

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5611814号  
(P5611814)

(45) 発行日 平成26年10月22日 (2014. 10. 22)

(24) 登録日 平成26年9月12日 (2014. 9. 12)

(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 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
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
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
請求項の数 14 (全 31 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2010-501233 (P2010-501233)	(73) 特許権者	508087044
(86) (22) 出願日	平成20年3月27日 (2008. 3. 27)		イントレキソン コーポレーション
(65) 公表番号	特表2010-522568 (P2010-522568A)		アメリカ合衆国 バージニア州 ブラック
(43) 公表日	平成22年7月8日 (2010. 7. 8)		スパーダ プラット ドライブ 1 8 7 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/058531		スイート 1 4 0 0
(87) 国際公開番号	W02008/119058	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成20年10月2日 (2008. 10. 2)		弁理士 小林 浩
審査請求日	平成23年3月24日 (2011. 3. 24)	(74) 代理人	100120134
(31) 優先権主張番号	60/908, 231		弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成19年3月27日 (2007. 3. 27)	(74) 代理人	100141195
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 西澤 恵美子
前置審査		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ME K リガンドおよびME K リガンドをコードするポリヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の ( i ) および ( i i ) から選択される単離されたポリペプチド：( i ) 配列番号 5 または配列番号 9 または配列番号 1 3 または配列番号 1 7 または配列番号 2 1 に示されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドであって、ME K 2 活性を阻害するポリペプチド、および( i i ) 配列番号 3 3 に示されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、ME K 1 および / または ME K 2 活性を阻害するポリペプチド。

【請求項 2】

ポリペプチドの N - 末端または C - 末端で、細胞内局在シグナル、レポーター、および / またはエピトープタグへ連結される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のベクターを含む組み換え宿主細胞。

【請求項 6】

細胞内で ME K を阻害する方法であって、請求項 4 に記載のベクターを宿主細胞内へ

トランスフェクトすること、および前記ポリペプチドの少なくとも 1 コピーを産生するための適切な条件下で前記トランスフェクトされたホスト細胞を培養することを含む方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドの 1 末端に第 1 の制限酵素によって切断可能な配列が隣接し、かつ前記ポリヌクレオチドのもう 1 つの末端に第 2 の制限酵素によって切断可能な配列が隣接し、かつ第 1 および第 2 の制限酵素が非互換性の付着末端を生じるポリヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドの 1 末端に N g o M I V によって切断可能な配列が隣接し、かつ前記ポリヌクレオチドのもう 1 つの末端に X m a I および C l a I によって切断可能な配列が隣接するポリヌクレオチド。

10

【請求項 9】

前記少なくとも 9 0 % の同一性が、少なくとも 9 5 % の同一性である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 0】

前記少なくとも 9 0 % の同一性が、少なくとも 9 6 % の同一性である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 1】

前記少なくとも 9 0 % の同一性が、少なくとも 9 7 % の同一性である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 1 2】

前記少なくとも 9 0 % の同一性が、少なくとも 9 8 % の同一性である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 3】

前記少なくとも 9 0 % の同一性が、少なくとも 9 9 % の同一性である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4】

配列番号 5 または配列番号 9 または配列番号 1 3 または配列番号 1 7 または配列番号 2 1 または配列番号 3 3 に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は哺乳類のキナーゼリガンド、基質および修飾因子に関する。特に本発明は、ポリペプチド、ポリペプチド組成物、ならびにリガンド、基質、および/または M E K の修飾因子であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明はまた、ホモポリリガンドまたは M E K 活性を調節するヘテロポリリガンドであるポリリガンドにも関する。本発明はまた、細胞内 ( s u b c e l l u l a r ) 領域へと局在するリガンドおよびポリリガンドにも関する。

40

【0 0 0 2】

本出願は、米国特許出願第 1 0 / 7 2 4 , 5 3 2 号 ( 現在、米国特許第 7 , 0 7 1 , 2 9 5 号 ) 、第 1 0 / 6 8 2 , 7 6 4 号 ( U S 2 0 0 4 / 0 1 8 5 5 5 6 号、P C T / U S 2 0 0 4 / 0 1 3 5 1 7 号、国際公開第 2 0 0 5 / 0 4 0 3 3 6 号 ) 、米国特許出願第 1 1 / 2 3 3 , 2 4 6 号、および U S 2 0 0 4 0 5 7 2 0 1 1 P 号 ( 国際公開第 2 0 0 5 1 1 6 2 3 1 号 ) に関する主題を有する。これらの特許および出願は、それぞれが参照によりここに取り込まれる。

【背景技術】

50

## 【0003】

キナーゼは、分子へのリン酸の付加を触媒する酵素である。キナーゼによるリン酸の付加は、リン酸化と呼ばれる。キナーゼの基質がタンパク質分子であるとき、通常リン酸化されるアミノ酸はセリン、スレオニン、およびチロシンである。ホスファターゼは、分子からリン酸を取り除く酵素である。リン酸の除去は、脱リン酸化と呼ばれる。キナーゼおよびホスファターゼは、伝達、減弱、またその他には細胞シグナルおよび細胞制御の機序を調節するため、細胞内でしばしば競合する力を示す。キナーゼおよびホスファターゼの両方は、重複する固有の天然基質を有する。キナーゼ、ホスファターゼ、およびそれらの天然基質により調節される細胞シグナルおよび制御機序は、研究手段の計画およびドラッグデザインの標的である。

10

## 【0004】

MAP/ERKキナーゼ1、MEK1、PRKMK1、MAPKK1、MAP2K1、MKK1は、MEK1として知られている同じ酵素である。MAP/ERKキナーゼ2、MEK2、PRKMK2、MAPKK2、MAP2K2、MKK2は、MEK2として知られている同じ酵素である。MEK1およびMEK2は、タンパク質またはペプチド基質中のセリン、スレオニン、およびチロシン残基をリン酸化できる。今日までに、MEKアイソフォームのわずかな細胞基質が同定されている。個々の基質またはリガンドは同定され研究されてきたが、MEKアイソフォーム活性を調節するポリリガンドとしての、共に連結した混合リガンドについては本発明以前には示されなかった。

## 【0005】

カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼを調節し、かつ心臓の筋小胞体に局在するポリペプチドリガンドの設計および合成が、Ji et al. (J Biol Chem (2003) 278:25063-71) により行なわれた。Ji et al. は、ホスホランパン由来の筋小胞体局在シグナルをポリペプチドリガンドへ融合させることにより、カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ抑制性ポリペプチドリガンドを筋小胞体へ局在させる発現コンストラクトを作製してこれを達成した。米国特許第7,071,295号も参照のこと。

20

## 【発明の概要】

## 【0006】

ポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列の詳細な説明

30

配列番号1~36は、ポリリガンドおよびそれらをコードするポリヌクレオチドの例である。

## 【0007】

特に、配列番号1のMEKポリリガンドは配列番号2、配列番号3、および配列番号4によりコードされ、ここでコドンは哺乳類での発現およびベクター挿入のために最適化され、かつ配列番号3~4はモジュール式のクローニング方法に適用できる別の隣接した制限酵素部位を含む。配列番号1は構造A-S1-B-S2-C-S3-Dのポリリガンドの実施形態であり、ここでAは配列番号41、Bは配列番号42、Cは配列番号49、およびDは配列番号43であり、Xaaはアラニンまたはフェニルアラニンであり、S1はアミノ酸配列PGAAGのスペーサー、S2はアミノ酸配列PAGGAのスペーサー、およびS3はアミノ酸配列PGAAGのスペーサーである。図4Dに一般的に示す構造A-S1-B-S2-C-S3-Dのポリリガンドもまた、ここではヘテロポリリガンドと呼ばれる。

40

## 【0008】

配列番号5は構造X-S1-X-S2-Y-S3-Zのポリリガンドの実施形態であり、ここでXは配列番号44、Yは配列番号42、Zは配列番号43であり、Xaaはアラニンまたはフェニルアラニンであり、S1はアミノ酸配列PGAAGのスペーサー、S2はアミノ酸配列PAGGAのスペーサー、およびS3はアミノ酸配列PGAAGのスペーサーである。配列番号5のMEKポリリガンドは配列番号6、配列番号7、および配列番号8によりコードされ、ここでコドンは哺乳類での発現およびベクター挿入のために最適

50

化され、かつ配列番号 7 ~ 8 はモジュール式のクローニング方法に適用できる別の隣接した制限酵素部位を含む。図 4 E に一般的に示す構造 X - S 1 - X - S 2 - Y - S 3 - Z のポリリガンドもまた、ここではヘテロポリリガンドと呼ばれる。

【 0 0 0 9 】

配列番号 9 は配列番号 1 0、配列番号 1 1、および配列番号 1 2 によりコードされ、ここでコドンは哺乳類での発現およびベクター挿入のために最適化され、かつ配列番号 1 1 ~ 1 2 はモジュール式のクローニング方法に適用できる別の隣接した制限酵素部位を含む。配列番号 1 は構造 A - S 1 - B - S 2 - C - S 3 - D のポリリガンドの実施形態であり、ここで A は配列番号 4 1、B は配列番号 4 2、C は配列番号 4 9、および D は配列番号 4 3 であり、X a a はセリン、スレオニンまたはチロシンであり、S 1 はアミノ酸配列 P G A A G のスペーサー、S 2 はアミノ酸配列 P A G G A のスペーサー、および S 3 はアミノ酸配列 P G A A G のスペーサーである。図 4 D に一般的に示す構造 A - S 1 - B - S 2 - C - S 3 - D のポリリガンドもまた、ここではヘテロポリリガンドと呼ばれる。

【 0 0 1 0 】

配列番号 1 3 は構造 X - S 1 - X - S 2 - Y - S 3 - Z のポリリガンドの実施形態であり、ここで X は配列番号 4 4、Y は配列番号 4 2、Z は配列番号 4 3 であり、X a a はセリン、スレオニンまたは 1 0 チロシンであり、S 1 はアミノ酸配列 P G A A G のスペーサー、S 2 はアミノ酸配列 P A G G A のスペーサー、および S 3 はアミノ酸配列 P G A A G のスペーサーである。配列番号 1 3 の M E K ポリリガンドは配列番号 1 4、配列番号 1 5、および配列番号 1 6 によりコードされ、ここでコドンは哺乳類での発現およびベクター挿入のために最適化され、かつ配列番号 1 5 ~ 1 6 はモジュール式のクローニング方法に適用できる別の隣接した制限酵素部位を含む。図 4 E に一般的に示す構造 X - S 1 - X - S 2 - Y - S 3 - Z のポリリガンドもまた、ここではヘテロポリリガンドと呼ばれる。

【 0 0 1 1 】

配列番号 1 7 は配列番号 1 8、配列番号 1 9、および配列番号 2 0 によりコードされ、ここでコドンは哺乳類での発現およびベクター挿入のために最適化され、かつ配列番号 2 0、1 9 ~ 2 0 はモジュール式のクローニング方法に適用できる別の隣接した制限酵素部位を含む。配列番号 1 7 は構造 A - S 1 - B - S 2 - C - S 3 - D のポリリガンドの実施形態であり、ここで A は配列番号 5 1、B は配列番号 4 3、C は配列番号 4 2、および D は配列番号 4 4 であり、X a a はアラニンまたはフェニルアラニンであり、S 1 はアミノ酸配列 P G A A G のスペーサー、S 2 はアミノ酸配列 P A G G A のスペーサー、および S 3 はアミノ酸配列 P G A A G のスペーサーである。図 4 D に一般的に示す構造 A - S 1 - B - S 2 - C - S 3 - D のポリリガンドもまた、ここではヘテロポリリガンドと呼ばれる。

