

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-253264

(P2008-253264A)

(43) 公開日 平成20年10月23日(2008.10.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C O 8 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-98368 (P2008-98368)
 (22) 出願日 平成20年4月4日(2008.4.4)
 (62) 分割の表示 特願2006-211171 (P2006-211171)
 の分割
 原出願日 平成7年3月7日(1995.3.7)
 (31) 優先権主張番号 207975
 (32) 優先日 平成6年3月8日(1994.3.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 312023
 (32) 優先日 平成6年9月26日(1994.9.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 384524
 (32) 優先日 平成7年2月13日(1995.2.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591011502
 ワイス
 W y e t h
 アメリカ合衆国 07940-0874 ニュ
 ージャージー州 マディソン、ファイブ・
 ジラルダ・ファームズ
 (71) 出願人 306018457
 ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア・
 ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・オブ
 ・ニューヨーク
 アメリカ合衆国・ニューヨーク・1002
 7・ニュー・ヨーク・ウエスト・ワンハン
 ドレッドシックスティーンズ・ストリート
 ・535

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラパマイシンのエフェクタータンパク

(57) 【要約】

【目的】免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-F K B P 1 2 結合タンパクを提供すること。

【構成】免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-F K B P 1 2 結合タンパクおよびそれらの断片、ならびに、これらタンパクに対応するDNA、cDNA、アンチセンスRNAおよびDNAセグメント。さらに、これらタンパクを単離する方法、ならびに、これらタンパクに関連する治療上の使用。

【効果】免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-F K B P 1 2 結合タンパクなどが提供される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S D S - P A G E で測定した場合に分子量が約 2 1 0 k D a である単離されたタンパクであって、ヒトから得ることができ、F K B P 1 2 - ラパマイシン複合体に結合し、F K B P 1 2 - ラパマイシン複合体の免疫抑制活性を媒介する、タンパク。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のタンパクをコードする単離された D N A であって、

a) 請求項 1 に記載の単離されたタンパクをプロテアーゼで消化し、少なくとも一つのタンパクの断片を得；

b) 少なくとも一つのタンパクの断片を単離してその断片を配列決定し；および

c) そのタンパクの断片の配列からオリゴヌクレオチドプローブを得、そのプローブを用いて c D N A ライブラリーをスクリーニングし、該タンパクをコードする D N A を同定する

ことで得られる D N A 。

【請求項 3】

請求項 1 のタンパクに特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体。

【請求項 4】

免疫抑制薬を服用している個体から得られる生物学的試料中の親化合物および/または代謝産物を測定するための請求項 3 に記載のモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用。

【請求項 5】

S D S - P A G E で測定した場合に分子量が約 2 1 0 k D a であり、ヒト細胞由来の F K B P 1 2 - ラパマイシン複合体に結合する、タンパクを単離する方法であって、

a) 緩衝剤、キレート剤、プロテアーゼ阻害剤、還元剤、および低濃度の塩の存在下、タンパク分解を最小限に抑える温度で、哺乳動物細胞を溶解し、未破壊細胞、細胞核、および、細胞膜画分と細胞破砕物を含む溶解物を生成させ、

b) タンパク分解を最小限に抑える温度で、該溶解物から未破壊細胞および細胞核を前除去し、前清澄化溶解物を調製し、

c) 該前清澄化溶解物に由来する、膜タンパクを含有する哺乳動物細胞の細胞膜画分を濃縮し、

d) タンパク分解を最小限に抑える温度で、タンパクの有害な変性を引き起こすことなく、タンパクを可溶化する界面活性剤を含有する緩衝液中に該膜タンパクを可溶化し、可溶化タンパクおよび哺乳動物細胞破砕物を得て、

e) 哺乳動物細胞破砕物から可溶化タンパクを分離し、

f) 緩衝剤、還元剤、1 種またはそれ以上のプロテアーゼ阻害剤、二価カチオン、および塩を含有する緩衝液中に可溶化タンパクを含有する溶液を、アフィニティーマトリックスと共にインキュベートすることにより、該アフィニティーマトリックスへの結合を可能にし、かつ、タンパク分解を最小限に抑える温度で、該アフィニティーマトリックスに対する結合親和性を有するタンパクを該アフィニティーマトリックスに吸着させ、

g) タンパク分解を最小限に抑える温度で、工程 (f) の溶液からアフィニティーマトリックスを分離することにより、工程 (f) のアフィニティーマトリックスには結合しない可溶化タンパクを含有する溶液 (g) を得て、

h) 溶液 (g) を、分子量約 2 1 0 k D a の所望のタンパクの単離を促進する F K B P 1 2 の G S T 融合タンパクと複合体を形成したラパマイシンまたはラパマイシン類似物 (L A F との関係において $I C 5 0 < 5 0 0 n M$) と共にインキュベートすることにより、融合 F K B P タンパク：ラパマイシン複合体または融合 F K B P 1 2 タンパク：ラパマイシン類似物複合体に結合した分子量約 2 1 0 k D a の所望のタンパクを含有する混合物 (h) を得て、

i) 融合 F K B P 1 2 タンパク：ラパマイシン複合体または融合 F K B P 1 2 タンパク：ラパマイシン類似物複合体に結合した分子量約 2 1 0 k D a の所望のタンパクを含有す

10

20

30

40

50

る混合物 (h) を、該融合タンパクに結合するアフィニティマトリックスと共に、アフィニティマトリックスへの結合を可能にし、かつ、タンパク分解を最小限に抑える温度および時間でインキュベートすることにより、融合FKBP12タンパク：ラパマイシン複合体または融合FKBP12タンパク：ラパマイシン類似物複合体に結合させ、

j) 結合した複合体を含むアフィニティマトリックス (i) を、分子量約210kDaの所望タンパク以外のタンパクの結合を解離する緩衝液ですすぎ、

k) 緩衝液を用いて、アフィニティマトリックス (j) から、分子量約210kDaのタンパク：融合FKBP12タンパク：ラパマイシンの複合体、あるいは、分子量約210kDaのタンパク：FKBP12タンパク：ラパマイシン類似物複合体を溶出させ、

l) 工程 (k) で溶出したタンパクをサイズによって分離する、
ことを含む、単離方法。

10

【請求項6】

FKBP12と複合体を形成した場合に、FKBP12 - ラパマイシン複合体に結合する、SDS-PAGEで測定した分子量約210kDaの哺乳動物タンパクに結合する、生物学的試料中の、ラパマイシンまたはラパマイシン類似物を検出する方法であって、

a) 生物学的試料をFKBP12と組み合わせ、ラパマイシンまたはラパマイシン類似物が該生物学的試料中に存在すれば、ラパマイシン：FKBP12複合体またはラパマイシン類似物：FKBP12複合体を含有する第1の混合物を形成させる工程；

b) その第1の混合物を、請求項1に記載のGST-FKBP12-ラパマイシン複合体に結合するタンパクに、固形担体に結合しているタンパクに添加することにより、第2の混合物を調製する工程；

20

c) 工程 (b) の第2の混合物を、ラパマイシン：FKBP12複合体またはラパマイシン類似物：FKBP12複合体が、それらが存在するならば、GST-FKBP12-ラパマイシン複合体に結合するタンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程；および

d) ラパマイシン：FKBP12複合体、またはラパマイシン類似物：FKBP12複合体と、該タンパクとの結合が工程 (c) で発生したかどうかを決定する工程、を含む、同定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、ラパマイシンのエフェクタータンパクに関する。さらに詳しくは、本発明は、免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための哺乳動物起源の新規なラパマイシン-FKBP12結合タンパクに関する。

【背景技術】

【0002】

ラパマイシンは、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス (*Streptomyces hygroscopicus*) によって生産されるマクロライド系抗生物質であり、最初は、抗真菌剤としてのその性質によって特徴付けられた。カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) やマイクロスポラム・ジブセウム (*Microsporium gypseum*) などのカビの増殖に悪影響を及ぼす。ラパマイシン、その製造およびその抗生物質活性については、特許文献1 (スレンドラ・セーガル (Surendra Sehgal) ら、1975年12月30日付で発行) に記載されている。1977年には、マーテル、アール・アール (Martel, R.R.) らにより、非特許文献1に、実験的なアレルギー脳炎およびアジュバント関節炎に対するラパマイシンの免疫抑制性が報告された。1989年には、非特許文献2ならびに非特許文献3が、別々に、同種異系移植手術におけるインビボでの拒絶反応を阻害する際のラパマイシンの有効性について報告した。続いて、ラパマイシンの免疫抑制性および拒絶反応阻害性について記載する数多くの論文が発表されたが、臨床研究については、ヒトにおける移植手術の際の拒絶反応を阻害するのにラパマイシンを使用することから始まった。

40

【0003】

50

ラパマイシンは、単独（特許文献2）で、あるいは、ピシバニルと組み合わせて（特許文献3）、抗腫瘍活性を有することが示されている。非特許文献4は、ラパマイシンが、実験的なアレルギー脳脊髄炎モデル、多発性硬化症のモデル、アジュバント関節炎モデル、慢性関節リウマチのモデルに有効であり、I g E様抗体の形成を効果的に阻害したことを開示した。

【0004】

ラパマイシンの免疫抑制効果は、非特許文献5に開示されている。シクロスポリンAやFK-506などのマクロ環状分子もまた、免疫抑制剤として有効であることが示されており、それゆえ、移植組織の拒絶反応を予防するのに有用である（非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；および特許文献4）。

10

【0005】

ラパマイシンは、全身性エリテマトーデス（特許文献5）、肺炎（特許文献6）、インシュリン依存性糖尿病（非特許文献8）、ならびに血管損傷後の平滑筋細胞増殖および内膜肥大化（非特許文献9）を防止したり、治療したりするのに有用であることが示されている。

【0006】

ラパマイシンのモノおよびジアシル化誘導体（28位および43位でエステル化）は、抗真菌剤として有用であることが示されており（特許文献7）、ラパマイシンの水溶性プロドラッグを製造するのに用いられている（特許文献8）。最近、ラパマイシンの番号付けの規約が変更された；それゆえ、ケミカル・アブストラクツの命名法に従えば、上記のエステルは、31位および42位におけるものになる。特許文献9は、免疫抑制剤、抗炎症剤、抗真菌剤、および抗腫瘍剤として有用な、ラパマイシンのカーバメートを開示している。特許文献10は、ラパマイシンのフッ素化エステルを開示している。特許文献11は、ラパマイシンのアミドエステルを開示している。特許文献12は、ラパマイシンのアミノエステルを開示している。特許文献13は、ラパマイシンのスルホネートおよびスルファメートを開示している。特許文献14は、ラパマイシンのスルホニルカーバメートを開示している。

20

【0007】

特許文献4（カルネ（Calne））は、ラパマイシンならびにその誘導体およびプロドラッグを用いて哺乳動物における移植組織の拒絶反応を阻害する方法を開示している。ラパマイシンと共に用いるために挙げられている他の化学療法剤は、アザチオプリン、コルチコステロイド、シクロスポリン（およびシクロスポリンA）、およびFK-506、あるいはその組合せである。

30

【0008】

ラパマイシンは、細胞内のシグナルトランスダクションを遮断することによって、免疫抑制効果を生じる。ラパマイシンは、T細胞およびマスト細胞におけるカルシウム依存性シグナルカスケードを干渉するようである（非特許文献10）。ラパマイシンは、FK-506結合タンパク（FKBP）系統群のメンバーである幾つかのイムノフィリン（immunophilin）に結合することが知られている。特に、ラパマイシンは、結合タンパクFKBP12、FKBP13、FKBP25（非特許文献11および非特許文献12；非特許文献13）、およびFKBP52（特許文献15）に結合することが知られている。

40

【0009】

ラパマイシンは、マイトジェン誘発のT細胞およびB細胞の増殖、ならびに、IL-2、IL-3、IL-4およびIL-6を含む数種のサイトカインによって誘発される増殖を阻害することができる（非特許文献14）。それはまた、抗体産生を阻害することができる。ラパマイシンは、細胞周期の進行に伴うタンパク合成を減少させるラパマイシンの能力と互いに関係があると思われるp70^{S6}キナーゼのサイトカイン誘発活性化を遮断することが示されている（非特許文献15；非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18）。それはまた、cdk2/サイクリンE複合体の活性化を阻害する（非特許文献19；非特許文献20；非特許文献21）。ラパマイシンの効果は、p70^{S6}キナーゼや

50

c d k 2 /サイクリン E への直接結合によって媒介されるのではなく、これらキナーゼの活性化状態を調節する上流成分へのラパマイシン-F K B P 複合体の作用による。

