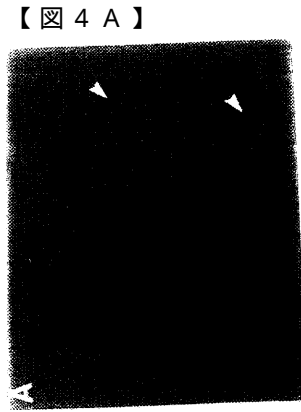


Fig. 4A

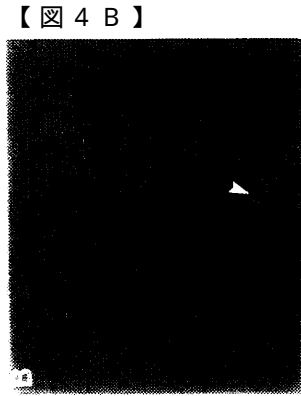


Fig. 4B

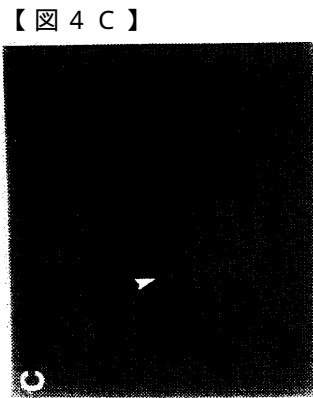


Fig. 4C

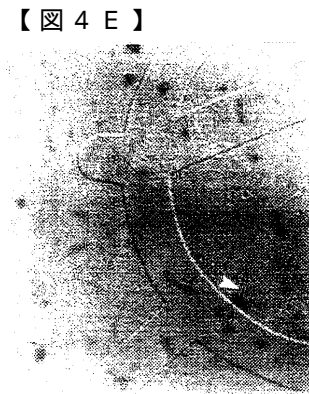


Fig. 4E

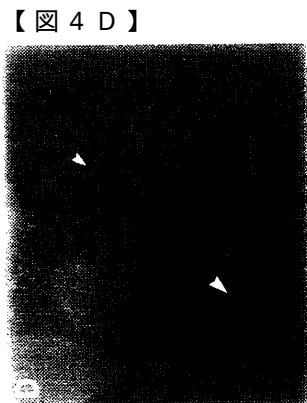


Fig. 4D

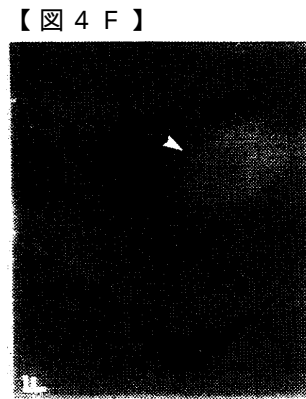


Fig. 4F

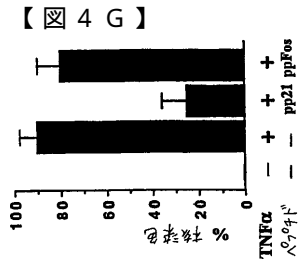


Fig. 4G

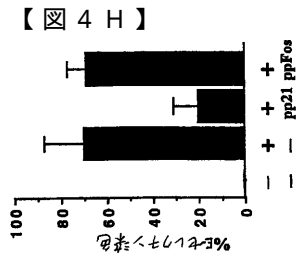


Fig. 4H

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00 1 0 2
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/06

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 マニング, アンソニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 9, サン ディエゴ, ゴールドフィッシュ コート
1 2 3 3 3

(72)発明者 メリクリオ, フランク

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0, サン ディエゴ, カーマル ビュー ロード 3
6 7 4

(72)発明者 マルカレイ, イリト

イスラエル国 エルサレム 9 6 1 4 2, スデロト ハーツェル 7 0

(72)発明者 ベン-ネリアー, イノン

イスラエル国 シオン 8 0 8 0 5, メボ ドゥブデバン 5

(72)発明者 シェチェノバー, アーロン

イスラエル国 ハイファ 3 4 9 8 1, ペレッツ ベルンステイン 2 1

(72)発明者 ヤロン, アブラハム

イスラエル国 エルサレム 9 3 1 0 7, エミル ゴラ 1

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 特表平08-503128(JP, A)

国際公開第97/000690(WO, A1)

国際公開第97/003998(WO, A1)

Chen, Z.J., et al., Cell, 1996年, Vol.84(6), p.853-62

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 1/70

PubMed

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)