【 0 0 1 2 】

配列番号 2 1 は配列番号 2 2、配列番号 2 3、および配列番号 2 4 によりコードされ、ここでコドンは哺乳類での発現およびベクター挿入のために最適化され、かつ配列番号 3 0、2 3 ~ 2 4 はモジュール式のクローニング方法に適用できる別の隣接した制限酵素部位を含む。配列番号 2 1 は構造 A - S 1 - A - S 2 - A のポリリガンドの実施形態であり、ここで A は配列番号 4 5 であり、X a a はアラニンまたはフェニルアラニンであり、S 1 はアミノ酸配列 P G A A G のスペーサー、S 2 はアミノ酸配列 P A G G A のスペーサー、および S 3 はアミノ酸配列 P G A A G のスペーサーである。図 2 D に一般的に示す構造 A - S 1 - A - S 2 - A のポリリガンドもまた、ここではホモポリリガンドと呼ばれる。

【 0 0 1 3 】

配列番号 2 5 は配列番号 2 6、配列番号 2 7、および配列番号 2 8 によりコードされ、ここでコドンは哺乳類での発現およびベクター挿入のために最適化され、かつ配列番号 2 7 ~ 2 8 はモジュール式のクローニング方法に適用できる別の隣接した制限酵素部位を含む。配列番号 2 5 は単量体リガンドの実施形態であり、ここで X a a はアラニンまたはフェニルアラニンである。

【 0 0 1 4 】

配列番号 29 は配列番号 30、配列番号 31、および配列番号 32 によりコードされ、ここでコドンは哺乳類での発現およびベクター挿入のために最適化され、かつ配列番号 31 ~ 32 はモジュール式のクローニング方法に適用できる別の隣接した制限酵素部位を含む。配列番号 29 は単量体リガンドの実施形態であり、ここで X a a はアラニンである。  
【0015】

配列番号 33 は配列番号 34、配列番号 35、および配列番号 36 によりコードされ、ここでコドンは哺乳類での発現およびベクター挿入のために最適化され、かつ配列番号 35 ~ 36 はモジュール式のクローニング方法に適用できる別の隣接した制限酵素部位を含む。配列番号 33 は構造 A - S4 - B - S5 - A - S4 - B のポリリガンドの実施形態であり、ここで A は配列番号 48、B は配列番号 50 であり、X a a はアラニンであり、S4 はアミノ酸配列 R R P A A A のスペーサー、および S5 はアミノ酸配列 P G G G のスペーサーである。図 4 C に一般的に示す構造 A - S4 B - S5 - A - S4 - B のポリリガンドもまた、ここではヘテロポリリガンドと呼ばれる。

10

【0016】

配列番号 37 ~ 40 は完全長 M E K タンパク質基質または阻害物質である。M E K は自己リン酸化することから、M E K は基質として含まれる。これらの配列は以下の公開受入番号を有する：N P \_\_ 002746、N P \_\_ 002737、X P \_\_ 055766、N P \_\_ 002736、N P \_\_ 001744。これらの受入番号によって表される配列のそれぞれは、参照によりここに取り込まれる。配列番号 37 ~ 40 において、M E K によるリン酸化が可能なアミノ酸の位置を X a a で表す。野生型タンパク質において、X a a はセリン、スレオニン、またはチロシンである。本発明のリガンドにおいて、X a a はいずれのアミノ酸でもある。

20

【0017】

配列番号 41 ~ 48 は配列番号 37 ~ 39 の部分配列であり、キナーゼ活性部位ブロッカーペプチドリガンド配列を含む配列の例を表しており、ここにおいて天然ポリペプチド中の M E K によるリン酸化が可能なセリン、チロシン、またはスレオニンの位置は X a a として示される

【0018】

配列番号 49 ~ 51 は配列番号 38 または配列番号 40 の部分配列であり、ペプチドキナーゼ阻害物質の例を表す。5 配列番号 41 ~ 51 は単量体ポリペプチドリガンド配列の例を表す。

30

【0019】

X a a を含むアミノ酸配列は、X a a がいずれのアミノ酸でもあるポリペプチドを包含する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図 1】スペーサーなしのホモ重合体リガンドの例を示す。

【図 2】スペーサーのあるホモ重合体リガンドの例を示す。

【図 3】スペーサーなしのヘテロ重合体リガンドの例を示す。

【図 4】スペーサーのあるヘテロ重合体リガンドの例を示す。

40

【図 5】任意のエピトープタグに連結したリガンドおよび重合体リガンドの例を示す。

【図 6】任意のレポーターに連結したリガンドおよび重合体リガンドの例を示す。

【図 7】任意の局在シグナルに連結したリガンドおよび重合体リガンドの例を示す。

【図 8】任意の局在シグナルおよび任意のエピトープタグに連結したリガンドおよび重合体リガンドの例を示す。

【図 9】リガンドおよびポリリガンドが任意の局在シグナル、任意のエピトープタグ、および任意のレポーターに連結した遺伝子コンストラクトの例を示す。

【図 10 A】リガンド遺伝子コンストラクトを含むベクターの例を示す。

【図 10 B】リガンド遺伝子コンストラクトを含むベクターの例を示す。

【図 10 C】リガンド遺伝子コンストラクトを含むベクターの例を示す。

50

【図 1 0 D】リガンド遺伝子コンストラクトを含むベクターの例を示す。

【図 1 1】ポリリガンドの組み合わせ合成に有用な連続的クローニング工程の例を示す。

【図 1 2】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 1 3】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 1 4】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 1 5】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

10

【図 1 6】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 1 7】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 1 8】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 1 9】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 2 0】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

20

【図 2 1】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 2 2】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 2 3】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 2 4】本発明のリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の遺伝子コンストラクトを含むベクターの図を示す。

【図 2 5】形質移入された H T - 1 0 8 0 細胞の溶解物中の、リガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の平均タンパク質濃度を示す。

30

【図 2 6】M E K 1 および M E K 2 タンパク質標的に対するリガンド - ベータ - ガラクトシダーゼ融合タンパク質の、タンパク質ドットプロット結合アッセイの画像分析の結果を示す。

#### 【 0 0 2 1 】

本発明は M E K に対するポリペプチドリガンドおよびポリリガンドに関する。本発明の態様は、切断および/またはアミノ酸置換によって 1 以上の天然基質または阻害物質を修飾することによる、新規なモジュール式の M E K (ここで M E K との語は、M E K 1 および/または M E K 2 に適用される) 3 0 活性の阻害物質を提供する。本発明のさらなる態様は、細胞内局在シグナルへの連結による M E K 阻害物質、リガンド、またはポリリガンドの細胞内局在である。M E K リガンドおよびポリリガンドの様々な実施形態を配列番号 1 ~ 5 1 に示す。さらに詳細には、本発明はリガンド、ホモポリリガンド、および配列番号 4 1 ~ 5 1 のいずれを 1 以上含むヘテロリガンドに関する。加えて、本発明は配列番号 3 7 ~ 4 0 の部分配列の 1 以上、またはそのいずれの一部を含むリガンドおよびポリリガンドに関する。さらに、本発明は配列番号 4 1 ~ 5 1 の 1 以上、またはそのいずれの一部を含むポリリガンドに対し、少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % および 9 9 % の配列同一性を有するポリリガンドに関する。さらに、本発明は配列番号 3 7 ~ 4 0 の部分配列の 1 以上を含むポリリガンドに対し、少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % および 9 9 % の配列同一性を有するポリリガンドに関する。

40

#### 【 0 0 2 2 】

50

ホモポリリガンドまたはヘテロポリリガンドであり得るポリリガンドは、2以上の単量体ポリペプチドリガンドにより構成されるキメラリガンドである。ここで用いられるキメラとの語は、2個の異なるポリペプチドから、または同じポリペプチドの異なる領域からのアミノ酸配列を含む、人工の複合、または融合ポリペプチドに適用される。単量体リガンドの例は配列番号43に示されるポリペプチドであり、ここでX a aはいずれのアミノ酸でもある。配列番号43は、野生型完全長である配列番号39の選択された部分配列であり、ここで野生型配列におけるX a aに相当するアミノ酸はM E Kによるリン酸化が可能なセリン、チロシン、またはスレオニンである。ホモポリリガンドの例は、X a aがいずれのアミノ酸でもある、配列番号43の二量体または多量体を含むポリペプチドである。ヘテロポリリガンドの例は、X a aがいずれのアミノ酸でもある、配列番号51および配列番号41～50の1以上を含むポリペプチドである。配列番号41～51を、ホモ重合体またはヘテロ重合体リガンドへと組み合わせるための多数の方法が存在する。さらに、配列番号37～40のさらなる部分配列を互いに、および配列番号41～51と組み合わせることで重合体リガンドを作製するための多数の方法が存在する。

10

#### 【0023】

本発明のポリリガンドは、単量体の前、後、またはそれらの間にスペーサーアミノ酸を任意に含む。配列番号1は構造A - S 1 - B - S 2 - C - S 3 - Dのポリリガンドの実施形態であり、ここでAは配列番号41、Bは配列番号42、Cは配列番号49、およびDは配列番号43であり、X a aはアラニンまたはフェニルアラニンであり、S 1、S 2、およびS 3はスペーサーである。本発明は、上記または下記の例に限定されることなく、ホモポリリガンドおよびヘテロポリリガンドの全ての組み合わせを捕捉することを企図する。本明細書における「リガンド」との語の使用は、単量体リガンド、重合体リガンド、ホモ重合体リガンドおよび/またはヘテロ重合体リガンドを包含する。

20

#### 【0024】

単量体リガンドは型に分類できる。単量体リガンドの一型は、少なくともポリペプチドの一部が、基質または偽基質（活性部位ブロッカー）としてM E Kにより認識され得るポリペプチドである。認識され得るポリペプチドの一部は、認識モチーフと称される。本発明において、認識モチーフは天然または合成であり得る。認識モチーフの例は当該技術分野で周知であり、天然M E K基質および偽基質モチーフ（配列番号41～48および認識モチーフを含む配列番号37～39の部分配列）を含むがこれらに限定されない。単量体リガンドの別の型は、少なくともポリペプチドの一部がM E Kと結合し、かつM E K活性部位以外の部位でM E Kを阻害し得るポリペプチドである。

30

#### 【0025】

重合体リガンドは、共に連結してキメラを作る2以上の単量体リガンドを含む。

#### 【0026】

ホモ重合体リガンドは、1以上の単量体リガンドにおいてリン酸化が可能な残基が置換または修飾され得ることを除いては、それぞれの単量体リガンドがアミノ酸配列において同一な重合体リガンドである。

#### 【0027】

ヘテロ重合体リガンドは、幾つかの単量体リガンドが同一のアミノ酸配列をもたない重合体リガンドである。

40

#### 【0028】

本発明のリガンドは、エピトープタグ、レポーター、および/または細胞局在シグナルを提供するさらなる分子またはアミノ酸へ任意に連結される。細胞局在シグナルは、リガンドを細胞の領域へと向ける。エピトープタグおよび/またはレポーターおよび/または局在シグナルは同分子であってよい。エピトープタグおよび/またはレポーターおよび/または局在シグナルはまた、異なる分子であってもよい。

#### 【0029】

本発明はまた、リガンド、ホモポリリガンド、およびヘテロポリリガンドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドも包含する。本発明の核酸は、エピトープタグ