【 0 0 1 0 】

一般に、ラパマイシン、シクロスポリンおよび F K 5 0 6 などの免疫抑制剤の作用が、それらの各々の細胞内受容体タンパク (イムノフィリンと呼ばれる) との複合体の形成に依存することは受け入れられている。これらの免疫抑制剤がそれらの各々のイムノフィリンと結合することは、イムノフィリンのシス-トランスペプチジルプロリルイソメラーゼ (P P I a s e) 活性を阻害するが、P P I a s e 阻害は、免疫抑制活性を媒介するほど充分ではない (非特許文献 2 2)。ディールス-アルダー付加物である 2 種のラパマイシン類似物 (一方は 4 -フェニル- 1, 2, 4 -トリアゾリン- 3, 5 -ジオンとの付加物であり、他方は 4 -メチル- 1, 2, 4 -トリアゾリン- 3, 5 -ジオンとの付加物) は、F K B P に結合し、その P P I a s e 活性を阻害したが、検出可能な免疫抑制活性を示さなかった。モル大過剰のフェニル-トリアゾリンジオン・ディールス-アルダー付加物は、マイトジェン誘発のマウス胸腺細胞増殖における D N A 合成へのラパマイシンの効果を競合的に阻害することが示されている (非特許文献 2 3)。最近の証拠は、シクロフィリン-シクロスポリン A や F K B P - F K 5 0 6 などのパイナリーイムノフィリン-薬物複合体が、特定の標的タンパクに作用することによってシグナルトランスダクションを遮断することを可能にする新しい機能を獲得していることを示唆している。シクロフィリン-シクロスポリン A および F K B P - F K 5 0 6 複合体の両方の分子標的は、C a ⁺ 2 /カルモデュリン (calmodulin) 依存性セリン/スレオニンホスファターゼカルシネウリン (calcineurin) として同定されている (非特許文献 2 4 ; 非特許文献 2 5 ; 非特許文献 2 6 ; 非特許文献 2 7 ; 非特許文献 2 8)。

10

20

【 0 0 1 1 】

ラパマイシンの抗菌活性および免疫抑制活性は、ラパマイシンと、F K 5 0 6 結合タンパク (F K B P) 系統群のあるメンバーと、少なくとも 1 種の付加的な第 3 のタンパク (ラパマイシンの標的 (T O R) と呼ばれる) とからなる複合体によって媒介される。F K B P の系統群については、アーミステッド (Armistead) およびハーディング (Harding) によって総説が与えられている (非特許文献 2 9)。ラパマイシンの抗菌活性における関連 F K B P 分子は、F K B P 1 2 であることが示されている (非特許文献 3 0)。哺乳動物細胞について、関連 F K B P は研究中である。2 種の T O R タンパク (T O R 1 および T O R 2) は酵母において同定されているが (非特許文献 3 1)、ヒト細胞中におけるラパマイシンの標的は、不明のままである。酵母 T O R 2 のカルボキシ末端は、2 種のタンパク (すなわち、ホスファチジルイノシトール 3 -キナーゼの p 1 1 0 サブユニットおよび V P S 3 4) と、2 0 % の同一性を有することが示され、また、酵母液胞選別タンパクは P I 3 K 活性を有することが示されている。しかし、ジェイ・ブレニス (J. Blenis) らは、ラパマイシン-F K B P 1 2 複合体が、p 1 1 0 , p 8 5 P I 3 K 複合体によって、P D G F 刺激された細胞に対するその効果を直接媒介しないことを報告している。

30

【 特許文献 1 】 米国特許第 3, 929, 992 号

【 特許文献 2 】 米国特許第 4, 885, 171 号

【 特許文献 3 】 米国特許第 4, 401, 653 号

【 特許文献 4 】 米国特許第 5, 100, 899 号

【 特許文献 5 】 米国特許第 5, 078, 999 号

【 特許文献 6 】 米国特許第 5, 080, 899 号

【 特許文献 7 】 米国特許第 4, 316, 885 号

【 特許文献 8 】 米国特許第 4, 650, 803 号

【 特許文献 9 】 米国特許第 5, 118, 678 号

【 特許文献 1 0 】 米国特許第 5, 100, 883 号

【 特許文献 1 1 】 米国特許第 5, 118, 677 号

【 特許文献 1 2 】 米国特許第 5, 130, 307 号

【 特許文献 1 3 】 米国特許第 5, 117, 203 号

40

50

- 【特許文献 1 4】米国特許第5,194,447号
- 【特許文献 1 5】WO 93/07269
- 【非特許文献 1】カナディアン・ジャーナル・オブ・フィジオロジカル・ファーマコロジー (Canadian Journal of Physiological Pharmacology) 55,48-51(1977)
- 【非特許文献 2】カルネ、アール・ワイ (Calne, R.Y.) ら、ランセット (Lancet) 1989, no.2, p.227
- 【非特許文献 3】モリス、アール・イー (Morris, R.E.) およびメイザー、ビー・エム (Meiser, B.M.)、メディカル・サイエンス・リサーチ (Medical Science Research) 1989, No.17, p.609-10
- 【非特許文献 4】アール・アール・マーテル (R.R. Martel) ら、カナディアン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー・アンド・ファーマコロジー (Can. J. Physiol. Pharmacol.) 55,48(1977) 10
- 【非特許文献 5】FASEB 3,3411(1989)
- 【非特許文献 6】FASEB 3,5256(1989)
- 【非特許文献 7】アール・ワイ・カルネ (R.Y. Calne) ら、ランセット (Lancet) 1183(1978)
- 【非特許文献 8】フィフス・イント・コンフ・インフラム・レス・アソク (Fifth Int. Conf. Inflamm. Res. Assoc.) 121(要約),(1990)
- 【非特許文献 9】モリス、アール (Morris, R.) ジャーナル・オブ・ハート・アンド・ラング・トランスプラント (J. Heart Lung Transplant) 11(pt.2) : 197(1992) 20
- 【非特許文献 1 0】シュライバー (Schreiber) ら、(1992)テトラヘドロン (Tetrahedron) 48 : 2545-2558
- 【非特許文献 1 1】ガラト・エイ (Galat A.) ら、(1992)バイオケミストリー (Biochemistry) 31(8) ; 2427-2437
- 【非特許文献 1 2】フェレラ・エイ (Ferrera A) ら、(1992)ジーン (Gene) 113(1) : 125-127
- 【非特許文献 1 3】アーミステッド (Armistead) およびハーディング (Harding)、アニュアル・リポーツ・イン・メディカル・ケミストリー (Ann. Reports in Med. Chem.) 28 : 207-215,1993
- 【非特許文献 1 4】セーガル (Sehgal) らによる総説 ; メディカル・リサーチ・レビュー (Med. Research Rev.) 14 : 1-22,1994 30
- 【非特許文献 1 5】カルボ (Calvo) ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユー・エス・エイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89 : 7571-7575,1992
- 【非特許文献 1 6】チュング (Chung) ら、セル (Cell) 69 : 1227-1236,1992
- 【非特許文献 1 7】クオ (Kuo) ら、ネイチャー (Nature) 358 : 70-73,1992
- 【非特許文献 1 8】プライス (Price) ら、サイエンス (Science) 257 : 973-977,1992
- 【非特許文献 1 9】フラナガン (Flanagan) ら、アナルズ・オブ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンス (Ann. N.Y. Acad. Sci.) 印刷中
- 【非特許文献 2 0】フラナガン (Flanagan) ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell Biol.) 印刷中 40
- 【非特許文献 2 1】フラナガン (Flanagan) ら、ジャーナル・オブ・セル・バイオケミストリー (J. Cell Biochem.) 17A : 292,1993
- 【非特許文献 2 2】アーミステッド (Armistead) およびハーディング (Harding)、アニュアル・リポーツ・イン・メディカル・ケミストリー (Annual Reports in Med. Chem.) 28 : 207-215 : 1993
- 【非特許文献 2 3】オケイン (Ocain) ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 192 : 1340,1993
- 【非特許文献 2 4】ジェイ・リウ (J. Liu) ら、セル (Cell) 66,807,1991
- 【非特許文献 2 5】ジェイ・リウ (J. Liu) ら、バイオケミストリー (Biochemistry) 31 50

,3896,1992

【非特許文献26】ダブリュー・エム・フラナガン(W.M. Flanagan)ら、ネイチャー(Nature)352,803,1992

【非特許文献27】マッカフリー(McCaffrey)ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)268,3747,1993

【非特許文献28】マッカフリー(McCaffrey)ら、サイエンス(Science)262:750,1993

【非特許文献29】アニュアル・リポーツ・イン・メディカル・ケミストリー(Annual Reports in Med. Chem.)28:207-215:1993

【非特許文献30】ハイトマン(Heitman)ら、サイエンス(Science)253:905-909:1993

【非特許文献31】クンツ(Kunz)ら、セル(Cell)73:585-596:1993

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-FKBP12結合タンパクの提供が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、GST-FKBP12-ラパマイシンの複合体に結合する単離され、クローン化され、かつ、発現されたタンパクに関する。これらタンパクは、モルト(Molt)4T細胞白血病の膜調製物から単離される。4種の新規なタンパクのサイズは、PAGE移動法によって、 125 ± 12 キロダルトン(kDa)、 148 ± 14 kDa、 208 ± 15 kDaおよび 210 ± 20 kDaであると推定され、それぞれ、 125 kDa、 148 kDa、 208 kDa、および 210 kDaとして表されている。これら4種のタンパクは、エフェクタータンパクとも呼ばれる。

【0014】

本発明のタンパクは、酵素阻害剤アッセイや結合アッセイなどのスクリーニングアッセイに用いて、内因性の複合体およびリガンド、ならびに、それらの機能を調節する新規な外因性の化合物(ラパマイシン様)を同定することができる。それらは、再狭窄や免疫調節に対して、また、抗腫瘍剤として、治療上の利点を有する化合物を同定するアッセイに用いることもできる。本発明のタンパクをクローニングすることは、これらタンパクを大量に生産することを可能にするだけでなく、関連のアンチセンス療法を開発する基礎をも提供する。免疫調節活性(移植手術の拒絶反応、対宿主性移植片病、狼瘡などの自己免疫疾患、重症筋無力症、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、1型糖尿病、ならびに、乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、炎症性腸疾患、肺炎、喘息、および眼のブドウ膜炎などの炎症疾患に対する使用)、抗再狭窄活性および抗腫瘍活性を用いてアンチセンス療法を実施するためのcDNAクローンの使用は、本発明の範囲内に含まれる。

【0015】

本発明のタンパクは、T細胞白血病細胞系モルト4の細胞(ATCC1582、アメリカン・タイプ・セル・カルチャー(American Type Cell Culture)、12301パークローン・ドライブ(Parklawn Drive)、ロックビル(Rockville)、MD、USA、20852)、B細胞リンパ腫、BJAB、または正常なヒトT細胞などの哺乳動物細胞から単離することができる。これらの哺乳動物細胞は、低張圧緩衝液A(100 mM HEPES、pH 7.5、 20 mM KCl、 1 mM EDTA、 0.4 mM PMSFおよび 2 mM β -メルカプトエタノール(2-ME))などの、プロテアーゼ阻害剤および還元剤(2-ME)を含有する緩衝液中で溶解させることができる。細胞核および未破壊細胞は、タンパク分解を最小限に抑える温度で遠心分離によって取り除かれる。次いで、これら細胞の膜画分は、 $100,000$ gの超遠心分離によって濃縮またはペレット化することができる。膜ペレットの界面活性剤による可溶化は、CHAPS(3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-

10

20

30

40

50

プロパンスルホネート；12 mM) またはトリトン X 100 (ポリエチレングリコール 4-イソオクチルフェニルエーテル) を含む緩衝液 B (50 mM Tris、pH 7.2、100 mM NaCl、20 mM KCl、0.2 mM PMSF、1 mM 2-ME、2 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂、5 μg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A およびアンチペイン) などの界面活性剤含有緩衝液中で実施する。次いで、可溶化された膜タンパクは、タンパク分解を最小限に抑える温度で 100,000 g の超遠心分離によって、破碎物から分離することができる。次いで、可溶化された膜タンパクを含有する上清を、タンパク分解を最小限に抑える温度で、プロテアーゼ阻害剤の存在下、グルタチオン樹脂などのアフィニティー樹脂に前吸着させる。上清から樹脂を除去するために遠心分離した後、この上清を、次いで、タンパク分解を最小限に抑える温度で、FKBP に複合体化したラパマイシンまたはラパマイシン類似体、例えば、GST-FKBP 12--ラパマイシンと共にインキュベートする。次いで、FKBP に複合体化したラパマイシンまたはラパマイシン類似物、例えば、GST-FKBP 12--ラパマイシンと共にインキュベートした可溶化膜タンパクの混合物は、タンパク分解を最小限に抑える温度で、アフィニティー樹脂とインキュベートして、ラパマイシンまたはラパマイシン類似物、FKBP 融合タンパクおよび結合タンパクの複合体を結合させることができる。最も非特異的なタンパクを、界面活性剤含有緩衝液、例えば、緩衝液 C (50 mM Tris、pH 7.2、100 mM NaCl、20 mM KCl、0.2 mM PMSF、1 mM 2-ME または 10 mM ジチオスレイトール、0~5 mM CaCl₂、0~5 mM MgCl₂、5 μg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A およびアンチペイン、ならびに 0.1% トリトン X 100 (ポリエチレングリコール 4-イソオクチルフェニルエーテル)) を用いて、すすいだ後、これらタンパクを、樹脂から解離させるのに十分な界面活性剤を含有する緩衝液 (例えば、ラエムリ (Laemli)、ネイチャー (Nature) 227:680,1970 に記載の、必要に応じてグリセロールまたは色素を含むラエムリ緩衝液) などの変性条件下で、または、5 mM グルタチオンなどのアフィニティーカラムに適当な溶出化合物を含有する緩衝液などの非変性条件下で、樹脂から溶出させる。次いで、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて、これらタンパクをサイズによって分離することができる。