50

、レポーター、および/または細胞局在シグナルのようなさらなる特性を持つポリペプチドをコードするさらなるヌクレオチド配列へ任意に連結される。当該ポリヌクレオチドには、制限酵素部位およびその他の制限酵素活性に必要なヌクレオチドを含むヌクレオチド配列が任意に隣接する。隣接の配列はベクター内の固有のクローニング部位を任意に提供し、かつ続くクローニングの方向性を任意に提供する。さらに、本発明の核酸はベクターポリヌクレオチド内に任意に取り込まれる。本発明のリガンド、ポリリガンド、およびポリヌクレオチドは、研究手段および/または治療法としての有用性を持つ。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明はMEK修飾因子であるリガンドおよびポリリガンドに関する。本発明の態様は、切断および/またはアミノ酸置換によって1以上の天然基質または阻害物質を修飾することによる、新規な、単量体かつキメラの、モジュール式のMEK活性の阻害物質を提供する。本発明のさらなる態様は、細胞内局在シグナルへの連結によるMEK阻害物質、リガンド、またはポリリガンドの細胞内局在である。リガンドおよびポリリガンドの様々な実施形態を配列番号1～51に示す。ポリリガンドは、2以上の単量体ポリペプチドリガンドを含むキメラリガンドである。単量体リガンドの例は配列番号42に示されるポリペプチドであり、ここでXaaはいずれのアミノ酸でもある。配列番号42は、親である完全長の配列番号37の選択された部分配列であり、ここで親配列におけるXaaに相当するアミノ酸はMEKによるリン酸化が可能なセリン、チロシン、またはスレオニンである。単量体リガンドの別の例は、配列番号49に示されるポリペプチドである。単量体リガンドの別の例は、配列番号46に示されるポリペプチドである。配列番号41～51のそれぞれは単量体の形である個々のポリペプチドリガンドを表し、ここでXaaはいずれのアミノ酸でもある。配列番号41～54は、配列番号37～40の部分配列の選択された例であるが、認識モチーフまたは結合関連モチーフを含む、配列番号37～40のその他の部分配列もまた単量体リガンドとして利用されてよい。配列番号37～40の単量体リガンド部分配列は、野生型部分配列であってよい。加えて、配列番号37～40の単量体リガンド部分配列は、他のアミノ酸によって置換された、MEKによるリン酸化が可能なアミノ酸を有してよい。さらに、単量体リガンドおよびポリリガンドは、配列番号41～51の1以上のアミノ酸配列を含むリガンドに対し、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有してよい。さらに、単量体リガンドおよびポリリガンドは、配列番号37～40の部分配列に対し少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%および99%の配列同一性を有してよい。

【0031】

ホモポリリガンドの例は、配列番号50の二量体または多量体を含むポリペプチドである。ホモポリリガンドの別の例は、配列番号51の二量体または多量体を含むポリペプチドである。ヘテロポリリガンドの例は、Xaaがいずれのアミノ酸でもある、配列番号41および配列番号42～51の1以上を含むポリペプチドである。配列番号41～51を、ホモ重合体またはヘテロ重合体リガンドへと組み合わせるための多数の方法が存在する。さらに、配列番号37～40のさらなる部分配列を互いに、および配列番号41～51と組み合わせることで重合体リガンドを作製するための多数の方法が存在する。ポリリガンドは配列番号41～51のいずれの2以上を含んでよく、ここでXaaはいずれのアミノ酸でもある。配列番号41～51は、配列番号37～40の部分配列の選択された例であるが、野生型または変異型のさらなる部分配列もポリリガンドの形成に利用されてよい。本発明は、ホモポリリガンドおよびヘテロポリリガンドの、限定のない全ての可能な組み合わせに関する。

【0032】

配列番号41～48は、MEKによるリン酸化が可能な少なくとも1のセリンまたはスレオニン残基を含むタンパク質を示し、この位置はXaaで表される。MEKは自己リン酸化することから、MEKそれ自体が基質として含まれる。配列番号41～48は配列番



号 37 ~ 39 の部分配列であり、ここで再び、MEK によるリン酸化が可能な残基の位置は X a a で表される。本来 X a a は、一般的にはセリン、チロシン、またはスレオニンである。本発明の一実施形態において、X a a はいずれのアミノ酸でもあり得る。X a a がセリン、チロシン、またはスレオニンであるリガンドはポリリガンドの一部として使用できるが、一実施形態において、少なくとも 1 のリン酸化可能なセリン、チロシン、またはスレオニンは、アラニン、アスパラギン酸塩、アスパラギン、システイン、グルタミン酸塩、グルタミン、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、プロリン、アルギニン、バリン、またはトリプトファンを含む天然アミノ酸のうちの一つのような別のアミノ酸に置換される。X a a はまた、非天然のアミノ酸であってもよい。別の実施形態において、MEK によるリン酸化が可能な残基はアラニンにより置換される。別の実施形態において、MEK によるリン酸化が可能な残基はフェニルアラニンにより置換される。本発明のリガンドおよびポリリガンドは、MEK の内在性の効果を調節するために設計された。

#### 【0033】

一般に、天然 MEK 基質に基づくリガンド単量体は、MEK 基質中の推定される MEK リン酸化認識モチーフを同定することにより構築される。時々、リン酸化可能な残基をセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸に改変することが望ましい。さらなる単量体は、MEK 認識モチーフ、ならびに MEK 認識モチーフのいずれかの側に隣接および接触するアミノ酸を含む。単量体リガンドはそれ故、MEK 認識モチーフを含む単量体を与えるどのような長さであってもよい。例えば、単量体は MEK 認識モチーフ、および認識モチーフに隣接する少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 - 100 以上のアミノ酸を含んでよい。

#### 【0034】

例えば一実施形態において本発明は、

a) 配列番号 39 のアミノ酸残基 165 ~ 203 に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも 80 % 同一であり、ここで配列番号 39 のアミノ酸残基 185 および / または 187 に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基であるペプチド；

b) 配列番号 39 のアミノ酸残基 169 ~ 200 に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも 80 % 同一であり、ここで配列番号 39 のアミノ酸残基 185 および / または 187 に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基であるペプチド；

c) 配列番号 39 のアミノ酸残基 174 ~ 196 に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも 80 % 同一であり、ここで配列番号 39 のアミノ酸残基 185 および / または 187 に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基であるペプチド；および

d) 配列番号 39 のアミノ酸残基 179 ~ 194 に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも 80 % 同一であり、ここで配列番号 39 のアミノ酸残基 185 および / または 187 に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基であるペプチドからなる群から選択されるペプチドの少なくとも 1 コピーを含む、MEK のポリペプチド阻害物を含む。

#### 【0035】

ここで用いられる「相当する」および「相当している」との語は、それらが配列アラインメントに関する時、参照タンパク質、例えば ERK 1 (配列番号 38) 内の列挙された位置、および参照タンパク質における当該位置と共に整列させた位置を意味することを企図する。従って、対象ペプチドの 25 アミノ酸配列を参照ペプチド、例えば配列番号 38 のアミノ酸配列と共に整列させる時、参照ペプチド配列のある列挙された位置に「相当する」対象ペプチド配列中のアミノ酸は参照ペプチド配列のこれらの位置と共に整列させたものであるが、必ずしも参照配列のこれらの正確な数的位置にはない。配列間の相当する

アミノ酸を決定するための、配列の整列方法を以下に述べる。

【 0 0 3 6 】

本発明のさらなる実施形態は、配列番号 37 ~ 39 により同定される基質のような、いずれの推定される、または実在の M E K の基質に基づいた単量体（上記のような）を含む。さらに、基質が 1 を超える認識モチーフを有するとき、そこにおいて 1 を超える単量体が同定されてよい。

【 0 0 3 7 】

本発明の別の実施形態は、少なくとも 1 コピーのリガンドペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子である。

【 0 0 3 8 】

本発明の別の実施形態は、単離されたポリペプチドホモポリリガンドであり、ここで当該ホモポリリガンドは M E K 活性を調節する。

【 0 0 3 9 】

本発明の別の実施形態は、単離されたポリペプチドヘテロポリリガンドであり、ここで当該ヘテロポリリガンドは M E K 活性を調節する。

【 0 0 4 0 】

本発明の別の実施形態は、ポリヌクレオチド配列 15 が、1 以上のペプチドリガンドの 1 以上のコピーをコードする核酸分子である。

【 0 0 4 1 】

本発明の別の実施形態は、ポリヌクレオチド配列が、少なくとも 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 または 10 からなる群より選択されるペプチドのコピー数をコードする核酸分子である。

【 0 0 4 2 】

本発明の別の実施形態は、リガンドまたはポリリガンドの少なくとも 1 コピーをコードする核酸分子を含むベクターである。

【 0 0 4 3 】

本発明の別の実施形態は、リガンドまたはポリリガンドの少なくとも 1 コピーをコードする 25 核酸分子を含むベクターを含む、組み換え宿主細胞である。

【 0 0 4 4 】

本発明の別の実施形態は、リガンドまたはポリリガンドの少なくとも 1 コピーをコードする核酸分子を含むベクターを宿主細胞内へトランスフェクトすること、およびリガンドまたはポリリガンドの少なくとも 1 コピーを産生するための適切な条件下で、当該トランスフェクトされた宿主細胞を培養することを含む、細胞内で M E K を阻害する方法である。

【 0 0 4 5 】

本発明はまた、参照阻害物質に対し少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % 同一な、改変阻害物質にも関する。「改変阻害物質」は、阻害物質タンパク質またはポリペプチドの一次構造（アミノ酸配列）における 1 以上のアミノ酸の付加、欠失または置換により作製できるペプチドを意味するために用いられる。「改変認識モチーフ」は、モチーフの一次構造（アミノ酸配列）における 1 以上のアミノ酸の付加、欠失または置換により改変された天然 M E K 認識モチーフである。例えば改変 M E K 認識モチーフは、リン酸化可能なアミノ酸がリン酸化されないアミノ酸に改変されたモチーフであってよい。ここで「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」の語は互換的に用いられる。参照阻害物質は、必ずしも野生型タンパク質またはその一部ではない。従って参照阻害物質は、その配列が予め野生型タンパク質に対して改変されたタンパク質またはペプチドであってよい。参照阻害物質は、特定の生物由来の野生型タンパク質であるかまたはそうでない可能性がある。

【 0 0 4 6 】

参照アミノ酸配列に対して少なくとも、例えば、約 95 % 「同一」なアミノ酸配列を有するポリペプチドは、当該ポリペプチドのアミノ酸配列が、当該アミノ酸配列が参照ペ

10

20

30

40

50

チドをコードする参照アミノ酸配列の各100アミノ酸あたり約5の改変までを含むかもしれないことを除いては、参照配列と同一であることを意味すると理解される。言い換えれば、参照アミノ酸配列に対し少なくとも約95%同一なアミノ酸配列を有するペプチドを得るためには、参照配列のアミノ酸残基の約5%までが欠失しているかもしくは別のアミノ酸で置換されてよく、または参照配列中の全アミノ酸の約5%までの幾つかのアミノ酸が参照配列中に挿入されてよい。参照配列のこれらの改変は、参照アミノ酸配列のN-末端もしくはC-末端位置に、またはこれら末端位置の間のどこにでも、参照配列中のアミノ酸の間に個々に散在するか、もしくは参照配列内に1以上の接触する集団として散在するかのいずれかにより生じてよい。

【0047】

ここで用いられる「同一性」は、参照ヌクレオチドまたはアミノ酸配列に比較した、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性の尺度である。一般に、配列は最も高い程度的一致が得られるように整列される。「同一性」それ自体は当該技術分野において認識される意味を持ち、公表された技術を用いて算出できる(例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press (1987); および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York (1991)を参照のこと)。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の間で同一性を評価するための幾つかの方法が存在すると同時に、「同一性」との語は当業者に公知である(Carillo, H. & Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 (1988))。2つの配列間の同一性または類似性を決定するため一般に用いられる方法は、Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994) および Carillo, H. & Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 (1988)

に開示される方法を含むがこれらに限定されない。コンピュータプログラムもまた、同一性および類似性を算出する方法およびアルゴリズムを含んでよい。2つの配列間の同一性および類似性を決定するためのコンピュータプログラム法の例は、GCG program package (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12(i):387 (1984)), BLAST P, ExPASy, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990)) および FASTDB を含むがこれらに限定されない。同一性および類似性を決定するための方法の例は、参照により取り込まれる Michaels, G. and Garian, R., Current Protocols in Protein Science, Vol 1, John Wiley & Sons, Inc. (2000) において論じられている。本発明の一実施形態によれば、2以上のポリペプチド間の同一性を決定するために用いられるアルゴリズムはBLASTPである。