【0016】

本発明はまた、上記タンパクのゲノム DNA 配列、ならびに、上記タンパクの遺伝子に対応する cDNA およびアンチセンス RNA および DNA 配列を含む。本発明はさらに、上記タンパクと少なくとも機能的に相同または等価である他の哺乳動物種のタンパク、ならびに、かかる相同または等価タンパクの DNA 遺伝子配列、およびかかる相同または等価タンパクの遺伝子に対応する cDNA およびアンチセンス RNA および DNA 配列を含む。

【0017】

本発明の目的に対して、本発明のタンパクの等価物は、上記タンパクに対して実質的に類似しているが、同一ではないアミノ酸配列を有する、タンパク、タンパク断片および/または切断された形態であると見なされ、かかる等価物は上記タンパクに類似したラパマイシン-FKBP 複合体に結合する特性および機能を示す。それゆえ、本明細書では、本発明の 125 kDa、148 kDa、208 kDa、および 210 kDa タンパクに言及することは、上記の 125 kDa、148 kDa、208 kDa、および 210 kDa タンパクと実質的に類似しているが、同一ではないアミノ酸配列を有する、相同または等価タンパク、ならびに、断片化および/または切断された形態を示し、含むものと理解すべきである。

【0018】

これらタンパクあるいは相同または等価タンパクは、様々な細胞タイプから同様の方法によって、および/または、組換え DNA 法によって、生成させることができ、また、部位特異的変異誘発処理を含む手法によって改変してもよい。例えば、本発明の遺伝子は、これらタンパクの 1 つまたは全部を、単離に有利な融合相手 (例えば、HIS オリゴマー

10

20

30

40

50

、免疫グロブリンFc、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、FLAGなど)との融合タンパクとして発現するように構築することができる。可溶性になる変異や切断を部位特異的変異誘発処理によって導入することができ、これにより単離が有利になりうる。

【0019】

本発明はさらに、結合親和性を保持しているが、活性タンパクのアミノ酸配列より少ないアミノ酸配列を有する、オリゴペプチド断片、切断形およびタンパク断片を含む。本発明はまた、これらタンパクに特異的なモノクローナルおよびポリクローナル抗体と、それらの使用とを含む。このような使用には、免疫調節および/または抗腫瘍活性のための新規な薬剤をスクリーニングする方法や、免疫抑制薬を服用している個体から得た生物学的試料中の親化合物および/または代謝物を測定する方法が含まれる。免疫調節活性(移植手術の拒絶反応、対宿主性移植片病、狼瘡などの自己免疫疾患、重症筋無力症、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、I型糖尿病、ならびに、乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、炎症性腸疾患、肺炎、喘息、および眼のブドウ膜炎などの炎症疾患に対する使用)、および抗腫瘍活性を用いてアンチセンス療法(ミリガン(Milligan)ら、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(J. Med. Chem.) 36:1923-1936,1993)を実施するためのcDNAクローンの使用も、本発明の範囲内に含まれる。

10

【0020】

本発明のタンパクは、当業者に周知の組換えDNA技術によって製造することもできる。つまり、課題のタンパクの遺伝子は、このタンパクを、リシンCなどのプロテアーゼで切断することによって部分的なアミノ酸配列を得て、得られたタンパク断片を微孔HPLCによって単離した後、断片の配列決定(マツダイラ(Matsudaira)、ア・プラクティカル・ガイド・トゥー・プロテイン・アンド・ペプチド・ピュリフィケーション・フォア・マイクロシーケンシング(A Practical Guide To Protein and Peptide Purification for Microsequencing)中、アカデミック・プレス(Academic Press)(サンディエゴ,CA,1989))を行うことによってクローン化することができる。次いで、決定された配列は、ヒトcDNAライブラリーを直接スクリーニングしたり、ポリメラーゼ連鎖反応によってプローブを生成させたりするのに用いることができるオリゴヌクレオチドプローブを製造するのに用いることができる。ライブラリーはヒトT細胞または細胞系モルト(Molt)4、ジュルカット(Jurkat)、あるいはその他のものなどから作成して、クローンを得ることができる。これらのクローンを用いて、タンパクの全長遺伝子、つまり完全オープンリーディングフレームがクローン化されるまで、付加的な配列を含む付加的なクローンを同定することができる。

20

30

【0021】

ある種のタンパクが、タンパクのサイズから当初予想されたものより長いオープンリーディングフレームによってコードされ得ることは当該分野でよく知られている。これらタンパクは、完全なオープンリーディングフレームから翻訳された前駆体タンパク(例えば、IL-1)や、下流の開始コドンを用いて翻訳されたタンパク(例えば、B型肝炎表面抗原)の切断産物を表す場合がある。この知見を考慮して、ここで用いる「cDNA」なる用語は、上で考察したように、本発明のタンパクまたはタンパク断片を、同時にまたは別々に、あるいは切断された形でコードする遺伝子の完全なオープンリーディングフレームに対するcDNAまたはその任意の部分の意味するものと理解される。

40

【0022】

相補的な方策では、本発明のタンパクに対する遺伝子は、FKBP12:RAPAをクローニング用トラップとして用いたインタラクティブ酵母クローニング(interactive yeast cloning)技術によって同定してもよい。これらの方策を組み合わせると、クローンの同定を早めることもできる。

【0023】

4つのタンパクのいずれかの遺伝子をコードする関連cDNAクローンは、当該技術分野で標準的な発現ベクターを用いて、イー・コリ(E. coli)、酵母、またはバキュロウイルス感染細胞あるいは哺乳動物細胞で発現させることができる。単離は、上記のように

50

実施することができ、cDNAは、単離に有利な融合相手（例えば、HISオリゴマー、免疫グロブリンFc、グルタチオンS-トランスフェラーゼなど）との融合タンパクを発現するように製造することができる。可溶性になる変異を部位特異的変異誘発処理によって導入することができ、これにより単離が有利になりうる。

【0024】

このようなcDNAクローンの使用には、組換えタンパクの製造が含まれる。さらに、このような組換えタンパク、または哺乳動物細胞から単離された対応の天然タンパク、あるいはその断片（ペプチドオリゴマーを含む）は、これらタンパクに対する抗体の生成に有用である。簡単に言えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体は、当該技術分野で標準的な技術を用いて、組換えタンパク、または哺乳動物細胞から単離された対応の天然タンパク、あるいはその断片（担体タンパク（例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたはウシ血清アルブミン）に結合したペプチドオリゴマーを含む）で動物を免疫することによって誘発される。これらの抗体は、哺乳動物細胞から単離された天然タンパク、あるいは、イー・コリ（*E. coli*）、酵母、またはバキュロウイルス感染細胞あるいは哺乳動物細胞、あるいは細胞産物に由来する組換えタンパクの精製法に用いることができる。

10

【0025】

このようなcDNAクローンの使用には、組換えタンパクの製造が含まれる。さらに、このような組換えタンパク、または哺乳動物細胞から単離された対応の天然タンパクは、免疫調節および/または抗腫瘍活性のための合成化合物、天然物、外因性または内因性の物質などの新規な薬剤をスクリーニングする方法に有用である。スクリーニングしうる天然物には、細胞溶解物、細胞上清、植物抽出物、および真菌や最近の天然プロスが含まれるが、これらには限定されない。競合結合アッセイの一例としては、マトリックスに（共有結合的にまたは非共有結合的に）結合させたこれらタンパクの1つを、上記の化合物、天然物、細胞溶解物または細胞上清、および標識したラパマイシン：FKBP複合体を含有する緩衝液と共にインキュベートすることができる。これら化合物、天然物、外因性または内因性の物質が、この複合体または特異的抗体の結合を競合的に阻害する能力を評価することができる。複合体を標識する方法の例には、放射標識、蛍光または化学ルミネセンス標識、ルシフェラーゼなどのFKBPとの融合タンパク、および、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ（ACHE）などの酵素への結合が含まれる。酵素アッセイの一例としては、上記タンパクは、合成化合物、天然物、外因性または内因性の物質などの新規な薬剤の存在下または非存在下で、基質と共にインキュベートされ、タンパクの酵素活性が評価することができる。免疫抑制薬を服用している個体から得た生物学的試料中の親化合物および/または代謝物を測定する方法は、これらタンパクを用いて評価することができる。

20

30

【0026】

本発明は、免疫抑制剤または抗腫瘍剤として有用でありうる物質を同定する方法を含む。かかる方法は、以下の工程を利用している：

a) 試験物質を、本発明の4つの哺乳動物タンパク（約125kDa、約148kDa、約208kDa、または約210kDa；固形担体に結合されている）の1つと組み合わせる工程、

40

b) 該試験物質と、工程(a)の固形担体に結合させたタンパクとを、該試験物質が該タンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程、および

c) 該試験物質の結合が工程(b)で発生したかどうかを決定する工程。

【0027】

本発明はまた、以下の工程を伴う、免疫抑制剤または抗腫瘍剤として有用でありうる物質を同定する方法を含む。

a) 試験物質を、本発明の哺乳動物タンパク（固形担体に結合されている）の1つと組み合わせる工程、

b) 該試験物質と、工程(a)の固形担体に結合させたタンパクとを、該試験物質が該

50

タンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程、および

c) 該試験物質の存在が、哺乳動物タンパクの活性を調節したかどうかを決定する工程。

【0028】

本発明はさらに、FKBPと複合体を形成した場合に、本発明の4つの上記タンパクの1つと結合するラパマイシン、ラパマイシン類似物またはラパマイシン代謝物を、生物学的試料中に検出する方法を含む。かかる方法は、以下の工程からなる：

a) 生物学的試料をFKBPと組み合わせ、ラパマイシン、ラパマイシン類似物またはラパマイシン代謝物が該生物学的試料中に存在すれば、ラパマイシン：FKBP複合体、ラパマイシン類似物：FKBP複合体、またはラパマイシン代謝物：FKBP複合体を含む第1の混合物を得る工程、

b) 第1の混合物を本発明のタンパク（固形担体に結合されている）の1つに添加することにより、第2の混合物を調製する工程、

c) 工程（b）の第2の混合物を、ラパマイシン：FKBP複合体、ラパマイシン類似物：FKBP複合体、またはラパマイシン代謝物：FKBP複合体が、存在するならば、本発明のタンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程、および

d) ラパマイシン：FKBP複合体、ラパマイシン類似物：FKBP複合体、またはラパマイシン代謝物：FKBP複合体と、該タンパクとの結合が工程（c）で発生したかどうかを決定する工程。

【0029】

また、アンチセンス治療剤を生成するためにcDNAクローンを使用することも本発明に包含される。これは、ミリガン（Milligan）ら、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（J. Med. Chem.）36:14:1924-1936に記載されているような当該分野の技術を用いることにより達成することができる。この開示および特許請求の範囲の目的のために、アンチセンスRNAおよびDNAは、天然のバックボーンを有するまたは修飾されたバックボーンを利用する本発明の4つのタンパク（125kDa、148kDa、208kDaまたは210kDa）のうちの1つをコードするcDNAクローン由来のRNAおよびDNA鎖を包含すると理解される。RNAおよびDNAバックボーンのかかる修飾は、ミリガン（Milligan）ら、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（J. Med. Chem.）36:14:1924-1936に記載されている。最近開示された（ミリガン（Milligan）ら、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（J. Med. Chem.）36:14:1924-1936）当該分野の技術により創製されるアンチセンス化合物は、免疫応答を調節するのに有用であり、従って腎臓、心臓、肝臓、肺、骨髄、膵臓（島細胞）、角膜、小腸および皮膚同種移植および心臓弁異種移植のような移植拒絶の治療または抑制に；狼瘡、慢性関節リウマチ、糖尿病、重症筋無力症および多発性硬化症のような自己免疫疾患および乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、炎症性腸疾患および眼ブドウ膜炎のような炎症性疾患の治療または抑制に有用であり得る。本発明のアンチセンス分子は、抗腫瘍、抗真菌活性および抗増殖活性を有し得る。したがって、本発明の化合物は固形腫瘍、成人T細胞白血病/リンパ腫、真菌感染症および再発狭窄症およびアテローム性動脈硬化症のような過増殖血管疾患の治療にも有用であり得る。したがって、本発明はまた、哺乳動物、好ましくはヒトにおける上記疾患および症状の治療法よりなる。該方法は、本発明の関連するアンチセンス治療剤の有効量を、投与の必要な哺乳動物に投与することよりなる。

【0030】

上記疾患状態の治療または抑制のために投与する場合には、本発明のアンチセンス分子は、哺乳動物に経口的、非経口的、鼻内、気管支内、経皮的、局所的、腔内、または直腸内に投与することができる。

【0031】

本発明のアンチセンス分子を免疫抑制剤または抗炎症剤として用いる場合、それらは1またはそれ以上の他の免疫調節剤と組み合わせて投与できると考えられる。かかる他の免疫調節剤には、アゼチオプリン、プレドニゾンおよびメチルプレドニゾンのよ

10

20

30

40

50

うなコルチコステロイド、シクロホスファミド、ラパマイシン、シクロスポリンA、FK-506、OKT-3およびATGが含まれるがこれらに限定されるものではない。本発明の複合体を、免疫抑制を誘導するまたは炎症症状を治療するためのかかる他の薬または剤と組み合わせることにより、所望の効果をj得るために必要な該剤のそれぞれの量はより少量ですむ。かかる併用療法の基礎はステプコウスキー (Stepkowski) により確立されており、彼の結果が示すところによると、下治療用量 (subtherapeutic dose) のラパマイシンおよびシクロスポリンAの併用により、心臓同種移植生存時間を著しく延長した (トランスプランテーション・プロシーディングズ (Transplantation Proc.) 23:507(1991))

【0032】

一般にこれらのアンチセンス化合物での治療は、該化合物の最適用量未満の少用量で開始する。その後、該条件下で最適効果に到達するまで投与量を増やす。正確な投与量は、治療される個々の対象についての経験に基づき、投与する医師が決定する。一般に、本発明のアンチセンス化合物は、有害な副作用を全く起こさずに有効な結果を与える濃度にて最も望ましく投与される。

【0033】

また、上記アンチセンス化合物の治療価値に鑑みれば、本発明は、本発明の125kDa、148kDa、208kDaおよび210kDaのタンパクをコードするcDNAクローン由来のアンチセンスRNAおよびアンチセンスDNA化合物を含有する医薬組成物をも包含する。

【0034】

また、本発明は、本発明のタンパクを単離するための以下の方法並びにそれから単離されるタンパクよりなる。

哺乳動物細胞からタンパクを単離する方法は以下の工程からなる。

1. 関心のある哺乳動物細胞を増殖させ収穫する。上記のとおり、該細胞はT細胞由来 (例えば、T細胞リンパ腫、白血病、正常ヒトT細胞)、B細胞由来 (例えば、EBV形質転換B細胞、正常ヒトB細胞)、肥満細胞、またはラパマイシンに感受性の他の細胞源であってもよい。該細胞は、収穫後直ちに加工しても、または加工前に例えばペレットにて凍結保存してもよい。凍結保存した細胞は、-70~80 で凍結保存されるドライアイスおよびエタノール浴中で使用するまで保存してもよい。関心の細胞を増殖させ収穫するこの工程は、本方法の第1工程または本方法のための単なる予備工程と考えてもよい。

【0035】

2. タンパク分解を最小限に抑える温度 (例えば、4) で緩衝剤 (例えば、HEPES、トリス、pH7.5)、低塩 (例えば、10~50mM NaClまたはKCl)、キレート剤 (例えば、1~2mM EDTA)、プロテアーゼ阻害剤 (例えば、0.4mM PMSF) および還元剤 (例えば、2mM 2-MEまたは1~20mMジチオスレイトール) を含有する緩衝液中で細胞を溶解する。哺乳動物細胞は、音波溶解、ダウンスイング (douncing) などの細胞溶解を起こすことのできるいずれの方法で処理してもよいと理解されるべきである。

【0036】

3. タンパク分解を最小限に抑える温度 (例えば、4) にて遠心分離することにより、ライゼートから破壊されていない細胞または細胞核を前除去する。例えば1600g、10分間の遠心分離が、破壊されていない細胞および細胞核をライゼートから前除去するのに十分であることが判明した。この工程は強制的なものではないが、後続する工程のためのより清澄な調製物を与える。

【0037】

4. ついで、前清澄化ライゼート中の膜画分を、例えば超遠心分離により濃縮する。この濃縮の一例として、100,000gで1~1.5時間の超遠心分離が挙げられる。

【0038】

5. ついで膜タンパク (例えば、貫膜、内因性および膜結合タンパク) を可溶化する。

10

20

30

40

50

これは、タンパク分解を最小限に抑える温度（例えば、4℃）にて、タンパクを有害に変性することなくこれを可溶化する界面活性剤、緩衝剤（例えば、20～50mM トリスまたはHEPES, pH7.2）、塩（例えば、100～200mM NaCl + 20mM KCl）、還元剤（例えば、1～2mM 2-MEまたは1～20mM ジチオスレイトール）、プロテアーゼ阻害剤（例えば、0.2mM PMSF、5μg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチンAおよびアンチパイン）、二価カチオン（例、0～5mM CaCl₂、0～5mM MgCl₂）を含有する緩衝液中、工程4のペレットをインキュベートすることにより行ってもよい。この工程で有用な界面活性剤としては、例えば、CHAPS O（3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート）またはトリトンX100（ポリエチレングリコール4-イソオクチルフェニルエーテル）が挙げられる。この工程の後、該混合物は可溶化膜タンパクおよび非可溶化細胞破片を含有する。

10

【0039】

6. 該可溶化膜タンパクを、タンパク分解を最小にする温度（例えば、4℃）にて、例えば超遠心分離（例えば、100,000g、1～1.5時間）により非可溶化細胞破片から分離する。

【0040】

7. アフィニティー樹脂に直接結合するタンパクの吸収を許容し、タンパク分解を最小限に抑える温度（例えば、4℃）および時間にて、緩衝剤（例えば、20～50mM トリスまたはHEPES, pH7.2）、塩（例えば、100～200mM NaCl + 20mM KCl）、還元剤（例えば、1～2mM 2-MEまたは10～20mM ジチオスレイトール）、プロテアーゼ阻害剤（例えば、0.2mM PMSF、5μg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチンAおよびアンチパイン）、二価カチオン（例えば、0～5mM CaCl₂、0～5mM MgCl₂）を含有する緩衝液中、可溶化膜タンパクを含有する上清をアフィニティー樹脂と共にインキュベートする。

20

【0041】

8. ついで、タンパク分解を最小限に抑える温度（例えば、4℃）で、遠心分離により上清から該樹脂を除去する。

【0042】

9. ついで、エフェクタータンパクの融合FKBPタンパク：ラパマイシンまたは類似物複合体に対する結合を許容し、タンパク分解を最小限に抑える温度および時間（例えば、4℃および1～2時間）にて、緩衝剤（例えば、20～50mM トリスまたはHEPES, pH7.2）、塩（例えば、100～200mM NaCl + 20mM KCl）、還元剤（例えば、1～2mM 2-MEまたは1～20mM ジチオスレイトール）、プロテアーゼ阻害剤（例えば、0.2mM PMSF、5μg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチンAおよびアンチパイン）、二価カチオン（例えば、0～5mM CaCl₂、0～5mM MgCl₂）を含有する緩衝液中、FKBP12 + タンパク[これは所望のエフェクタータンパクの単離を促進し、また、これにより融合タンパクがアフィニティー樹脂またはアフィニティーカラム（例えば、GST-FKBP12、ヒスチジノリゴマー-FKBP12、ビオチン-FKBP12など）に結合する]の融合タンパクに複合体化させたラパマイシンまたはラパマイシン類似物（LAFにおいてIC₅₀ < 500nM）と共に該上清をインキュベートする。

30

40

【0043】

10. エフェクタータンパクおよび融合FKBPタンパク：ラパマイシンまたはアナログの複合体のアフィニティー樹脂に対する結合を許容し、タンパク分解を最小にする温度および時間（例えば、4℃および0.5～2時間）にて、エフェクタータンパクおよび融合FKBPタンパク：ラパマイシン複合体を含有する工程9の混合物を、アフィニティー樹脂と共にインキュベートする。

【0044】

11. 非特異的タンパクの結合を解離するが所望のタンパクおよびRAPA-FKBP

50

間の複合化を解離しない緩衝液、例えば緩衝剤（例えば、20～50 mM トリスまたは HEPES, pH 7.2）、塩（例えば、100～1000 mM NaCl、KCl）、還元剤（例えば、1～2 mM 2-ME または 10～20 mM ジチオスレイトール）、プロテアーゼ阻害剤（例えば、0.2 mM PMSF、5 μg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A および アンチペイン）、二価カチオン（例えば、0～5 mM CaCl₂、0～5 mM MgCl₂）および非特異的タンパクの結合を解離するが該4つのタンパクおよび R A P A -融合 F K B P タンパク間の複合化を解離しない界面活性剤（例えば、トリトン X 100（ポリエチレングリコール 4-イソオクチルフェニルエーテル））を含有する緩衝液を用いて、ほとんどの非特異的タンパクを該樹脂から洗い流す。

【0045】

12. 該樹脂から該エフェクタータンパクおよび融合 F K B P タンパク：ラパマイシン複合体を、それを樹脂から解離するのに十分な界面活性剤を含有する緩衝液（例えば、グリセロールまたは染料を含むまたは含まないラエムリ（Laemli）緩衝液、ラエムリ（Laemli）、ネーチャー（Nature）227:680,1970）のような適当な緩衝液、またはグルタチオン、ヒスチジンのようなアフィニティーカラム用の適当な溶出化合物を用いて溶出させる。

【0046】

13. ついで、該エフェクタータンパクをサイズにより分離する。これは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびサイズ排除カラムクロマトグラフィーを包含する（しかし、これに限定されるわけではない）、該タンパクをサイズにより分離するいずれの方法で行ってもよい。

【0047】

また、工程 8 において、L A F において $IC_{50} < 500$ nM であるラパマイシンまたはラパマイシンアナログを緩衝液に置換する方法である対照法により単離されたタンパクを比較することも有用であり得、ラパマイシン：F K B P 複合体に結合するタンパクをより容易に識別するために使用することができる。

【0048】

また、本発明のタンパクは、当業者によく知られている組換え DNA 技術により製造することができる。すなわち、タンパクを適当なエンドペプチダーゼ（例えば、リシン C）で消化することにより部分アミノ酸配列を得、得られたタンパク断片を小口径 H P L C により単離し、ついで断片を配列決定することにより、問題のタンパクの遺伝子をクローニングすることができる（マツダイラ（Matsudaira）、ア・プラクティカル・ガイド・ツー・プロテイン・アンド・ペプチド・ピュリフィケーション・フォー・マイクロシーケンシング（A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing）、アカデミック・プレス（Academic Press）、サンジエゴ（San Diego）CA, 1989）。ついで、決定された配列を用いて、ヒト c D N A ライブラリー（例えば、ヒト T 細胞、モルト（Molt）4、ジュルカト（Jurkat）などについてのもの）をスクリーニングするために使用することができるオリゴヌクレオチドプローブを作製しクローンを得ることができる（サムブルック（Sambrook）、フリッチュ（Fritsch）およびマニアタス（Maniatis）、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）、ア・ラボラトリー・マニュアル（A Laboratory Manual）、コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Cold Spring Harbor Press）1989）。タンパクの全遺伝子をクローニングするまで、これらのクローンを用いて追加的配列を含有する追加的クローンを同定することができる（サムブルック（Sambrook）、フリッチュ（Fritsch）およびマニアタス（Maniatis）、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）、ア・ラボラトリー・マニュアル（A Laboratory Manual）、コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Cold Spring Harbor Press）1989）。補足的な戦略においては、クローニングのためのトラップとして F K B P 1 2 : R A P A を用いて、相互作用する酵母クローニング技術により遺伝子を同定してもよい（チエン（Chien）ら、プロシーディングズ・オブ・ナチュラール・アカデミック・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci.）88:9578-9582,1991）。また、これらの戦略を組み合わせることで該クローンの同定を速めてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

また、大腸菌、酵母またはバクテリオファグ感染細胞または哺乳動物細胞中、当該分野における発現ベクターを用いて、関連するcDNAクローンを発現させることもできる。単離は上記のとおりに行うことができ、あるいは該cDNAは単離において利点を与える融合相手（例えば、HISオリゴマー、免疫グロブリンFc、グルタチオン S-トランスフェラーゼなど）との融合タンパクとして作製することができる。また、可溶形態を生じさせる突然変異は、特定部位の突然変異誘発により起こすことができ、単離における利点を与えるであろう。

【 0 0 5 0 】

同様の手法を用いて、マウス、ラット、サル、イヌおよび他の哺乳動物種における相同体を得ることができる。さらに、該タンパクのヒトクローンの単離の際には、該クローンを用いて他の哺乳動物種における相同体についてスクリーニングすることができる。また、これらの相同体を用いて、免疫調節活性を有する化合物、内因性リガンド、外因性リガンドについて結合測定法を進め、ハイスループットスクリーニングアッセイ（high throughput screening assay）を行うことができる。

【 0 0 5 1 】

かかる免疫調節活性を有する化合物、内因性リガンドおよび外因性リガンドは、免疫応答を調節するのに有用であり、従って腎臓、心臓、肝臓、肺、骨髄、膵臓（島細胞）、角膜、小腸および皮膚同種移植および心臓弁異種移植のような移植拒絶の治療または抑制に；狼瘡、慢性関節リウマチ、糖尿病、重症筋無力症および多発性硬化症のような自己免疫疾患および乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、炎症性腸疾患および眼ブドウ膜炎のような炎症性疾患の治療または抑制に有用であり得る。

【 0 0 5 2 】

また、上記の化合物、内因性リガンドおよび外因性リガンドは、抗腫瘍、抗真菌活性および抗増殖活性を有する。従って、本発明の化合物は固形腫瘍、成人T細胞白血病/リンパ腫、真菌感染症および再発狭窄症およびアテローム性動脈硬化症のような過増殖血管疾患の治療にも有用であり得る。

【 発明の効果 】

【 0 0 5 3 】

本発明によれば、免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-FKB P 1 2 結合タンパクなどが提供される。

【 実施例 】

【 0 0 5 4 】

実施例 1

本発明のタンパクは、グルタチオン S-トランスフェラーゼ-FK 5 0 6 結合タンパク 1 2 (GST-FKB P) の融合タンパクを利用して単離した。GST-FKB Pは、プラスミド、pGEX-FKB Pを含有する組換え大腸菌により生産される。該細胞を増殖させ、IPTGで誘導し、ディー・ビー・スミス(D.B. Smith)およびケイ・エス・ジョンソン(K.S. Johnson)、ジーン(Gene) 67,31,1988およびケイ・エル・グアン(K.L. Guan)およびジェイ・イー・ディクソン(J.E. Dixon)、アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.) 192,262,1991に記載の標準的な技術を用いて該融合タンパクを単離した。セントリコン10フィルトレーションユニット(Centricon 10 filtration unit)(アミコン(Amicon))を用いてグルタチオンおよびGST-FKB P 1 2を含有する溶液を5回交換してグルタチオンを除去し緩衝液を交換した。