【0048】

本発明の別の実施形態によれば、2以上のポリペプチド間の同一性を決定するために用いられるアルゴリズムは、Brutlag et al. (Comp. App. B

10

20

30

40

50

i o s c i . 6 : 2 3 7 - 2 4 5 ( 1 9 9 0 )、参照により取り込まれる)のアルゴリズムに基づいたFASTDBである。FASTDB配列アラインメントにおける、クエリーおよび対象配列はアミノ配列である。配列アラインメントの結果はパーセント同一性による。パーセント同一性を算出するために、アミノ酸配列のFASTDBアラインメントにおいて用いられてよいパラメータは、Matrix = PAM, k-tuple = 2, Mismatch Penalty = 1, Joining Penalty = 20, Randomization Group Length = 0, Cutoff Score = 1, Gap Penalty = 5, Gap Size Penalty 0.05, Window Size = 500または対象アミノ配列の長さのどちらかより短い方、を含むがこれらに限定されない。

10

#### 【0049】

内部での付加または欠失のためではなく、N-末端またはC-末端の付加または欠失のために対象配列がクエリー配列よりも短いまたは長い場合、FASTDBプログラムはパーセント同一性の算出の際に対象配列のN-末端およびC-末端の切断または付加を説明しないため、手動での補正がなされ得る。クエリー配列に対し両端が切断された対象配列のためにパーセント同一性は、一致/整列されない参照配列に対するN-およびC-末端であるクエリー配列のアミノ酸数を、クエリー配列の全アミノ酸のパーセントとして算出することにより補正される。FASTDB配列アラインメントの結果は、一致/整列を決定する。次いで、最終的なパーセント同一性スコアに至るため、上記のFASTDBプログラムにより特定のパラメータを用いて算出されたパーセント同一性から整列パーセン

20

#### 【0050】

例えば、パーセント同一性を決定するために対象配列の90アミノ酸が参照配列の100残基と整列される。対象配列のN-末端に欠失が生じ、そのためにFASTDBアラインメントはN-末端において最初の10残基の一致/整列を示さない。10の不对残基は配列の10%を表し(N-およびC-末端における不一致の残基数/クエリー配列中の全残基数)、従って、10%がFASTDBプログラムにより算出されたパーセント同一性スコアから差し引かれる。もし残りの90残基が完全に一致すれば、最終的なパーセント同一性は90%となり得る。別の例において、対象配列の90残基が参照配列の100残基と比較される。このときの欠失は内部の欠失であり、従って対象配列のN-またはC-末端において、クエリーと一致/整列しない残基は存在しない。

30

#### 【0051】

この場合、FASTDBによって算出されたパーセント同一性は手動では補正されない。

#### 【0052】

本発明のポリリガンドは、単量体の前、後、またはそれらの間にスペーサーアミノ酸を任意に含む。スペーサーの長さおよび組成は様々である。スペーサーの例はグリシン、アラニン、ポリグリシンまたはポリアラニンである。配列番号1においてモノマーの間に使用されるスペーサーの特定の例は、5のアミノ酸スペーサーであるPGAAGおよびPAGGAである。配列番号1の例において、プロリン含有スペーサーは2次構造の破壊を企図する。スペーサーアミノ酸はいずれのアミノ酸でもあってよく、これらのアラニン、グリシン、およびプロリンを含有の例に限定されない。本発明は、スペーサーを有するかまたは有さないホモポリリガンドおよびヘテロポリリガンドの全ての組み合わせに関し、上記または下記の例に限定されない。

40

#### 【0053】

50

本発明のリガンドおよびポリリガンドは、エピトープタグ、レポーターを提供し、および/またはリガンドを細胞の領域へ局在化させるさらなる分子またはアミノ酸へ任意に連結される(図5A-5G、図6A-6G、図7A-7G、および図8A-8Gを参照のこと)。エピトープタグの例はFLAG(商標)、HA(赤血球凝集素)、c-My cおよびHis 6であるがこれらに限定されない。レポーターの例はアルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼおよび蛍光タンパク質であるがこれらに限定されない。細胞局在の例は筋小胞体、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ体、核、細胞膜、頂端膜、および側底膜であるがこれらに限定されない。エピトープ、レポーターおよび局在シグナルは例としての目的で示され、これらに限定されない。エピトープタグ、レポーターおよび/または局在シグナルは同分子であってよい。エピトープタグ、レポーターおよび/または局在シグナルはまた、異なる分子であってもよい。

10

#### 【0054】

リガンドおよびポリリガンドおよびそれらに連結される任意のアミノ酸は、当該技術分野で公知の技術を用いて化学的に、または組み換えにより合成できる。化学的合成技術は、しばしば自動化ペプチド合成装置を用いて行なわれるペプチド合成を含むがこれに限定されない。ペプチドはまた、当該技術分野で公知の非自動化ペプチド合成法を利用して合成できる。組み換え技術はリガンドをコードする核酸の発現ベクターへの挿入を含み、ここで核酸発現産物は細胞因子および工程を用いて合成される。

#### 【0055】

細胞局在シグナル、エピトープタグ、またはレポーターのリガンドまたはポリリガンドへの結合は、リガンドへの共有結合または酵素的結合を含み得る。局在シグナルが脂質または炭水化物のようなポリペプチド以外の物質を含む時、分子結合のための化学反応が利用されてよい。

20

#### 【0056】

加えて、非標準アミノ酸および脂質、炭水化物、リン酸塩、またはその他の分子により修飾されたアミノ酸は、ペプチド合成への前駆体として用いられてよい。

#### 【0057】

本発明のリガンドは、局在シグナルと共に、または局在シグナルなしで治療上の有用性を有する。しかしながら、局在シグナルに連結されたリガンドは、細胞内での手段または治療法としての有用性を持つ。例えば、図7A-7Gに一般的に示された25リガンドは、細胞内での手段または治療法としての有用性を持つリガンドを表す。MEKリガンドを含む遺伝子コンストラクトもまた、遺伝子治療を通じて送達される。図10Bおよび10Cは、in vivoでの送達およびポリペプチド発現の制御のための遺伝子治療ベクターの実施形態を示す。図10Bおよび10Cの遺伝子コンストラクトに連結したポリヌクレオチド配列は、導入遺伝子のウィルスゲノムおよび/またはホストゲノム中への組み込みを促進するためのゲノム組み込みドメインを含む。

30

#### 【0058】

図10AはMEKリガンド遺伝子コンストラクトを含むベクターを示し、ここで当該MEKリガンド遺伝子コンストラクトは、トランスジェニック動物の作製に有用な単位としてベクターから遊離可能である。例えばリガンド遺伝子コンストラクトまたはトランスジェンは、制限酵素消化によりベクター骨格から遊離される。遊離されたトランスジェンはその後マウス受精卵の前核内へ注入されるか、または当該トランスジェンは胚性幹細胞を形質転換するために使用される。図10Aのリガンド遺伝子コンストラクトを含むベクターはまた、トランスジェンの一過性導入にも有用であり、ここでトランスジェンのプロモーターおよびコドンはホスト生物に対して最適化される。図10Aのリガンド遺伝子コンストラクトを含むベクターはまた、少量または大量の産生に適応可能な発酵性の生物におけるポリペプチドの組み換え発現にも有用であり、ここでトランスジェンのプロモーターおよびコドンは発酵ホスト生物に対して最適化される。図10Dは、安定細胞株を作製するために有用なMEKリガンド遺伝子コンストラクトを含むベクターを示す。

40

#### 【0059】

50

本発明はまた、リガンド、ホモポリリガンド、およびヘテロポリリガンドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドも包含する。本発明のポリヌクレオチドは、エピトープ、レポーター、および/または局在シグナルをコードするさらなるヌクレオチド配列へ任意に連結される。さらに、本発明の核酸はベクターポリヌクレオチド中に任意に取り込まれる。当該ポリヌクレオチドには、制限酵素部位およびその他の制限酵素活性に必要なヌクレオチドを含むヌクレオチド配列が任意に隣接する。隣接の配列はベクター内のクローニング部位を任意に提供する。制限酵素部位は、市販のほとんどのクローニングベクター中の一般的に使用される部位のいずれも含み得るが、これらに限定されない。このような部位の例は、BamHI、ClaI、EcoRI、EcoRV、SpeI、AflII、NdeI、NheI、XbaI、XhoI、SphI、NaeI、SexAI、HindIII、HpaI、およびPstI制限酵素により認識される部位である。ホーミングエンドヌクレアーゼを含むその他の制限酵素で切断される部位もまた、この目的のために使用される。ポリヌクレオチドの隣接配列はまた、部分配列クローニングの方向性も任意に提供する。二重鎖DNAがクローニングベクターの対応する相補的部位へ方向性にクローン化できるように、5'および3'制限酵素部位は互いに異なることが好ましい。

10

#### 【0060】

局在シグナル、エピトープもしくはレポーターを有するかまたは有さない、リガンドおよびポリリガンドは、一方で組み換え技術により合成される。ポリヌクレオチド発現コンストラクトは求められる構成要素を含んで作られ、発現ベクター中に挿入される。発現ベクターはその後細胞内にトランスフェクトされ、ポリペプチド産物が発現され分離される。組み換えDNA技術により作られたリガンドは、研究手段および/または治療法としての有用性を持つ。

20

#### 【0061】

以下は、ポリヌクレオチドによりコードされるリガンドおよびポリリガンドがどのように産生されるかについての例である。リガンドをコードする相補的なオリゴヌクレオチドおよび隣接する配列を、合成およびアニールする。得られた二重鎖DNA分子を、当該技術分野で公知の方法を用いてクローニングベクター中に挿入する。リガンドおよびポリリガンドを、タンパク質産物に翻訳されるトランス遺伝子コンストラクトの配列に隣接してインフレームで配置すると、これらは細胞またはトランスジェニック動物内に発現されたときに融合タンパク質の一部を形成する。

30

#### 【0062】

本発明の別の実施形態は、求められる細胞または生物内のトランス遺伝子発現の選択的制御に関する。組み換え遺伝子のプロモーター部は恒常的プロモーター、非恒常的プロモーター、組織特異的プロモーター（恒常的もしくは非恒常的）または選択的制御プロモーターであり得る。異なる選択的制御プロモーターは、異なる機序により制御される。例えば、RheoSwitch（登録商標）はNew England Biolabsより入手可能な誘導プロモーターシステムである。

#### 【0063】

温度感受性プロモーターもまた、遺伝子発現の増加または減少のために使用できる。本発明の実施形態は、その発現が誘導プロモーターにより制御されるリガンドまたはポリリガンド遺伝子コンストラクトを含む。一実施形態によれば、誘導プロモーターはテトラサイクリンにより制御可能である。

40

#### 【0064】

ポリリガンドは本来モジュール式である。本発明の態様は、開示されたポリリガンドの組み合わせのモジュール方式である。本発明の別の態様は、これらモジュール式のポリリガンドの容易かつ簡便な作製方法である。この点において本発明の実施形態は、遺伝的な発現成分のモジュール式部分配列クローニング方法を含む。リガンド、ホモポリリガンド、ヘテロポリリガンドおよび任意のアミノ酸発現成分が組み換え式に合成される際、それぞれのクローン化可能な要素はモジュールとみなすことができる。迅速かつ簡便なクロー