【 0 0 5 5 】

標準培地(100 U/ml ペニシリン、100 ug/ml L-グルタミン、10% FCSを含有するRPMI 1640)中でモルト4細胞(1×10^9)を増殖させた。該細胞を収穫し、PBS(50 mMリン酸緩衝液、pH 7.0、150 mM NaCl)で3回洗浄し、ドライアイス-エタノール浴中でフラッシュ凍結し、-80 で保存した。氷上、該細胞を解かし、B乳棒の付きダウンス(dounce)ホモジナイザーを用いて5 mlの緩衝液

A (10 mM ヘペス, pH 7.5、20 mM KCl、1 mM EDTA、0.4 mM PMSF および 2 mM 2-ME) 中で溶解した。1600 g で 10 分間遠心分離することにより破片を清澄化し、100,000 g 遠心分離 (1 時間) により膜画分を濃縮した後、12 mM CHAPS を含有する 3 ml の緩衝液 B (50 mM トリス, pH 7.2、100 mM NaCl、20 mM KCl、0.2 mM PMSF、1 mM 2-ME、2 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂、5 μg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A および アンチペイン) 中、4 で 2 時間、100,000 g ペレットをインキュベートした。該可溶性膜タンパクを 100,000 g 遠心分離により該破片から分離した。緩衝液 B 中で膨潤させた 0.4 ml グルタチオンセファロース樹脂に上清を 3 ~ 18 時間前吸収させた後、4 で 2 時間、複合化ラパマイシン-GST-FKBP12 (緩衝液 B 中 4 にて 1 ~ 2 時間、660 μg GST-FKBP + 60 μg RAPA をインキュベートすることにより行った) と共に上清をインキュベートした。ついで、該上清を 100 μl グルタチオン樹脂 (1 : 1 緩衝液 B) と共に 4 で 2 時間インキュベートした。非特異的タンパクを緩衝液 C (緩衝液 B + 0.1% トリトン x 100) で 5 回洗浄し、95 で 3 分間インキュベートしミクロ遠心分離することにより、ラエムリ (Laemli) 緩衝液中樹脂から該タンパクを溶出した。該タンパクは、7% SDS-PAGE、ついで銀染色を用いてサイズにより分離した。210 kDa、208 kDa、148 kDa および 125 kDa の分子量のタンパクに相当する 4 つの帯が、RAPA + GST-FKBP12 (対 GST-FKBP 単独) を含有する試料中、より高濃度で存在した。

【0056】

LAF と称されるマイトジェン刺激胸腺細胞増殖検定は、ラパマイシンまたはデメトキシラパマイシンのようなアナログにより抑制され、免疫抑制におけるラパマイシンアナログの相対活性を示す。免疫抑制アナログであるデメトキシラパマイシン (表 1) と複合体化させた GST-FKBP を用いて同一のタンパクを単離した。ディールスアルダー付加体は FKBP12 に結合し FKBP12 の PPIアーゼ活性を阻害したが、検出可能な免疫抑制活性を示さず、従ってラパマイシンの標的に結合しない。類似の単離方法 (すなわちラパマイシン : GST-FKBP12 を置換する) において GST-FKBP12 と複合体化しているこれらの 2 個の化合物を用いることにより、210 kDa タンパクのバックグラウンド値が得られた (ラパマイシン無し) (表 1)。FK506 は、FKBP に結合し FK506-FKBP 複合体のカルシニューリンとの結合によりその作用の少なくともいくつかを仲介する免疫抑制化合物である。FK506 は、類似の方法において GST-FKBP と複合体化させた場合、210 kDa タンパクのバックグラウンド値を与えなかつた (表 1)。

【0057】

【表 1】

ラパマイシンアナログ-FKBP12 複合体の 210 kDa タンパクへの結合比較

化合物	210 kDa	LAF	PPase (Ki)
RAPA	+++	6 nM	0.12 nM
デメトキシラパマイシン	+++	58 nM	4.4 nM
ディールス-アルダー アダクツ (フェニル)	±	>1000 nM	12 nM
ディールス-アルダー アダクツ (メチル)	±	>1000 nM	12 nM
FK506	±	3 nM*	0.4 nM
無 (FKBP)	±		

(* 作用機構が異なる)

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

ラパマイシンがその効果を媒介するためには多種のFKBPと結合しなければならないことが知られている。本発明のタンパクがRAPA-GST-FKBP複合体に結合し、ラパマイシンまたはFKBP12の個々に結合しないことを実証するために、単離修飾操作を用いた。その修飾操作は、(1)ラパマイシンの代わりにラパマイシン-42-ビオチングリシナートエステル(両方共、LAF検定にて等しい免疫抑制活性を示す)、(2)非外因性FKBPおよび(3)グルタチオン-樹脂の代わりにストレパタビジン-複合樹脂を用いることからなる。バックグラウンドレベルの210kDaタンパクだけをこの修飾単離操作を用いて単離した。

【 0 0 5 9 】

210kDaタンパクを、GST--FKBP12--ラパマイシン複合体を用い、BJAB細胞(B細胞リンパ腫)ならびにフィコール・ハイパック(Ficoll-Hypaque)およびT細胞カラムを介して精製された正常なヒトTリンパ球から単離した。

【 0 0 6 0 】

部分アミノ酸組成物の分析結果を以下の表2に示す。塩基性アミノ酸の割合は測定しなかった。

【 0 0 6 1 】

【表2】

ピーク 番 号	成分名	保持時間	ピーク 面 積	応答因子	ピーク高	濃度値/ 50 μ l
		9.38				
		11.09				
1	Asp/Asn	12.06	12.47076	0.02344	0.05142	0.30
2	Thr	13.05	2.92898	0.00000	0.00985	0.068
3	Ser	13.78	6.43968	0.00000	0.01995	0.15
		15.68				
4	Glu/Gln	16.87	25.47273	0.00000	0.05285	0.59
	Prp	18.24				0.14
5	Gly	22.35	21.50384	0.00000	0.04645	0.44
		22.90				
6	Ala	23.73	16.69160	0.00000	0.03113	0.36
		26.06				
		28.81				
7	Val	29.39	4.83196	0.00000	0.00605	0.11
	Met	32.28				
8	Ile	34.10	3.00560	0.2326	0.00782	0.0699
9	Leu	35.09	5.73202	0.02331	0.01372	0.1383
10	nLeu	36.27	20.48232	0.02174	0.04286	0.4453
11	Tyr	38.33	1.44792	0.02618	0.00226	0.0379
12	Phe	40.05	1.25017	0.02703	0.00187	0.0338
13	His	47.79	1.50905	0.02553	0.00580	0.0385
14		51.80	12.66136	0.00000	0.01960	0.0000
15	Lys	53.34	9.90767	0.02283	0.02274	0.2262

合計 146.53645 0.33436

測定せず 144.29

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

実施例 2

本発明の 210 kDa (210 ± 20 kDa) タンパクを、前記のように、アフィニティーマトリックス操作を用い、 4×10^{11} 個のモルト (Molt) 4 細胞から単離した。結合タンパクをグリセロールおよび色素不含の 1 × ラエムリ (Laemli) 緩衝液 (0.0625 M トリス-HCl、pH 6.8、2% SDS、0.37 M β-メルカプトエタノール) でアフィニティーマトリックスから溶出し、セントリコン (centricon) 100 (マサチューセッツ州、ピバリー、アミコン (Amicon)) を用いる遠心分離操作により 3 回連続して、最初の 2 回は 4 で、3 回目は 18 で濃縮した。濃縮試料は、最初の 2 回はグリセロールおよび色素不含の等容量の 2 × ラエムリ緩衝液で、3 回目は等容量の 2 × ラエムリ緩衝液で、室温で 2 時間インキュベートすることにより、セントリコン 100 フィルターより溶出した。試料中のタンパクを 1.5 mm 厚の 7% ポリアクリルアミドゲル (38:1) の PAGE により分離した。該タンパクを、4 で一夜、50 mA で 0.037% SDS 含有の 10 × トリス/グリシン緩衝液 (カリフォルニア州、ハーキュレス、バイオラッド (Biorad)) 中のポリビニリジン ジフルオリド、PVDf (バイオラッド) に移動させた。PVDf 上のタンパクを、10% エタノール、2% 酢酸中、アミドブラック (バイオラッド) で染色し、適当なバンドを取り出し、PBS および水でリンスし、凍結貯蔵した。

10

【 0 0 6 3 】

配列決定操作

PVDf 膜上のタンパク (約 3 μg) を、ジェイ・フェルナンデス (J. Fernandez) らがアナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) 201:255-64, 1992 に記載する変法を用い、トリプシンでその場で消化した。簡単には、湿らす前に、PVDf を 1 mm² の断片に切断し、該タンパクを 37 で 6 時間、0.2 μg トリプシンを含む 10% アセトニトリル、および 1% 還元トリトン (カルバイオケム (CalBiochem)) 含有の 100 mM トリス-HCl, pH 緩衝液中に消化し、つづいて 0.2 μg のトリプシンを加え、一夜インキュベートした。フラグメントを音波処理で該膜より溶出し、該フラグメント含有の緩衝液をマイクロフュージ遠心分離操作により分離した。該膜を 2 × 逆抽出した (すなわち、50 μl の緩衝液を膜に加え、音波処理し、マイクロフュージにて遠心分離に付し、溶液を溶出フラグメント含有の原緩衝液と一緒にプールした)。試料 (140-145 μl) を、ダブリュ・レーン (W. Lane) らがジャーナル・オブ・プロテイン・ケミストリー (J. Protein Chem.), 10(2):151-60, 1991 にて前記するように、40 ダイオードアレイ検出器を備えたフューレット・パッカー (Hewlett Packard) HPLC 1090 上のバイダック (Vydac) C18 2.1 mm × 150 mm 逆相カラムを用いる細孔高性能液体クロマトグラフィーにより分離した。複数のフラクションを収集し、複数の波長 (210、277 および 292 nm) で吸収について測定した。分解、シンメトリーおよび紫外線吸収およびスペクトル (210 nm、277 nm および 292 nm) に基づき、配列決定についての最適フラクションを選択した。最適フラクションのアリコート (5%) を、フィニガン・レーザーマット (Finnigan Lasermat) 上の、マトリックス・アシステッド・レーザー・デソープション・タイム・オブ・フライト・マス・スペクトロメトリー、MALDE-TOF-MS により、フラグメントの均一性および長さについて分析した。選択した最適フラクションを、マイクロカートリッジおよび製造者が推奨するケミストリーサイクルを用い、アプライド・バイオシステム 477A タンパクシーケンサー上の自動エドマン (Edman) デグラデーションにより配列決定した。

20

30

40

【 0 0 6 4 】

配列比較

インテリジェネティックス・スーツ (カリフォルニア州、インテリジェネティックス) を用いて比較した。

【 0 0 6 5 】

配列

50

前記方法を用い、本発明の 210 kDa (210 ± 20 kDa) タンパクがペプチドフラグメントを含有し、そのうちの 4 個が以下に示すアミノ酸配列を有すると決定した：

- a) I L L N I E H R ;
- b) L I R P Y M E P I L K ;
- c) D X M E A Q E ; および
- d) Q L D H P L P T V H P Q V T Y A Y M (K)

【0066】

当業者であれば、当該アミノ酸についての一文字記号が解るであろう（その定義はまた、ラバート・ストライヤー (Lubert Stryer) によるダブリュ・エッチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W.H. Freeman and Company) 1988、ザ・テキスト・バイオケミストリー (the text Biochemistry) 第3版の21頁に記載されている)。当業者であればさらに、配列 c) における X が今だ未同定アミノ酸を示唆し、配列 d) 中の括弧はその位置にあるアミノ酸がおそらくリジンであることを示唆することがわかるであろう。

10

【0067】

前記したように、本発明は本明細書に記載のタンパクの断片形または切形を包含する。これは、前記 a) ~ d) に挙げた 4 個のうち 1 またはそれ以上の配列をそのアミノ酸配列の一部または全部として有するタンパクを包含する。後に示す請求の範囲のために、1 またはそれ以上の「内部アミノ酸配列」を包含すると称されるタンパクは、該タンパクが全体として 1 またはそれ以上の配列 a) ~ d) からなるとしても、または前記した 1 またはそれ以上の配列が該タンパクのいずれかの部分を形成するとしても、前記した配列の一つを含有するいずれかのタンパクであると理解される。これは、限定されるものではないが、タンパクのアミノ酸連鎖を開始および停止するタンパクのセクションを包含するタンパクのアミノ酸配列上のすべての位置を包含すると解される。