50

ニングのため、付着末端が互換性で、かつ挿入および連続的なクローニングが容易なモジュール式要素の作製が望ましい。これは制限酵素部位の認識および切断の自然特性を利用することにより達成される。本発明の一態様は、モジュールの1末端が1度の制限酵素消化に利用され、かつもう1つの末端が求められる回数の制限酵素消化に利用されるモジュール隣接配列を包含する。言い換えれば、モジュール式要素の連続的なクローニングを達成するため、モジュールの1末端の制限酵素部位が利用されかつ破壊される。翻訳領域モジュールに隣接する制限酵素部位の例は、制限酵素N g o M I VおよびC l a I、あるいはX m a IおよびC l a Iにより認識される配列である。5' N g o M I V突出および3' C l a I突出の直鎖状DNAを得るために第1の環状DNAをN g o M I VおよびC l a Iで切断し、5' C l a I突出および3' X m a I突出の直鎖状DNAを得るために第2の環状DNAをX m a IおよびC l a Iで切断することで、互換性の付着末端を有する第1および第2のDNA断片が生じる。第3の環状DNA断片を形成するため、これら第1および第2のDNA断片を共に混合、アニール、および連結すると、第1のDNA中に存在したN g o M I V部位、および第2のDNA中に存在したX m a I部位は第3の環状DNA中で破壊される。このDNAの痕跡領域はここで、さらなるX m a IまたはN g o M I V消化から保護されるが、第3の環状DNA中に残る隣接配列はなお未変化の5' N g o M I Vおよび3' C l a I部位を含む。方向性の、連続的なモジュール式クローニング事象を達成するため、この工程は多数回反復できる。N g o M I V、X m a IおよびC l a I制限酵素により認識される制限酵素部位は、隣接配列として使用する際に連続的なクローニングを可能にする部位のグループを表す。

#### 【0065】

翻訳領域モジュールを方向性および連続的に構築するための別の方法は、環状DNAに加えて直鎖状DNAを利用する。例えば上記の連続的なクローニング工程のように、翻訳領域モジュールに隣接する制限酵素部位は、制限酵素N g o M I VおよびC l a I、あるいはX m a IおよびC l a Iにより認識される配列である。5' N g o M I V突出および3' C l a I突出の直鎖状DNAを得るために第1の環状DNAをN g o M I VおよびC l a Iで切断する。第2の直鎖状二重鎖DNAを、PCR増幅あるいは合成および相補的なオリゴヌクレオチドをアニールすることによって作製する。第2の直鎖状二重鎖DNAは、直鎖化された第1のDNAと互換性のある付着末端である、5' C l a I突出および3' X m a I突出を有する。第3の環状DNA断片を形成するため、これら第1および第2のDNA断片を共に混合、アニール、および連結すると、第1のDNA中に存在したN g o M I V部位、および第2のDNA中に存在したX m a I部位は第3の環状DNA中で破壊される。第3の環状DNA中に残る隣接配列はなお未変化の5' N g o M I Vおよび3' C l a I部位を含む。方向性の、連続的なモジュール式クローニング事象を達成するため、この工程は多数回反復できる。N g o M I V、X m a IおよびC l a I制限酵素により認識される制限酵素部位は、隣接配列として使用する際に連続的なクローニングを可能にする部位のグループを表す。この工程を図11に示す。

#### 【0066】

当業者は、ここで述べるように他の制限酵素部位グループが連続的な方向性のクローニングを達成できることを認識する。制限酵素選択の好ましい基準は、互換性のある突出末端を作り出すが、その部位が互いの連結により破壊されるエンドヌクレアーゼの対を選択することである。別の基準は、最初の2つのいずれかと互換性のある粘着末端を作らない、第3のエンドヌクレアーゼ部位を選択することである。このような基準が連続的な方向性のクローニングのためのシステムとして利用される際、リガンド、ポリリガンド、およびその他の翻訳領域もしくは発現成分は望まれる通りに組み合わせて構築できる。同じ連続的な工程は、5' エピトープ、レポーター、および/または局在シグナルのために利用できる。

#### 【0067】

M E K活性を調節するための、ポリリガンドおよびポリリガンドの作製法が開示される。治療法は、局在シグナルのある、もしくは無い、精製されたリガンドまたはポリリガ

ドの細胞への送達を含む。あるいは、局在シグナルのある、もしくは無い、リガンドおよびポリリガンドは、細胞内にタンパク質産物を発現するアデノウィルス、レンチウィルス、アデノ随伴ウィルス、またはその他のウィルス性コンストラクトを通して送達される。

#### 【実施例】

#### 【0068】

##### 実施例 1

ヘテロポリリガンド、小胞体細胞局在シグナル、および His 6 エピトープを含むポリペプチドが合成される。このようなポリペプチドの例を、図 8 A、8 B、8 D、8 E および 8 F に一般的に示す。ポリペプチドは自動ペプチド合成装置において合成するか、または組み換え的に発現し、精製される。精製ポリペプチドを培地中で可溶化し、細胞に加える。ポリペプチドは細胞により飲食され、小胞体へ輸送される。検証は抗 His 6 抗体を用いた免疫組織化学染色により行なわれる。

10

#### 【0069】

##### 実施例 2

X a a がアラニンである、配列番号 49、配列番号 48、配列番号 41 (ポリリガンド)、緑色蛍光タンパク質 (レポーター)、および細胞膜局在シグナル (局在シグナル) を含む融合タンパク質の発現を導くため、サイトメガロウィルス (CMV) プロモーターを用いてトランス遺伝子を構築する。このようなトランス遺伝子を図 9 C に一般的に示す。当該トランス遺伝子は、一過性発現のため細胞内にトランスフェクトされる。発現および位置の検証は、共焦点顕微鏡法による緑色蛍光タンパク質の可視化によって行なわれる。

20

#### 【0070】

##### 実施例 3

組織特異的プロモーターによって駆動される発現によるタンパク質産物を産生するため、トランス遺伝子コンストラクトが構築される。トランス遺伝子は、3 個のドメインをコードするために設計された合成遺伝子発現単位を含む。これらの 3 個のドメインはそれぞれ、溶液中でアニールされ、連結され、ベクター中に挿入された相補的なポリヌクレオチドの対として合成される。アミノ末端から始まり、発現単位中の 3 つのドメインは、MEK リガンド、FLAG (商標) エピトープ、および核局在シグナルをコードするヌクレオチド配列である。ここで述べられるように、MEK リガンドは単量体リガンド、ホモ重合体リガンド、またはヘテロ重合体リガンドである。FLAG (商標) エピトープをコードするヌクレオチド配列は、MEK リガンドをコードするヌクレオチド配列の下流に配置される。最後に、局在シグナルをコードするヌクレオチド配列は、FLAG (商標) エピトープをコードするヌクレオチド配列の下流に配置される。図 10 A に示すように、構築された遺伝子発現単位は続いて発現ベクター中へサブクロニングされ、一過性トランスフェクション細胞に使用される。検証は抗 FLAG (商標) 抗体を用いた免疫組織化学染色により行なわれる。

30

#### 【0071】

##### 実施例 4

細胞内に局在する MEK ポリリガンドによる MEK 細胞機能の調節を例証する。ポリリガンド融合タンパク質、エピトープ、および小胞体局在シグナルをコードする核酸を含むトランス遺伝子コンストラクトを作製する。発現単位は、配列番号 25 (ポリリガンド)、c - Myc エピトープ (エピトープ)、および核局在シグナル (局在シグナル) をコードするヌクレオチドを含む。この発現単位は続いてベクターの EF 1 アルファプロモーターと SV 40 ポリアデニル化シグナルの間へサブクロニングされる。完成したトランス遺伝子を含む発現ベクターは、その後細胞のトランスフェクションに使用される。MEK 活性の阻害は、内在性基質のリン酸化をコントロールおよび / または観察される表現型に対して測定することにより示される。

40

#### 【0072】

##### 実施例 5

核を標的とするリガンド融合タンパク質を発現するマウスの作出に使用したトランス遺

50



伝子コンストラクトの作製により、リガンド機能および局在を *in vivo* で示す。このトランス遺伝子コンストラクトを図 10B に一般的に示す。発現単位は、配列番号 33 のテトラマー、赤血球凝集素エピトープ、および核局在シグナルをコードするヌクレオチドを含む。この発現単位は続いてベクターの誘導性プロモーターを含むヌクレオチド配列の間と SV40 ポリアデニル化シグナルを含むヌクレオチド配列の間へサブクロニングされる。完成したトランス遺伝子は、その後受精したマウスの卵母細胞の前核内へ注入される。得られた仔を、トランス遺伝子の存在について PCR によりスクリーニングする。トランスジェニックのファウンダーマウスを野生型マウスと共に繁殖させる。少なくとも第 3 世代からのヘテロ接合トランスジェニック動物は、コントロールとして供給される非トランスジェニック同腹仔と共に以下の試験に使用される。

10

#### 【0073】

試験 1：コピー数の決定のため、サザンブロット分析を行なう。サザンブロットは、トランス遺伝子の断片から作られた放射性標識プローブとハイブリダイズさせる。プローブはトランスジェニックマウスからの DNA を含むバンドを検出するが、非トランスジェニックマウスからの DNA を含むバンドは検出しない。コピー数を推定するため、トランスジェニックマウスのバンドの強度を測定し、トランス遺伝子プラスミドコントロールバンドと比較する。これは、実施例 5 のマウスがトランス遺伝子とそのゲノム中に取り込んでいることを示す。

#### 【0074】

試験 2：ウェスタンブロット分析のため、組織ホモジネートを調製する。この実験は、赤血球凝集素エピトープがトランスジェニックホモジネート中には検出されるが非トランスジェニックホモジネート中には検出されないことから、トランス遺伝子がトランスジェニックマウスの組織中に発現することを示す。

20

#### 【0075】

試験 3：発現誘導の後、コントロールに対する表現型の観察または分析によって機能を評価する。

#### 【0076】

これらの実施例は、治療または実験の目的による、細胞の局在領域へのリガンドの送達を示す。精製されたポリペプチドリガンドは、経口もしくは非経口投与、局所投与のために、または錠剤、カプセル、もしくは液剤の形態、鼻腔内もしくは吸入エアロゾルとして、皮下、筋肉内、腹腔内、もしくはその他の注射；静脈内点滴；またはその他のいずれの投与経路のために処方できる。さらに、リガンドをコードするヌクレオチド配列は、細胞内に遺伝子産物を送達および発現するために設計されたベクター中への取り込みを可能にする。このようなベクターはプラスミド、コスミド、人工染色体、および改変ウィルスを含む。真核細胞への送達は *in vivo* または *ex vivo* にて達成できる。*ex vivo* での送達方法は、目的のレシピエント細胞またはドナー細胞の分離、およびこれらの細胞へのベクターの送達に続き、レシピエントを細胞で治療することを含む。

30

#### 【0077】

#### 実施例 6

本発明のリガンドをベータ - ガラクトシダーゼに融合させ、融合タンパク質を構築した。

40

#### 【0078】

図 12 に、配列番号 33 のポリリガンドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 12 のベクターにおいて、配列番号 33 のリガンドをコードするポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

#### 【0079】

図 13 に、配列番号 1 のリガンドをコードする、配列番号 2 のポリヌクレオチドを含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 13 のベクターにおいて、配列番号 2 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコード

50

するポリヌクレオチドに連結される。

【 0 0 8 0 】

図 1 4 に、配列番号 5 のリガンドをコードする、配列番号 6 のポリヌクレオチドを含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 1 4 のベクターにおいて、配列番号 6 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

【 0 0 8 1 】

図 1 5 に、配列番号 9 のリガンドをコードする、配列番号 1 0 のポリヌクレオチドを含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 1 5 のベクターにおいて、配列番号 1 0 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

10

【 0 0 8 2 】

図 1 6 に、配列番号 1 3 のリガンドをコードする、配列番号 1 4 のポリヌクレオチドを含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 1 6 のベクターにおいて、配列番号 1 4 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

【 0 0 8 3 】

図 1 7 に、配列番号 1 7 のリガンドをコードする、配列番号 1 8 のポリヌクレオチドを含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 1 7 のベクターにおいて、配列番号 1 8 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

20

【 0 0 8 4 】

図 1 8 に、配列番号 2 1 のリガンドをコードする、配列番号 2 2 のポリヌクレオチドを含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 1 8 のベクターにおいて、配列番号 2 2 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