20

【0068】

これらの部分アミノ酸配列を遺伝子銀行のデータベースにおける配列と比較した。受入番号 L34075 (ブラウン (Brown) ら、ネイチャー (Nature) 369, 756 - 758 (1994)) と配列が同じであった。SEP 遺伝子の cDNA を以下のようにクローンした：1 単位の Taq ポリメラーゼ (パーキン・エルマー (Perkin Elmer) を有する 1 × PCR 緩衝液 (10 mM トリス-HCl、pH 8.3、50 mM KCl、1 mM MgCl₂、200 μM dATP、200 μM dTTP、200 μM dCTP、200 μM dGTP; パーキン・エルマー) 中、2 μg のモルト (Molt) 4 cDNA (カリフォルニア州、パロアルト、クロンテク (Clontech)) を、次のオリゴマー対の 1 つを含有する 3 つの別々の反応により、94 で 30 秒間、30 サイクルについて 66 で 4 分間、72 で 10 分間、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅した：

30

【0069】

【化1】

CGATCGGTGCGACTGCGACCACTTTGGGGATTGTGCTCTC および
GCGGCCGCGAGCTTCTTCATGCATGACAACAGCCCAGGC; または
GCGGCCGCAAGCTTCAAGTATGCAAGCCTGTGCGCAAGA および
CGATCGGTGCGACACCTTCTGCATCAGAGTCAAGTGGTCA; または
GCGGCCGCAAGCTTCTCTCAGCTCACATCCTTAGAGCTGCA および
CGATCGGTGCGACTTATTACCAGAAAGGGCACCAAGCCAATATA

40

【0070】

オリゴヌクレオチドを以前に記載されている方法であって、当該分野における公知方法により合成し、単離した (ケミカル・アンド・エンザイマティック・シンセシス・オブ・ジン・フラグメント (Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments)、エッチ・ジー・ガッシンおよびアン・ラング (H.G. Gassin および Anne Lang), ベルラグ・ケミー (Verlag Chemie), FLA, 1982)。各々、SEP 3、SEP 4 および SEP 5 と命名した PCR 生成物を、T4 DNA リガーゼ (1 単位) および PCR 生成物を効果的に連結するように修飾された 50 ng の pCII (カリフォルニア州、サンディエゴ、インビトロ

50

ゲン、T Aクローニングキット)含有の緩衝液中、15 で一夜インキュベートし、P C R-p c II生成物を得た。P C R-p c II生成物をインビトロゲンから入手可能なコンピテント・イー・コリ・I N V F細胞に形質転換した。ミニプレブ(miniprep)D N Aをキアゲン・ミニプレブ・キット(カリフォルニア州、チャトスワース、キアゲン(Quiagen))を用いて調製し、適当な大きさの生成物含有のクローンを、市販されているH i n d IIIまたはS a l Iでの制限酵素消化、電気泳動、および標品との比較により同定した。S e p 1およびS e p 1のc D N Aを、オリゴd T (0.13 μg)および、各々、250ピコモルの

【化2】

CGATCGGTCGACCCAGATGAGCACATCATAGCGCTGATGAまたは
CGATCGGTCGACAAATTCAAAGCTGCCAAGCGITCGGAG

を含有する第一の鎖合成反応で、タイム・セイバー・c D N A・シンセシス・キット(Ti me Saver cDNA synthesis kit)(ニュージャージー州、ピスカタウェイ、ファーマシア(Pharmacia))を用いて製造した。S e p 2およびS e p 1の第二の鎖合成は、各々、250ピコモルの

【化3】

GCGGCCGCAAGCTTTGGCTCGAGCAATGGGGCCAGGCAまたは
GCGGCCGCAAGCTTAAGATGCTTGGAAACCGCACCTGCCG

を添加してタイム・セイバー・c D N A・シンセシス・キットを用いて行った。ついで、そのS e p 2およびS e p 1 c D N Aを、前記したように、各々、

【化4】

CGATCGGTCGACCCAGATGAGCACATCATAGCGCTGATGAおよび
GCGGCCGCAAGCTTTGGCTCGAGCAATGGGGCCAGGCAまたは
GCGGCCGCAAGCTTAAGATGCTTGGAAACCGCACCTGCCGおよび
CGATCGGTCGACAAATTCAAAGCTGCCAAGCGITCGGAG,

を用いるP C Rにより増幅した。S e p 2 P C R生成物をT Aクローニングキット(インビトロゲン)を用いてp c IIにクローンした。S e p 1 P C R生成物をHindIIIおよびSal Iで消化し、アガロース電気泳動によりp c IIベクターより分離した。S e p 1 (HindIII-Sal I)フラグメントをファーマシア市販のセファグラス(Sephaglas)バンドプロブ・キットを用いて単離し、記載されているように、p U C 19のHindIIIおよびS a l I部位にクローンした(サムブロック(Sambrook)ら、モレキュラー・クローニング・コールド・スプリング・ハーバー(Molecular Cloning Cold Spring Harbor), 1989)。単離したS e p 2 (HindIII、Asp I)とS e p 3 (Asp I、Sal I)フラグメントまたはS e p 4 (HindII、AccII/Mro I)とS e p 5 (AccIII/Mro I、Sal I)フラグメントのp U C 18 (HindIII、Sal I)ベクターへの連結およびコンピテント・イー・コリ・I N V F細胞(インビトロゲン)の形質転換を、当業者に公知の技術(サムブロックら、モレキュラー・クローニング・コールド・スプリング・ハーバー, 1989)を介して行い、p U C 18-S e p 2 3およびp U C 18-S e p 4 5を得た。それは、各々、添付した配列番号1に示される全長クローンのヌクレオチド1468-5326および4964-7653を含有する。p U C 19-S e p 1 (EcoR V、Sal I)、S e p 2 3 (EcoR V、Bst E II)およびS e p 4 5 (Bst E II、Sal I)フラグメントの連結およびコンピテント・イー・コリ・I N V F細胞(インビトロゲン)の形質転換は、当該分野における当業者に公知の方法(サムブロックら、モレキュラー・クローニング・コールド・スプリング・ハーバー, 1989)により行い、全長クローンを得ることができる。このタンパクをコードする核酸配列を配列番号1に示す。

【0071】

グルタチオンSトランスフェラーゼ-シロリマスエフェクタータンパク、G S T-S E P、と称される縮合タンパクは、以下に示すように、S e p 4およびS e p 5フラグメントをプラスミド、p G E X-K G (グアン・ケイおよびジキソン・ジェイ・イー(Guan, K.およびDixon, J.E.)(1991)アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)

10

20

30

40

50

192,262-267) にサブクローンすることにより操作した。簡単には、Sep 4 を市販の HindIII 制限酵素で消化し、その制限部位を DNA ポリメラーゼのクレノーフラグメント (ギブコ (Gibco)) で満たし、DNA をフェノール-クロロホルムおよびエタノールで抽出し、当該分野における当業者に公知の技法を用いて沈降させた (サムブロックら、モレキュラー・クローニング・ワールド・スプリング・ハーバー, 1989)。SEP 4 (HindIII-クレノー) をさらに MroI 制限酵素で消化し、アガロース電気泳動により p c II ベクターより単離し、SEP 4-HindIII-クレノー-MroI フラグメントとして単離した。Sep 5 フラグメントを SalI および MroI で消化し、アガロース電気泳動により p c II ベクターから単離し、SEP 5-SalI-MroI として単離することにより製造した。p G E X - K G (グアン・ケイおよびジキソン・ジェイ・イー (Guan, K および Dixon, J.E.) (1991) アナリティカル・バイオケミストリー 192,262-2679) を NcoI で消化し、DNA ポリメラーゼのクレノーフラグメントで満たし、DNA をフェノール-クロロホルムおよびエタノールで抽出し、当該分野における公知技術を用いて沈降させた (サムブロックら、モレキュラー・クローニング・ワールド・スプリング・ハーバー, 1989)。p G E X - K G (NcoI、クレノー) をさらに SalI で消化し、アガロース電気泳動により未消化ベクターより分離し、当該分野における公知操作を用いて、ベクター p G E X - K G - NcoI - クレノー - SalI として単離した。当該分野における公知操作を用いて、該ベクター、p G E X - K G - NcoI - クレノー - SalI と Sep 4 (HindIII、MroI) および Sep 5 (MroI、SalI) フラグメントの連結ならびにイー・コリ株 IN V F 細胞 (インビトロゲン) への形質転換によりプラスミド、p G E X - S e p 4 5 を得た。この縮合タンパクの DNA およびタンパク配列を配列番号 2 に示す。

【0072】

フラグ (flag) 配列を、Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys についてのコーディング配列からなるオリゴヌクレオチドを用い、SEP 範囲内のアミノ酸末端で、または SEP、SEP 4、5 もしくは他のフラグメントのカルボキシ末端で加えることができる。縮合タンパクは、コネチカット州、ニューヘーブンの I B I から市販されているキットを用い、抗-フラグ特異的抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより単離できる。

【0073】

配列番号 1 に示すような、p U C 1 9 - S e p 1 (EcoRV、SalI)、Sep 2 3 (EcoRV、BstEII) および Sep 4 5 (BstEII、SalI) フラグメントを含有する形質転換宿主細胞はまた、アメリカ合衆国、メリーランド 2 0 8 5 2、ロックビル、パークラウン・ドライブ・1 2 3 0 1 番のジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) に寄託され、すでに ATCC 名称が与えられている。

【0074】

実施例 3

本発明の 2 1 0 k D a タンパクはまた、次のラパマイシンアナログを用い、実施例 1 に記載の操作により単離できる：

a) 4 2 -デオキシ-4 2 -[1-(1, 1-ジメチルエトキシ)-2-オキソエトキシ]ラパマイシン (米国特許第 5,233,036 号に記載)；

b) 4 2 -[O-(1, 1-ジメチルエチル)ジメチルシリル]ラパマイシン (米国特許第 5,120,842 号に記載)；

c) N-[1, 1-ジメチルエトキシ]カルボニル]-N-メチルグリシンのラパマイシン 4 2 -エステル (米国特許第 5,130,307 号に記載)；

d) 5 -[1, 1-ジメチルエトキシ)-2 -[[(1, 1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-5 N -オキソペンタン酸酢酸エチル溶媒和物 3 / 4 水和物とのラパマイシン 4 2 -エステル (米国特許第 5,130,307 号参照)；

e) N-[1, 1-ジメチルエトキシ]カルボニル]グリシルグリシンのラパマイシン 4 2 -エステル (米国特許第 5,130,307 号参照)；

f) N 2 , N 6 -ビス[(1, 1-ジメチルエトキシ)カルボニル]-L-リジンのラパマイシ

ン 4 2 - エステル (米国特許第5,130,307号参照) ;

【 0 0 7 5 】

[配列表]

配列番号 : 1

配列の長さ : 7 6 5 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A t o m R N A

ハイボセティカル配列 : N o

アンチセンス : N o

起源

生物名 : モルト 4 ヒト T 細胞白血病細胞

株名 : A T C C C C R L 1 5 8 2 株

配列 :

AAG ATG CTT GGA ACC GGA CCT GCC GCC GCC ACC ACC GCT GCC ACC ACA	48	
Met Leu Gly Thr Gly Pro Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr		
1 5 10 15		
TCT AGC AAT GTG AGC GTC CTG CAG CAG TTT GCC AGT GGC CTA AAG AGC	96	20
Ser Ser Asn Val Ser Val Leu Gln Gln Phe Ala Ser Gly Leu Lys Ser		
20 25 30		
CGG AAT GAG GAA ACC AGG GCC AAA GCC GCC AAG GAG CTC CAG CAC TAT	144	
Arg Asn Glu Glu Thr Arg Ala Lys Ala Ala Lys Glu Leu Gln His Tyr		
35 40 45		
GTC ACC ATG GAA CTC CGA GAG ATG AGT CAA GAG GAG TCT ACT CGC TTC	192	30
Val Thr MET Glu Leu Arg Glu MET Ser Gln Glu Glu Ser Thr Arg Phe		
50 55 60		
TAT GAC CAA CTG AAC CAT CAC ATT TTT GAA TTG GTT TCC AGC TCA GAT	240	
Tyr Asp Gln Leu Asn His His Ile Phe Glu Leu Val Ser Ser Ser Asp		
65 70 75		
GCC AAT GAG AGG AAA GGT GGC ATC TTG GCC ATA GCT AGC CTC ATA GGA	288	
Ala Asn Glu Arg Lys Gly Gly Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Ile Gly		
80 85 90 95		40
GTG GAA GGT GGG AAT GCC ACC CGA ATT GGC AGA TTT GCC AAC TAT CTT	336	
Val Glu Gly Gly Asn Ala Thr Arg Ile Gly Arg Phe Ala Asn Tyr Leu		
100 105 110		
CGG AAC CTC CTC CCC TCC AAT GAC CCA GTT GTC ATG GAA ATG GCA TCC	384	
Arg Asn Leu Leu Pro Ser Asn Asp Pro Val Val MET Glu MET Ala Ser		
115 120 125		
AAG GCC ATT GGC CGT CTT GCC ATG GCA GGG GAC ACT TTT ACC GCT GAG	432	
Lys Ala Ile Gly Arg Leu Ala MET Ala Gly Asp Thr Phe Thr Ala Glu		50

130	135	140		
TAC GTG GAA TTT GAG GTG AAG CGA GCC CTG GAA TGG CTG GGT GCT GAC			480	
Tyr Val Glu Phe Glu Val Lys Arg Ala Leu Glu Trp Leu Gly Ala Asp				
145	150	155		
CGC AAT GAG GGC CGG AGA CAT GCA GCT GTC CTG GTT CTC CGT GAG CTG			528	
Arg Asn Glu Gly Arg Arg His Ala Ala Val Leu Val Leu Arg Glu Leu				
160	165	170		
GCC ATC AGC GTC CCT ACC TTC TTC TTC CAG CAA GTG CAA CCC TTC TTT			576	
Ala Ile Ser Val Pro Thr Phe Phe Phe Gln Gln Val Gln Pro Phe Phe				
180	185	190		
GAC AAC ATT TTT GTG GCC GTG TGG GAC CCC AAA CAG GCC ATC CGT GAG			624	
Asp Asn Ile Phe Val Ala Val Trp Asp Pro Lys Gln Ala Ile Arg Glu				
195	200	205		
GGA GCT GTA GCC GCC CTT CGT GCC TGT CTG ATT CTC ACA ACC CAG CGT			672	
Gly Ala Val Ala Ala Leu Arg Ala Cys Leu Ile Leu Thr Thr Gln Arg				
210	215	220		20
GAG CCG AAG GAG ATG CAG AAG CCT CAG TGG TAC AGG CAC ACA TTT GAA			720	
Glu Pro Lys Glu MET Gln Lys Pro Gln Trp Tyr Arg His Thr Phe Glu				
225	230	235		
GAA GCA GAG AAG GGA TTT GAT GAG ACC TTG GCC AAA GAG AAG GGC ATG			768	
Glu Ala Glu Lys Gly Phe Asp Glu Thr Leu Ala Lys Glu Lys Gly MET				
240	245	250		
AAT CGG GAT GAT CGG ATC CAT GGA GCC TTG TTG ATC CTT AAC GAG CTG			816	
Asn Arg Asp Asp Arg Ile His Gly Ala Leu Leu Ile Leu Asn Glu Leu				
260	265	270		
GTC CGA ATC AGC AGC ATG GAG GGA GAG CGT CTG AGA GAA GAA ATG GAA			864	
Val Arg Ile Ser Ser MET Glu Gly Glu Arg Leu Arg Glu Glu MET Glu				
275	280	285		
GAA ATC ACA CAG CAG CAG CTG GTA CAC GAC AAG TAC TGC AAA GAT CTC			912	
Glu Ile Thr Gln Gln Gln Leu Val His Asp Lys Tyr Cys Lys Asp Leu				
290	295	300		40
ATG GGC TTC GGA ACA AAA CCT CGT CAC ATT ACC CCC TTC ACC AGT TTC			960	
MET Gly Phe Gly Thr Lys Pro Arg His Ile Thr Pro Phe Thr Ser Phe				
305	310	315		
CAG GCT GTA CAG CCC CAG CAG TCA AAT GCC TTG GTG GGG CTG CTG GGG			1008	
Gln Ala Val Gln Pro Gln Gln Ser Asn Ala Leu Val Gly Leu Leu Gly				
320	325	330		

TAC AGC TCT CAC CAA GGC CTC ATG GGA TTT GGG ACC TCC CCC AGT CCA	1056	
Tyr Ser Ser His Gln Gly Leu MET Gly Phe Gly Thr Ser Pro Ser Pro		
340 345 350		
GCT AAG TCC ACC CTG GTG GAG AGC CGG TGT TGC AGA GAC TTG ATG GAG	1104	
Ala Lys Ser Thr Leu Val Glu Ser Arg Cys Cys Arg Asp Leu MET Glu		
355 360 365		
GAG AAA TTT GAT CAG GTG TGC CAG TGG GTG CTG AAA TGC AGG AAT AGC	1152	
Glu Lys Phe Asp Gln Val Cys Gln Trp Val Leu Lys Cys Arg Asn Ser		10
370 375 380		
AAG AAC TCG CTG ATC CAA ATG ACA ATC CTT AAT TTG TTG CCC CGC TTG	1200	
Lys Asn Ser Leu Ile Gln MET Thr Ile Leu Asn Leu Leu Pro Ara Leu		
385 390 395		
GCT GCA TTC CGA CCT TCT GCC TTC ACA GAT ACC CAG TAT CTC CAA GAT	1248	
Ala Ala Phe Arg Pro Ser Ala Phe Thr Asp Thr Gln Tyr Leu Gln Asp		
400 405 410 415		20
ACC ATG AAC CAT GCC CTA AGC TGT GTC AAG AAG GAG AAG GAA CGT ACA	1296	
Thr MET Asn His Ala Leu Ser Cys Val Lys Lys Glu Lys Glu Arg Thr		
420 425 430		
GCG GCC TTC CAA GCC CTG GGG CTA CTT TCT GTG GCT GTG AGG TCT GAG	1344	
Ala Ala Phe Gln Ala Leu Gly Leu Leu Ser Val Ala Val Arg Ser Glu		
435 440 445		
TTT AAG GTC TAT TTG CCT CGC GTG CTG GAC ATC ATC CGA GCG GCC CTG	1392	
Phe Lys Val Tyr Leu Pro Arg Val Leu Asp Ile Ile Arg Ala Ala Leu		30
450 455 460		
CCC CCA AAG GAC TTC GCC CAT AAG AGG CAG AAG GCA ATG CAG GTG GAC	1440	
Pro Pro Lys Asp Phe Ala His Lys Arg Gln Lys Ala MET Gln Val Asp		
465 470 475		
GCC ACA GTC TTC ACT TGC ATC AGC ATG CTG GCT CGA GCA ATG GGG CCA	1488	
Ala Thr Val Phe Thr Cys Ile Ser MET Leu Ala Arg Ala MET Gly Pro		
480 485 490 495		40
GGC ATC CAG CAG GAT ATC AAG GAG CTG CTG GAG CCC ATG CTG GCA GTG	1536	
Gly Ile Gln Gln Asp Ile Lys Glu Leu Leu Glu Pro MET Leu Ala Val		
500 505 510		
GGA CTA AGC CCT GCC CTC ACT GCA GTG CTC TAC GAC CTG AGC CGT CAG	1584	
Gly Leu Ser Pro Ala Leu Thr Ala Val Leu Tyr Asp Leu Ser Arg Gln		
515 520 525		
ATT CCA CAG CTA AAG AAG GAC ATT CAA GAT GGG CTA CTG AAA ATG CTG	1632	
Ile Pro Gln Leu Lys Lys Asp Ile Gln Asp Gly Leu Leu Lys MET Leu		50

530	535	540		
TCC CTG GTC CTT ATG CAC AAA CCC CTT CGC CAC CCA GGC ATG CCC AAG			1680	
Ser Leu Val Leu MET His Lys Pro Leu Arg His Pro Gly MET Pro Lys				
545	550	555		
GGC CTG GCC CAT CAG CTG GCC TCT CCT GGC CTC ACG ACC CTC CCT GAG			1728	
Gly Leu Ala His Gln Leu Ala Ser Pro Gly Leu Thr Thr Leu Pro Glu				
560	565	570	575	
GCC AGC GAT GTG GGC AGC ATC ACT CTT GCC CTC CGA ACG CTT GGC AGC			1776	
Ala Ser Asp Val Gly Ser Ile Thr Leu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Ser				
580	585	590		
TTT GAA TTT GAA GGC CAC TCT CTG ACC CAA TTT GTT CGC CAC TGT GCG			1824	
Phe Glu Phe Glu Gly His Ser Leu Thr Gln Phe Val Arg His Cys Ala				
595	600	605		
GAT CAT TTC CTG AAC AGT GAG CAC AAG GAG ATC CGC ATG GAG GCT GCC			1872	
Asp His Phe Leu Asn Ser Glu His Lys Glu Ile Arg MET Glu Ala Ala				
610	615	620		20
CGC ACC TGC TCC CGC CTG CTC ACA CCC TCC ATC CAC CTC ATC AGT GGC			1920	
Arg Thr Cys Ser Arg Leu Leu Thr Pro Ser Ile His Leu Ile Ser Gly				
625	630	635		
CAT GCT CAT GTG GTT AGC CAG ACC GCA GTG CAA GTG GTG GCA GAT GTG			1968	
His Ala His Val Val Ser Gln Thr Ala Val Gln Val Val Ala Asp Val				
640	645	650	655	
CTT AGC AAA CTG CTC GTA GTT GGG ATA ACA GAT CCT GAC CCT GAC ATT			2016	
Leu Ser Lys Leu Leu Val Val Gly Ile Thr Asp Pro Asp Pro Asp Ile				
660	665	670		
CGC TAC TGT GTC TTG GCG TCC CTG GAC GAG CGC TTT GAT GCA CAC CTG			2064	
Arg Tyr Cys Val Leu Ala Ser Leu Asp Glu Arg Phe Asp Ala His Leu				
675	680	685		
GCC CAG GCG GAG AAC TTG CAG GCC TTG TTT GTG GCT CTG AAT GAC CAG			2112	
Ala Gln Ala Glu Asn Leu Gln Ala Leu Phe Val Ala Leu Asn Asp Gln				
690	695	700		40
GTG TTT GAG ATC CGG GAG CTG GCC ATC TGC ACT GTG GGC CGA CTC AGT			2160	
Val Phe Glu Ile Arg Glu Leu Ala Ile Cys Thr Val Gly Arg Leu Ser				
705	710	715		
AGC ATG AAC CCT GCC TTT GTC ATG CCT TTC CTG CGC AAG ATG CTC ATC			2208	
Ser MET Asn Pro Ala Phe Val MET Pro Phe Leu Arg Lys MET Leu Ile				
720	725	730	735	

10

20

30

40

50

CAG ATT TTG ACA GAG TTG GAG CAC AGT GGG ATT GGA AGA ATC AAA GAG	2256	
Gln Ile Leu Thr Glu Leu Glu His Ser Gly Ile Gly Arg Ile Lys Glu		
740 745 750		
CAG AGT GCC CGC ATG CTG GGG CAC CTG GTC TCC AAT GCC CCC CGA CTC	2304	
Gln Ser Ala Arg MET Leu Gly His Leu Val Ser Asn Ala Pro Arg Leu		
755 760 765		
ATC CGC CCC TAC ATG GAG CCT ATT CTG AAG GCA TTA ATT TTG AAA CTG	2352	
Ile Arg Pro Tyr MET Glu Pro Ile Leu Lys Ala Leu Ile Leu Lys Leu		10
770 775 780		
AAA GAT CCA GAC CCT GAT CCA AAC CCA GGT GTG ATC AAT AAT GTC CTG	2400	
Lys Asp Pro Asp Pro Asp Pro Asn Pro Gly Val Ile Asn Asn Val Leu		
785 790 795		
GCA ACA ATA GGA GAA TTG GCA CAG GTT AGT GGC CTG GAA ATG AGG AAA	2448	
Ala Thr Ile Gly Glu Leu Ala Gln Val Ser Gly Leu Glu MET Arg Lys		
800 805 810 815		20
TGG GTT GAT GAA CTT TTT ATT ATC ATC ATG GAC ATG CTC CAG GAT TCC	2496	
Trp Val Asp Glu Leu Phe Ile Ile Ile MET Asp MET Leu Gln Asp Ser		
820 825 830		
TCT TTG TTG GCC AAA AGG CAG GTG GCT CTG TGG ACC CTG GGA CAG TTG	2544	
Ser Leu Leu Ala Lys Arg Gln Val Ala Leu Trp Thr Leu Gly Gln Leu		
835 840 845		
GTG GCC AGC ACT GGC TAT GTA GTA GAG CCC TAC AGG AAG TAC CCT ACT	2592	
Val Ala Ser Thr Gly Tyr Val Val Glu Pro Tyr Arg Lys Tyr Pro Thr		30
850 855 860		
TTG CTT GAG GTG CTA CTG AAT TTT CTG AAG ACT GAG CAG AAC CAG GGT	2640	
Leu Leu Glu Val Leu Leu Asn Phe Leu Lys Thr Glu Gln Asn Gln Gly		
865 870 875		
ACA CGC AGA GAG GCC ATC CGT GTG TTA GGG CTT TTA GGG GCT TTG GAT	2688	
Thr Arg Arg Glu Ala Ile Arg Val Leu Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asp		
880 885 890 895		40
CCT TAC AAG CAC AAA GTG AAC ATT GGC ATG ATA GAC CAG TCC CGG GAT	2736	
Pro Tyr Lys His Lys Val Asn Ile Gly MET Ile Asp Gln Ser Arg Asp		
900 905 910		
GCC TCT GCT GTC AGC CTG TCA GAA TCC AAG TCA AGT CAG GAT TCC TCT	2784	
Ala Ser Ala Val Ser Leu Ser Glu Ser Lys Ser Ser Gln Asp Ser Ser		
915 920 925		
GAC TAT AGC ACT AGT GAA ATG CTG GTC AAC ATG GGA AAC TTG CCT CTG	2832	
Asp Tyr Ser Thr Ser Glu MET Leu Val Asn MET Gly Asn Leu Pro Leu		50