【 0 0 8 5 】

図 1 9 に、配列番号 2 5 のリガンドをコードする、配列番号 2 6 を含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 1 9 のベクターにおいて、配列番号 2 6 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

30

【 0 0 8 6 】

図 2 0 に、配列番号 2 5 のリガンドをコードする、配列番号 2 6 を含む別のベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 2 0 のベクターにおいて、配列番号 2 6 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

【 0 0 8 7 】

図 2 1 に、配列番号 2 9 のリガンドをコードする、配列番号 3 0 を含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 2 1 のベクターにおいて、配列番号 3 0 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

40

【 0 0 8 8 】

図 2 2 に、配列番号 2 9 のリガンドをコードする、配列番号 3 0 を含む別のベクターを示す。融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 2 2 のベクターにおいて、配列番号 3 0 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

【 0 0 8 9 】

図 2 3 に、配列番号 3 3 のリガンドをコードする、配列番号 3 4 を含むベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 2 3 のベクターにおいて、配列番号 3 4 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌク

50

レオチドに連結される。

#### 【 0 0 9 0 】

図 2 4 に、配列番号 3 3 のリガンドをコードする、配列番号 3 4 を含む別のベクターを示す。リガンド融合タンパク質コーディング配列を作り出すため、図 2 4 のベクターにおいて、配列番号 3 4 のポリヌクレオチドは、ベータ - ガラクトシダーゼをコードするポリヌクレオチドに連結される。

#### 【 0 0 9 1 】

図 1 2 ~ 2 4 のベクターを、哺乳類細胞株 H T 1 0 8 0 内へトランスフェクトした。M E K の基質である E R K をコードするポリヌクレオチドを含むベクターもまた、H T 1 0 8 0 細胞内へトランスフェクトした。トランスフェクションは、R o c h e ( パーゼル、スイス ) より購入した F u g e n e 6 試薬を用い、製造者の仕様書に従って行なった。簡単に述べると、細胞を 6 ウェルプレートへ、ウェルあたり、1 0 % F B S を含む D M E M 2 m l 中に 3 0 0 , 0 0 0 の濃度でまいた。2 4 時間後、各ウェルのトランスフェクション複合体を、1  $\mu$  g のプラスミド D N A を 3  $\mu$  g の F u g e n e 6 と混合し、無血清 D M E M 中に溶解した 1 0 0  $\mu$  l の D N A / 脂質複合体を得ることにより調製した。複合体を適切に形成する 3 0 分間のインキュベーションの後、1 0 0  $\mu$  l の混合物を、2 m l の培地中で増殖している細胞の各ウェルへ加えた。細胞を D N A / 脂質複合体に 2 4 時間曝露し、続いて R N A およびタンパク質分析のために溶解した。

#### 【 0 0 9 2 】

図 2 5 に、図 1 2 ~ 1 8 および図 2 0 , 2 2 および 2 4 のベクターによりコードされるリガンド融合タンパク質の溶解物の、タンパク質分析の結果を示す。リガンド融合タンパク質は、R o c h e からのベータ - ガラクトシダーゼ E L I S A キット ( # 1 1 5 3 9 4 2 6 0 0 1 ) を用い、キットのプロトコルに従って定量した。値は 2 回の反復の平均を示すが、V V N - 4 0 6 4 7 は 1 回の反復の値を示す。

#### 【 0 0 9 3 】

リガンド融合タンパク質を含む溶解物は、M E K 1 タンパク質または M E K 2 タンパク質への結合を検出するため、以下のプロトコルを用いてタンパク質ドット - プロット結合アッセイによりアッセイした。

- 1 . ニトロセルロース膜を T B S 中に 5 分間浸漬する。
- 2 . 予め浸漬したニトロセルロース膜をドット - プロット装置の中へ配置し、減圧してねじを固く締めることにより装置を密閉する。
- 3 . 1 0 0  $\mu$  l の T B S を各ウェルに加えることにより、ニトロセルロース膜を再水和する。短い間減圧するが、ウェルを完全に乾燥させてはならない。
- 4 . ドット - プロット装置の流量バルブ / 減圧チャンバーが外気へ開いていることを確認し、ウェルあたりの標的タンパク質の最終アッセイ量が 5 0 n g になるように、0 . 5 n g /  $\mu$  l の M E K 1 または M E K 2 標的タンパク質溶液のいずれか 1 0 0  $\mu$  l でウェルを満たす。
- 5 . 標的タンパク質を室温で 4 0 分間、重力流により膜を通して濾過した後、残余の液体を減圧濾過により膜を通して排水する。
- 6 . 3 0 0  $\mu$  l の 5 % 脱脂粉乳 T B S 溶液を加え、室温で 1 時間ウェルをブロッキングする。
- 7 . 各ウェルから 5 % ブロッキング溶液を注意深く吸引する。
- 8 . 1 0 0  $\mu$  l の T B S を加え、各ウェルを 1 回洗浄する。減圧濾過により、膜を通して T B S を除去する。
- 9 . 試験される各 M E K 阻害剤溶解物の 0 . 1 n g /  $\mu$  l 溶液を、各ウェルの阻害剤の最終アッセイ量が 1 0 n g になるように、M E K 1 タンパク質を含む 1 ウェルおよび M E K 2 タンパク質を含む 1 ウェルへ 1 0 0  $\mu$  l ずつ加える。阻害剤溶解物を M E K 1 / 2 標的タンパク質と共に室温で 4 0 分間インキュベートした後、残余の溶解物を減圧濾過により膜を通して排水する。

- 1 0 . 1 0 0  $\mu$  l の、1 % S D S 、 T B S 溶液を加えて各ウェルを洗浄する。減圧濾過

により、膜を通して1% SDS、TBS溶液を除去する。全3回の洗浄のため、この洗浄過程をさらに2回繰り返す。

11. 減圧し、ペンまたは鉛筆で膜に印を付ける(装置から取り出した後、膜が再び整列できるように)。

12. 減圧を停止して、装置から膜を取り外す。

13. 膜をペトリ皿(または均等容器)中に配置し、1% SDS、TBS溶液で穏やかに攪拌しながら5分間洗浄する(膜全体を覆うため、十分な1% SDS、TBS溶液を加える)。全5回の洗浄のため、この洗浄過程をさらに4回繰り返す。

14. 膜から過剰のSDS界面活性剤を除くため、膜をTBS中で1回(工程13に記述したように)洗浄する。

15. 工程2に記述したように、膜をドット-プロット装置に戻す。

16. 各ウェルに100  $\mu$ LのBeta-Gloペータ-ガラクトシダーゼ基質を加え、室温で30分間インキュベートする。

17. 膜を通してBeta-Glo基質を減圧濾過し、装置から膜を取り外して、化学発光検出のためにFluorChemイメージャーセット中で膜を15分間曝露する。

#### 【0094】

このアッセイでは以下の材料を使用した：

1. ドット-プロット装置(Bio-Radまたは均等物)
2. トリス(Sigma #252859または均等物)
3. SDS(ICN #811034または均等物)
4. NaCl(EMD #7647-14-5または均等物)
5. Beta-Gloアッセイキット(Promega #E4740)
6. Mek1(Cell Signaling #M02-10G-10または均等物)
7. Mek2(Cell Signaling #M03-10G-10または均等物)
8. FluorChemイメージャー(Alpha Innotechまたは均等物)

。

#### 【0095】

その後イメージデータを以下のプロトコルを用いて定量化した：

1. ソフトウェアアプリケーション、ImageJにてドットプロットイメージを開く。
2. 第1の列の輪郭を描くため、四角のselectionツールを用いる。
3. スペシャルメニューの中のMark First Laneを選択する。
4. 四角のselectionを移動させ(中をクリックし、ドラッグすることにより)、連続的にその他の各レーンの輪郭を描く(Mark Next Laneを使用する)。
5. レーンプロファイルプロットを作成するため、Plot Lanesを使用する。
6. 上に示したように各ピークが近接の領域を限定できるよう、ベースラインおよびドロップラインを描くためにline drawingツールを使用する。
7. wandツールで連続的に、それぞれの内部をクリックすることにより、ピークの面積を測定する。
8. ピーク測定データファイル(ドット強度の値)はその後、Microsoft Excelファイルとして保存でき、標準化およびグラフ化される。

#### 【0096】

図26はタンパク質ドットプロット結合アッセイのイメージ分析の結果を表し、幾つかの融合タンパク質がMEK1および/またはMEK2に対して結合活性を示すことを表す。

#### 【0097】

MEK活性を調節するリガンドおよびポリリガンド、ならびにこれらのリガンドの作製法および使用法が開示される。リガンドおよびポリリガンドは、化学的に、または組み換えにより合成され、研究手段または治療法として利用される。本発明は細胞内での治療法

10

20

30

40

50

のための、リガンドおよびポリリガンドの細胞局在シグナルへの連結を含む。

本発明は以下の態様を含み得る。

[ 1 ]

配列番号 1 または配列番号 5 または配列番号 9 または配列番号 13 または配列番号 17 または配列番号 21 または配列番号 25 または配列番号 29 または配列番号 33 に少なくとも約 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

[ 2 ]

単離されたキメラポリペプチドホモポリリガンドであって、その単量体が、X a a がいずれのアミノ酸でもある配列番号 41 ~ 51 のいずれか 1 に少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択される、キメラポリペプチドホモポリリガンド。

10

[ 3 ]

単離されたキメラポリペプチドヘテロポリリガンドであって、その単量体が、X a a がいずれのアミノ酸でもある配列番号 41 ~ 51 のいずれか 1 に少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含むポリペプチドからなる群より選択される、キメラポリペプチドヘテロポリリガンド。

[ 4 ]

X a a として示される少なくとも 1 のアミノ酸がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸である配列番号 41 ~ 51 のいずれから選択される 2 以上のポリペプチドを含む、単離されたキメラポリペプチド。

20

[ 5 ]

前記 2 以上のポリペプチドが配列番号 41 ~ 48 から選択される、請求項 4 に記載の単離されたキメラポリペプチド。

[ 6 ]

前記 2 以上のポリペプチドが配列番号 49 ~ 51 から選択される、請求項 4 に記載の単離されたキメラポリペプチド。

[ 7 ]

単離されたキメラポリペプチドホモポリリガンドであって、前記ホモポリリガンドが M E K 活性を調節するキメラポリペプチドホモポリリガンド。

30

[ 8 ]

単離されたキメラポリペプチドヘテロポリリガンドであって、前記ヘテロポリリガンドが M E K 活性を調節するキメラポリペプチドヘテロポリリガンド。

[ 9 ]

a) 配列番号 37 のアミノ酸残基 218 および / または 222 に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号 37 のアミノ酸残基 213 ~ 225 に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも 80 % 同一なペプチド ;

b) 配列番号 37 のアミノ酸残基 218 および / または 222 に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号 37 のアミノ酸残基 211 ~ 227 に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも 80 % 同一なペプチド ;

40

c) 配列番号 37 のアミノ酸残基 218 および / または 222 に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号 37 のアミノ酸残基 208 ~ 229 に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも 80 % 同一なペプチド ; および

d) 配列番号 37 のアミノ酸残基 218 および / または 222 に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号 37 のアミノ酸残基 210 ~ 231 に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも 80 % 同一なペプチドからなる群より選択されるペプチドの少なくとも 1 コピーを含む、M

50

E Kのポリペプチド阻害物質。

[ 1 0 ]

a) 配列番号37のアミノ酸残基298および/または300に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号37のアミノ酸残基293～305に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチド；

b) 配列番号37のアミノ酸残基298および/または300に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号37のアミノ酸残基291～308に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチド；

c) 配列番号37のアミノ酸残基298および/または300に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号37のアミノ酸残基290～309に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチド；および

d) 配列番号37のアミノ酸残基298および/または300に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号37のアミノ酸残基289～310に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチドからなる群より選択されるペプチドの少なくとも1コピーを含む、M E Kのポリペプチド阻害物質。

[ 1 1 ]

a) 配列番号38のアミノ酸残基202および/または204に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号38のアミノ酸残基199～210に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチド；

b) 配列番号38のアミノ酸残基202および/または204に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号38のアミノ酸残基198～217に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチド；

c) 配列番号38のアミノ酸残基202および/または204に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号38のアミノ酸残基187～211に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチド；および

d) 配列番号38のアミノ酸残基202および/または204に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号38のアミノ酸残基191～211に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチドからなる群より選択されるペプチドの少なくとも1コピーを含む、M E Kのポリペプチド阻害物質。

[ 1 2 ]

a) 配列番号39のアミノ酸残基185および/または187に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号39のアミノ酸残基170～194に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチド；

b) 配列番号39のアミノ酸残基185および/または187に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号39のアミノ酸残基174～198に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチド；

c) 配列番号39のアミノ酸残基185および/または187に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号39のアミノ酸残基176～197に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも80%同一なペプチド；および

10

20

30

40

50

d) 配列番号 39 のアミノ酸残基 185 および / または 187 に相当するアミノ酸残基がセリン、チロシン、またはスレオニン以外のアミノ酸残基へ変異している、配列番号 39 のアミノ酸残基 179 ~ 193 に相当するアミノ酸残基を含むペプチドに少なくとも 80 % 同一なペプチドからなる群より選択されるペプチドの少なくとも 1 コピーを含む、M E K のポリペプチド阻害物質。

[ 1 3 ]

細胞内局在シグナル、レポーター、および / またはエピトープタグへ連結される、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

[ 1 4 ]

少なくとも 2 の単量体リガンドを含む組成物であって、前記リガンドそれぞれの少なくとも 1 部分が M E K により認識可能であり、かつ前記リガンドの少なくとも 1 が M E K によりリン酸化可能なアミノ酸を含まない組成物。

[ 1 5 ]

前記組成物がホモ重合体リガンドである、請求項 14 に記載の組成物。

[ 1 6 ]

少なくとも 2 の前記単量体リガンドの間にスペーサーアミノ酸をさらに含む、請求項 15 に記載の組成物。

[ 1 7 ]

局在シグナル、レポーター、および / またはエピトープタグをさらに含む、請求項 15 に記載の組成物。

[ 1 8 ]

前記組成物がヘテロ重合体リガンドである、請求項 14 に記載の組成物。

[ 1 9 ]

少なくとも 2 の前記単量体リガンドの間にスペーサーアミノ酸をさらに含む、請求項 18 に記載の組成物。

[ 2 0 ]

局在シグナル、レポーター、および / またはエピトープタグをさらに含む、請求項 18 に記載の組成物。

[ 2 1 ]

請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[ 2 2 ]

請求項 21 に記載の核酸分子を含むベクター。

[ 2 3 ]

請求項 22 に記載のベクターを含む組み換え宿主細胞。

[ 2 4 ]

細胞内で M E K を阻害する方法であって、請求項 22 に記載のベクターを宿主細胞内へトランスフェクトすること、および前記ポリペプチドの少なくとも 1 コピーを産生するための適切な条件下で前記トランスフェクトされた宿主細胞を培養することを含む方法。

[ 2 5 ]

請求項 24 に記載のポリペプチドのそれぞれをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドの 1 末端に第 1 の制限酵素によって切断可能な配列が隣接し、かつ前記ポリヌクレオチドのもう 1 つの末端に第 2 の制限酵素によって切断可能な配列が隣接し、かつ第 1 および第 2 の制限酵素が非互換性の付着末端を生じるポリヌクレオチド。

[ 2 6 ]

請求項 24 に記載のポリペプチドのそれぞれをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドの 1 末端に N g o M I V によって切断可能な配列が隣接し、かつ前記ポリヌクレオチドのもう 1 つの末端に X m a I および C l a I によって切

10

20

30

40

50

断可能な配列が隣接するポリヌクレオチド。

【図 1】

リガンド X	リガンド X
--------	--------

図 1A

リガンド X	リガンド X	リガンド X
--------	--------	--------

図 1B

リガンド X	リガンド X	リガンド X	リガンド X	リガンド X
--------	--------	--------	--------	--------

図 1C

【図 2】

リガンド X	スペーサー	リガンド X
--------	-------	--------

図 2A

リガンド A	スペーサー	リガンド A	スペーサー	リガンド A
--------	-------	--------	-------	--------

図 2B

リガンド X	リガンド X	スペーサー	リガンド X	スペーサー	リガンド X
--------	--------	-------	--------	-------	--------

図 2C

【図 3】

リガンド X	リガンド Y
--------	--------

図 3A

リガンド X	リガンド Y	リガンド Z
--------	--------	--------

図 3B

リガンド X	リガンド Y	リガンド X	リガンド Z	リガンド A
--------	--------	--------	--------	--------

図 3C

リガンド A	リガンド B	リガンド C	リガンド D
--------	--------	--------	--------

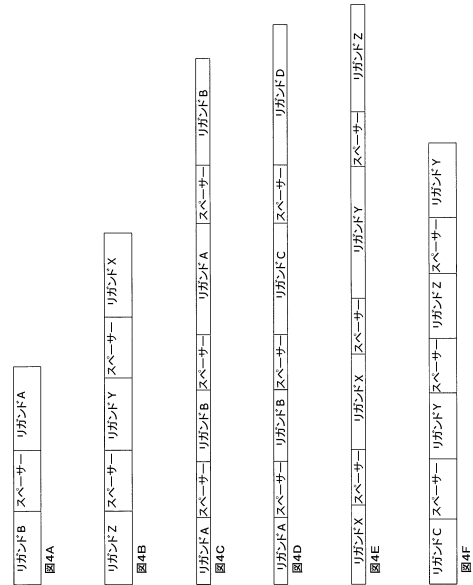
図 3D

リガンド A	リガンド A	リガンド B	リガンド C
--------	--------	--------	--------

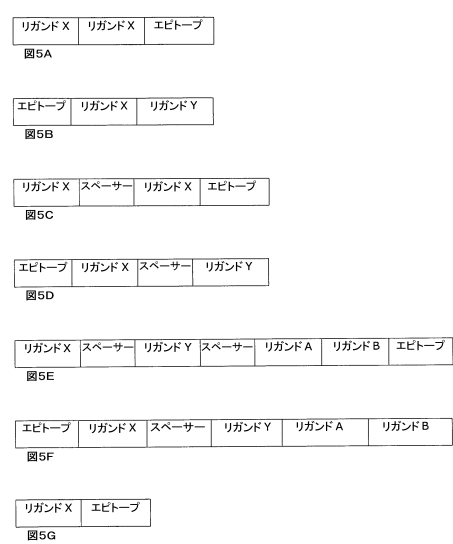
図 3E



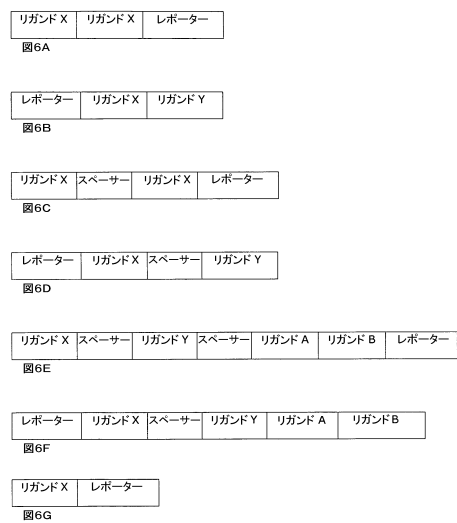
【図 4】



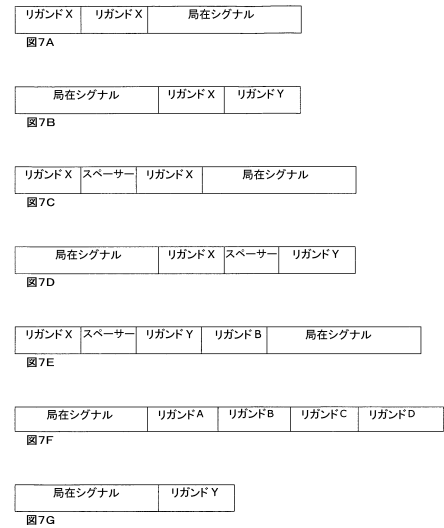
【図 5】



【図 6】



【図 7】



## 【図 8】

リガンド A	リガンド B	リガンド C	リガンド D	エビトープ	局在シグナル
--------	--------	--------	--------	-------	--------

図 8A

局在シグナル	リガンド X	リガンド Y	エビトープ
--------	--------	--------	-------

図 8B

エビトープ	リガンド X	スパーサー	リガンド X	局在シグナル
-------	--------	-------	--------	--------

図 8C

局在シグナル	リガンド X	スパーサー	リガンド Y	エビトープ
--------	--------	-------	--------	-------

図 8D

エビトープ	リガンド X	リガンド Y	リガンド B	局在シグナル
-------	--------	--------	--------	--------

図 8E

局在シグナル	リガンド Z	スパーサー	リガンド Y	リガンド B	エビトープ
--------	--------	-------	--------	--------	-------

図 8F

エビトープ	リガンド B	局在シグナル
-------	--------	--------

図 8G

## 【図 9】

プロモーター	リガンドまたはポリリガンド	エビトープ	局在シグナル	停止	ポリ-A
--------	---------------	-------	--------	----	------

図 9A

プロモーター	任意のレポーター	任意のエビトープ	リガンドまたはポリリガンド	任意の局在シグナル	停止	ポリ-A
--------	----------	----------	---------------	-----------	----	------

図 9B

プロモーター	リガンドまたはポリリガンド	レポーター	局在シグナル	停止	ポリ-A
--------	---------------	-------	--------	----	------

図 9C

プロモーター	リガンドまたはポリリガンド	任意のエビトープ	任意のレポーター	任意の局在シグナル	停止	ポリ-A
--------	---------------	----------	----------	-----------	----	------

図 9D

プロモーター	リガンドまたはポリリガンド	局在シグナル	停止	ポリ-A
--------	---------------	--------	----	------

図 9E

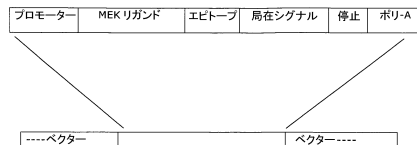
プロモーター	局在シグナル	リガンドまたはポリリガンド	停止	ポリ-A
--------	--------	---------------	----	------

図 9F

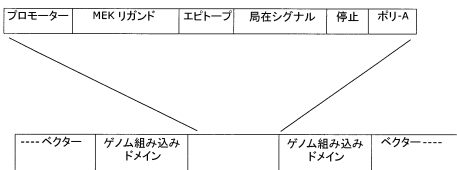
プロモーター	リガンドまたはポリリガンド	停止	ポリ-A
--------	---------------	----	------

図 9G

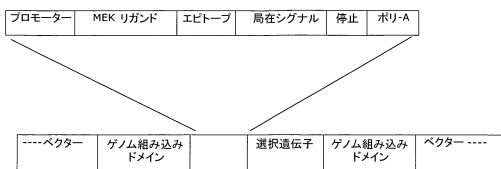
## 【図 10A】



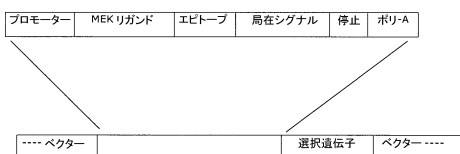
## 【図 10B】



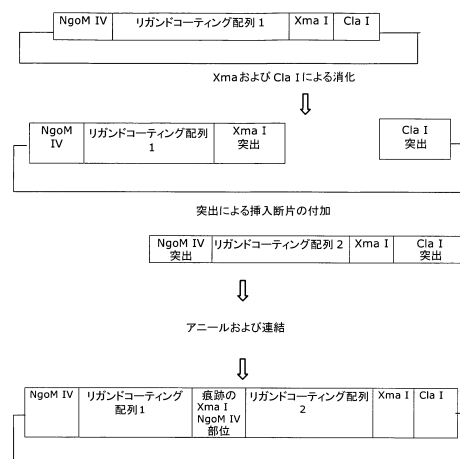
## 【図 10C】



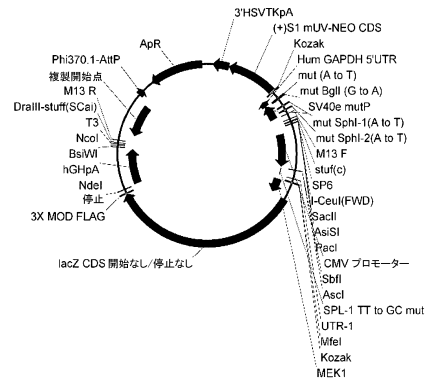
## 【図 10D】



## 【図 11】

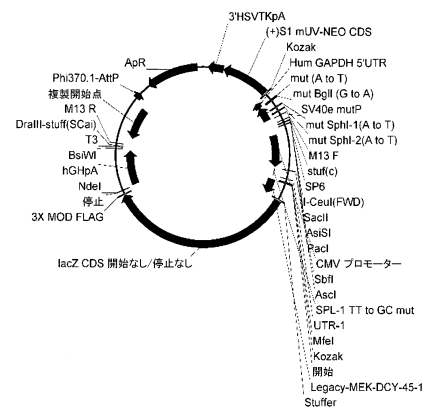


【図 12】



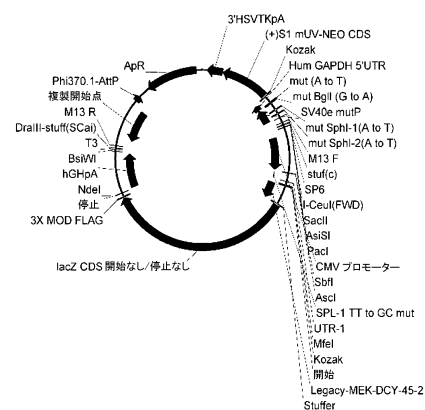
VVN-3836 内の VVN-40637 CMV UTR-1 Kozak MEK1 LacZ hGHPA

【図 13】



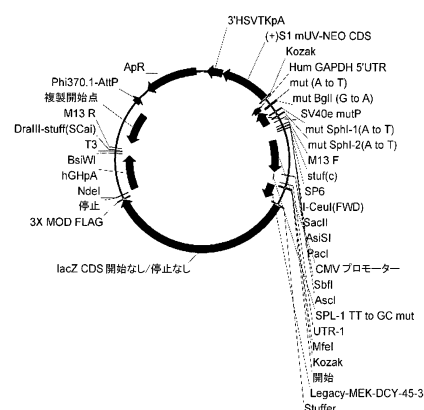
VVN-3836 内の VVN-40639 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-DCY-45-1 LacZ hGHPA

【図 14】



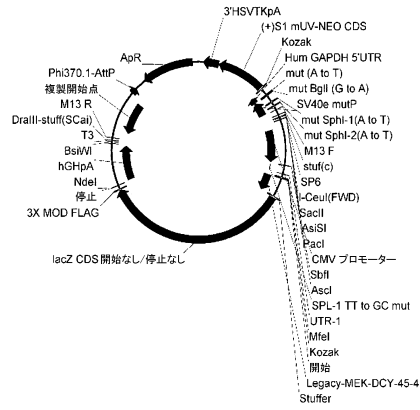
VVN-3836 内の VVN-40641 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-DCY-45-2 LacZ hGHPA

【図 15】



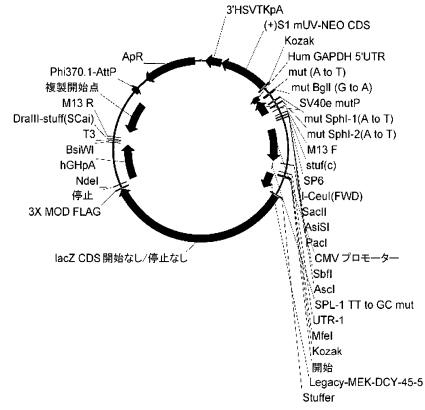
VVN-3836 内の VVN-40643 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-DCY-45-3 LacZ hGHPA

【図 16】



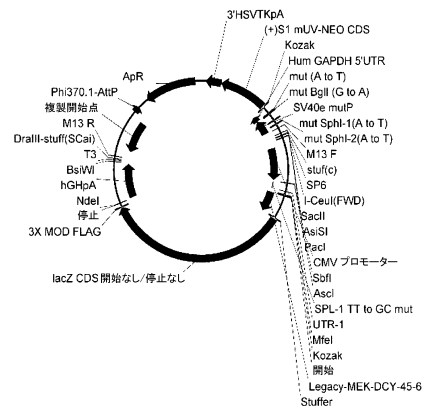
VVN-3836 内の VVN-40645 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-4 LacZ hGHpA

【図 17】



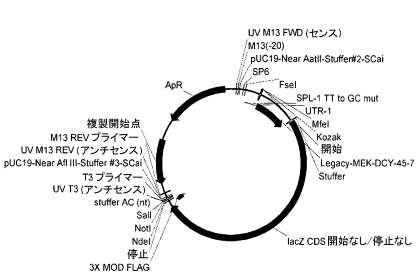
VVN-3836 内の VVN-40647 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-5 LacZ hGHpA

【図 18】



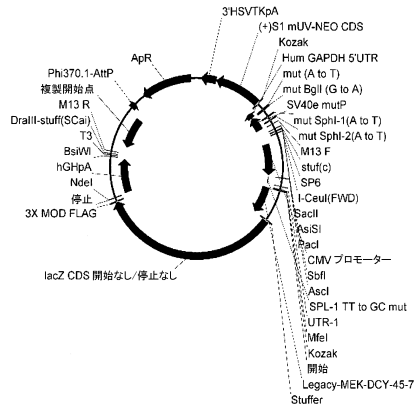
VVN-3836 内の VVN-40649 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-Dcy-45-6 LacZ hGHpA

【図 19】



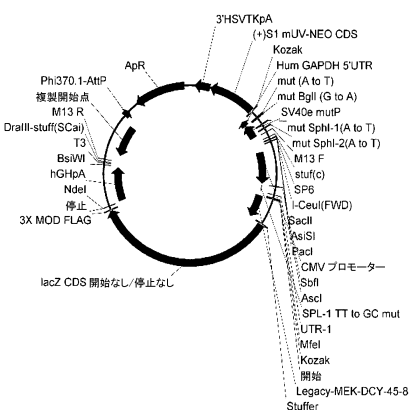
VVN-3688 内の VVN-40650 UTR-1 Legacy-MEK-Dcy-45-7 LacZ

【図 20】



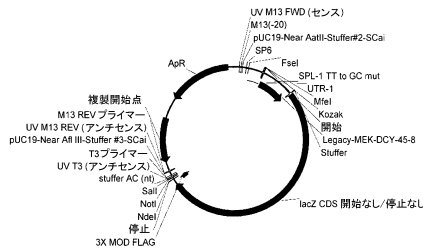
VVN-3836 内の VVN-40651 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-DCY-45-7 LacZ hGHpA

【図 22】



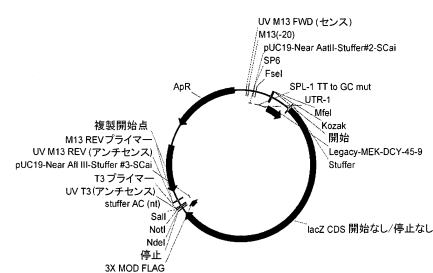
VVN-3836 内の VVN-40653 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-DCY-45-8 LacZ hGHpA

【図 21】



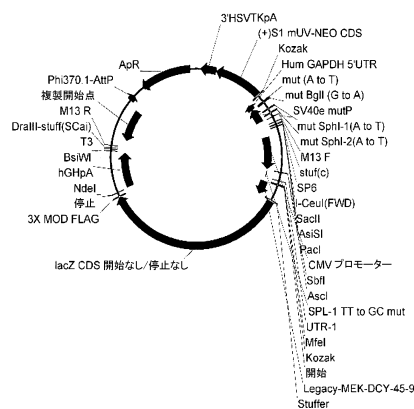
VVN-3688 内の VVN-40652 UTR-1 Legacy-MEK-DCY-45-8 LacZ

【図 23】



VVN-3688 内の VVN-40654 UTR-1 Legacy-MEK-DCY-45-9 LacZ

【図 24】



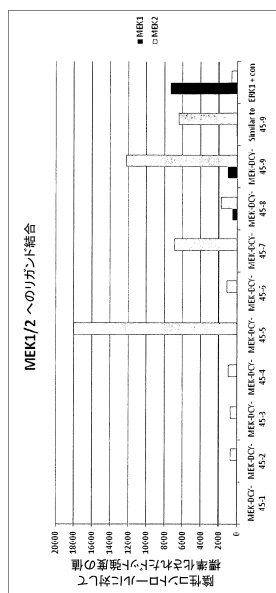
VVN-3836 内の VVN-40655 CMV UTR-1 Kozak Legacy-MEK-DCY-45-9 LacZ hGHpA

【図 25】

トランスフェクションに使用したベクター (ベクター番号)	ベクター 図番号	リガンド名	リガンド 配列番号	ライセート中のリガンド 融合タンパク質の 平均濃度 (ng/ml)	標準 偏差
VVN-40637	12	45-9に類似	33	50.16	6.65
VVN-40639	13	MEK-DCY-45-1	1	8.79	0.39
VVN-40641	14	MEK-DCY-45-2	5	9.80	0.45
VVN-40643	15	MEK-DCY-45-3	9	25.34	0.95
VVN-40645	16	MEK-DCY-45-4	13	5.14	0.16
VVN-40647*	17	MEK-DCY-45-5	17	32.03	N/A
VVN-40649	18	MEK-DCY-45-6	21	28.57	2.29
VVN-40651	20	MEK-DCY-45-7	25	43.10	3.24
VVN-40653	22	MEK-DCY-45-8	29	36.26	3.42
VVN-40655	24	MEK-DCY-45-9	33	183.81	32.29
ERK 陽性コントロール	N/A	ERK1 + con	38	213.10	55.99

\* VVN-40647 のデータは1回の反復の値を表す (その他の反復は検出限界未満)

【 図 2 6 】



【配列表】

0005611814000001.xml

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	9/99	(2006.01)	C 1 2 N 9/99
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00

- (72)発明者 バチンスキー, デイビッド  
 アメリカ合衆国 バージニア州 2 4 0 6 0, ブラックスバーグ, アパート シー, コッパークロ  
 フトドライブ 1 3 4 0 0
- (72)発明者 カーソン, ジョナソン  
 アメリカ合衆国 バージニア州 2 4 0 6 0, ブラックスバーグ, アパート 4 2 0 4, エス. ノ  
 ルウッドドライブ 2 1 5
- (72)発明者 アッゼル, エイミー  
 アメリカ合衆国 ミネソタ州 5 5 4 0 7, ミネアポリス, 1 2 番アベニューサウス 3 1 1 6
- (72)発明者 リード, トマス  
 アメリカ合衆国 バージニア州 2 4 0 6 0, ブラックスバーグ, アッシュローンドライブ 2 9  
 0 5

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 5 1 9 9 3 (WO, A 1)  
 国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 8 9 1 7 (WO, A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 UniProt / GeneSeq  
 PubMed  
 C A p l u s / B I O S I S ( S T N )  
 Thomson Innovation