930	935	940		
GAT GAG TTC TAC CCA GCT GTG TCC ATG GTG GCC CTG ATG CGG ATC TTC			2880	
Asp Glu Phe Tyr Pro Ala Val Ser MET Val Ala Leu MET Arg Ile Phe				
945	950	955		
CGA GAC CAG TCA CTC TCT CAT CAT CAC ACC ATG GTT GTC CAG GCC ATC			2928	
Arg Asp Gln Ser Leu Ser His His His Thr MET Val Val Gln Ala Ile				
960	965	970	975	
ACC TTC ATC TTC AAG TCC CTG GGA CTC AAA TGT GTG CAG TTC CTG CCC			2976	
Thr Phe Ile Phe Lys Ser Leu Gly Leu Lys Cys Val Gln Phe Leu Pro				
980	985	990		10
CAG GTC ATG CCC ACG TTC CTT AAT GTC ATT CGA GTC TGT GAT GGG GCC			3024	
Gln Val MET Pro Thr Phe Leu Asn Val Ile Arg Val Cys Asp Gly Ala				
995	1000	1005		
ATC CGG GAA TTT TTG TTC CAG CAG CTG GGA ATG TTG GTG TCC TTT GTG			3072	
Ile Arg Glu Phe Leu Phe Gln Gln Leu Gly MET Leu Val Ser Phe Val				20
1010	1015	1020		
AAG AGC CAC ATC AGA CCT TAT ATG GAT GAA ATA GTC ACC CTC ATG AGA			3120	
Lys Ser His Ile Arg Pro Tyr MET Asp Glu Ile Val Thr Leu MET Arg				
1025	1030	1035		
GAA TTC TGG GTC ATG AAC ACC TCA ATT CAG AGC ACG ATC ATT CTT CTC			3168	
Glu Phe Trp Val MET Asn Thr Ser Ile Gln Ser Thr Ile Ile Leu Leu				
1040	1045	1050	1055	
ATT GAG CAA ATT GTG GTA GCT CTT GGG GGT GAA TTT AAG CTC TAC CTG			3216	
Ile Glu Gln Ile Val Val Ala Leu Gly Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Leu				
1060	1065	1070		30
CCC CAG CTG ATC CCA CAC ATG CTG CGT GTC TTC ATG CAT GAC AAC AGC			3264	
Pro Gln Leu Ile Pro His MET Leu Arg Val Phe MET His Asp Asn Ser				
1075	1080	1085		
CCA GGC CGC ATT GTC TCT ATC AAG TTA CTG GCT GCA ATC CAG CTG TTT			3312	
Pro Gly Arg Ile Val Ser Ile Lys Leu Leu Ala Ala Ile Gln Leu Phe				40
1090	1095	1100		
GGC GCC AAC CTG GAT GAC TAC CTG CAT TTA CTG CTG CCT CCT ATT GTT			3360	
Gly Ala Asn Leu Asp Asp Tyr Leu His Leu Leu Leu Pro Pro Ile Val				
1105	1110	1115		
AAG TTG TTT GAT GCC CCT GAA GCT CCA CTG CCA TCT CGA AAG GCA GCG			3408	
Lys Leu Phe Asp Ala Pro Glu Ala Pro Leu Pro Ser Arg Lys Ala Ala				
1120	1125	1130	1135	50

CTA GAG ACT GTG GAC CGC CTG ACG GAG TCC CTG GAT TTC ACT GAC TAT	3456	
Leu Glu Thr Val Asp Arg Leu Thr Glu Ser Leu Asp Phe Thr Asp Tyr		
1140 1145 1150		
GCC TCC CGG ATC ATT CAC CCT ATT GTT CGA ACA CTG GAC CAG AGC CCA	3504	
Ala Ser Arg Ile Ile His Pro Ile Val Arg Thr Leu Asp Gln Ser Pro		
1155 1160 1165		
GAA CTG CGC TCC ACA GCC ATG GAC ACG CTG TCT TCA CTT GTT TTT CAG	3552	
Glu Leu Arg Ser Thr Ala MET Asp Thr Leu Ser Ser Leu Val Phe Gln		10
1170 1175 1180		
CTG GGG AAG AAG TAC CAA ATT TTC ATT CCA ATG GTG AAT AAA GTT CTG	3600	
Leu Gly Lys Lys Tyr Gln Ile Phe Ile Pro MET Val Asn Lys Val Leu		
1185 1190 1195		
GTG CGA CAC CGA ATC AAT CAT CAG CGC TAT GAT GTG CTC ATC TGC AGA	3648	
Val Arg His Arg Ile Asn His Gln Arg Tyr Asp Val Leu Ile Cys Arg		
1200 1205 1210 1215		20
ATT GTC AAG GGA TAC ACA CTT GCT GAT GAA GAG GAG GAT CCT TTG ATT	3696	
Ile Val Lys Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Glu Glu Glu Asp Pro Leu Ile		
1220 1225 1230		
TAC CAG CAT CGG ATG CTT AGG AGT GGC CAA GGG GAT GCA TTG GCT AGT	3744	
Tyr Gln His Arg MET Leu Arg Ser Gly Gln Gly Asp Ala Leu Ala Ser		
1235 1240 1245		
GGA CCA GTG GAA ACA GGA CCC ATG AAG AAA CTG CAC GTC AGC ACC ATC	3792	
Gly Pro Val Glu Thr Gly Pro MET Lys Lys Leu His Val Ser Thr Ile		30
1250 1255 1260		
AAC CTC CAA AAG GCC TGG GGC GCT GCC AGG AGG GTC TCC AAA GAT GAC	3840	
Asn Leu Gln Lys Ala Trp Gly Ala Ala Arg Arg Val Ser Lys Asp Asp		
1265 1270 1275		
TGG CTG GAA TGG CTG AGA CGG CTG AGC CTG GAG CTG CTG AAG GAC TCA	3888	
Trp Leu Glu Trp Leu Arg Arg Leu Ser Leu Glu Leu Leu Lys Asp Ser		
1280 1285 1290 1295		40
TCA TCG CCC TCC CTG CGC TCC TGC TGG GCC CTG GCA CAG GCC TAC AAC	3936	
Ser Ser Pro Ser Leu Arg Ser Cys Trp Ala Leu Ala Gln Ala Tyr Asn		
1300 1305 1310		
CCG ATG GCC AGG GAT CTC TTC AAT GCT GCA TTT GTG TCC TGC TGG TCT	3984	
Pro MET Ala Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ala Phe Val Ser Cys Trp Ser		
1315 1320 1325		
GAA CTG AAT GAA GAT CAA CAG GAT GAG CTC ATC AGA AGC ATC GAG TTG	4032	
Glu Leu Asn Glu Asp Gln Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ser Ile Glu Leu		50

1330	1335	1340		
GCC CTC ACC TCA CAA GAC ATC GCT GAA GTC ACA CAG ACC CTC TTA AAC			4080	
Ala Leu Thr Ser Gln Asp Ile Ala Glu Val Thr Gln Thr Leu Leu Asn				
1345	1350	1355		
TTG GCT GAA TTC ATG GAA CAC AGT GAC AAG GGC CCC CTG CCA CTG AGA			4128	
Leu Ala Glu Phe MET Glu His Ser Asp Lys Gly Pro Leu Pro Leu Arg				
1360	1365	1370	1375	
GAT GAC AAT GGC ATT GTT CTG CTG GGT GAG AGA GCT GCC AAG TGC CGA			4176	
Asp Asp Asn Gly Ile Val Leu Leu Gly Glu Arg Ala Ala Lys Cys Arg				
1380	1385	1390		10
GCA TAT GCC AAA GCA CTA CAC TAC AAA GAA CTG GAG TTC CAG AAA GGC			4224	
Ala Tyr Ala Lys Ala Leu His Tyr Lys Glu Leu Glu Phe Gln Lys Gly				
1395	1400	1405		
CCC ACC CCT GCC ATT CTA GAA TCT CTC ATC AGC ATT AAT AAT AAG CTA			4272	
Pro Thr Pro Ala Ile Leu Glu Ser Leu Ile Ser Ile Asn Asn Lys Leu				20
1410	1415	1420		
CAG CAG CCG GAG GCA GCG GCC GGA GTG TTA GAA TAT GCC ATG AAA CAC			4320	
Gln Gln Pro Glu Ala Ala Ala Gly Val Leu Glu Tyr Ala MET Lys His				
1425	1430	1435		
TTT GGA GAG CTG GAG ATC CAG GCT ACC TGG TAT GAG AAA CTG CAC GAG			4368	
Phe Gly Glu Leu Glu Ile Gln Ala Thr Trp Tyr Glu Lys Leu His Glu				
1440	1445	1450	1455	
TGG GAG GAT GCC CTT GTG GCC TAT GAC AAG AAA ATG GAC ACC AAC AAG			4416	
Trp Glu Asp Ala Leu Val Ala Tyr Asp Lys Lys MET Asp Thr Asn Lys				
1460	1465	1470		30
GAC GAC CCA GAG CTG ATG CTG GGC CGC ATG CGC TGC CTC GAG GCC TTG			4464	
Asp Asp Pro Glu Leu MET Leu Gly Arg MET Arg Cys Leu Glu Ala Leu				
1475	1480	1485		
GGG GAA TGG GGT CAA CTC CAC CAG CAG TGC TGT GAA AAG TGG ACC CTG			4512	
Gly Glu Trp Gly Gln Leu His Gln Gln Cys Cys Glu Lys Trp Thr Leu				40
1490	1495	1500		
GTT AAT GAT GAG ACC CAA GCC AAG ATG GCC CGG ATG GCT GCT GCA GCT			4560	
Val Asn Asp Glu Thr Gln Ala Lys MET Ala Arg MET Ala Ala Ala Ala				
1505	1510	1515		
GCA TGG GGT TTA GGT CAG TGG GAC AGC ATG GAA GAA TAC ACC TGT ATG			4608	
Ala Trp Gly Leu Gly Gln Trp Asp Ser MET Glu Glu Tyr Thr Cys MET				
1520	1525	1530	1535	50

ATC CCT CGG GAC ACC CAT GAT GGG GCA TTT TAT AGA GCT GTG CTG GCA	4656	
Ile Pro Arg Asp Thr His Asp Gly Ala Phe Tyr Arg Ala Val Leu Ala		
1540 1545 1550		
CTG CAT CAG GAC CTC TTC TCC TTG GCA CAA CAG TGC ATT GAC AAG GCC	4704	
Leu His Gln Asp Leu Phe Ser Leu Ala Gln Gln Cys Ile Asp Lys Ala		
1555 1560 1565		
AGG GAC CTG CTG GAT GCT GAA TTA ACT GCA ATG GCA GGA GAG AGT TAC	4752	
Arg Asp Leu Leu Asp Ala Glu Leu Thr Ala MET Ala Gly Glu Ser Tyr		10
1570 1575 1580		
AGT CGG GCA TAT GGG GCC ATG GTT TCT TGC CAC ATG CTG TCC GAG CTG	4800	
Ser Arg Ala Tyr Gly Ala MET Val Ser Cys His MET Leu Ser Glu Leu		
1585 1590 1595		
GAG GAG GTT ATC CAG TAC AAA CTT GTC CCC GAG CGA CGA GAG ATC ATC	4848	
Glu Glu Val Ile Gln Tyr Lys Leu Val Pro Glu Arg Arg Glu Ile Ile		
1600 1605 1610 1615		20
CGC CAG ATC TGG TGG GAG AGA CTG CAG GGC TGC CAG CGT ATC GTA GAG	4896	
Arg Gln Ile Trp Trp Glu Arg Leu Gln Gly Cys Gln Arg Ile Val Glu		
1620 1625 1630		
GAC TGG CAG AAA ATC CTT ATG GTG CGG TCC CTT GTG GTC AGC CCT CAT	4944	
Asp Trp Gln Lys Ile Leu MET Val Arg Ser Leu Val Val Ser Pro His		
1635 1640 1645		
GAA GAC ATG AGA ACC TGG CTC AAG TAT GCA AGC CTG TGC GGC AAG AGT	4992	
Glu Asp MET Arg Thr Trp Leu Lys Tyr Ala Ser Leu Cys Gly Lys Ser		30
1650 1655 1660		
GGC AGG CTG GCT CTT GCT CAT AAA ACT TTA GTG TTG CTC CTG GGA GTT	5040	
Gly Arg Leu Ala Leu Ala His Lys Thr Leu Val Leu Leu Leu Gly Val		
1665 1670 1675		
GAT CCG TCT CGG CAA CTT GAC CAT CCT CTG CCA ACA GTT CAC CCT CAG	5088	
Asp Pro Ser Arg Gln Leu Asp His Pro Leu Pro Thr Val His Pro Gln		
1680 1685 1690 1695		40
GTG ACC TAT GCC TAC ATG AAA AAC ATG TGG AAG AGT GCC CGC AAG ATC	5136	
Val Thr Tyr Ala Tyr MET Lys Asn MET Trp Lys Ser Ala Arg Lys Ile		
1700 1705 1710		
GAT GCC TTC CAG CAC ATG CAG CAT TTT GTC CAG ACC ATG CAG CAA CAG	5184	
Asp Ala Phe Gln His MET Gln His Phe Val Gln Thr MET Gln Gln Gln		
1715 1720 1725		
GCC CAG CAT GCC ATC GCT ACT GAG GAC CAG CAG CAT AAG CAG GAA CTG	5232	
Ala Gln His Ala Ile Ala Thr Glu Asp Gln Gln His Lys Gln Glu Leu		50

1730	1735	1740		
CAC AAG CTC ATG GCC CGA TGC TTC CTG AAA CTT GGA GAG TGG CAG CTG			5280	
His Lys Leu MET Ala Arg Cys Phe Leu Lys Leu Gly Glu Trp Gln Leu				
1745	1750	1755		
AAT CTA CAG GGC ATC AAT GAG AGC ACA ATC CCC AAA GTG CTG CAG TAC			5328	
Asn Leu Gln Gly Ile Asn Glu Ser Thr Ile Pro Lys Val Leu Gln Tyr				
1760	1765	1770		1775
TAC AGC GCC GCC ACA GAG CAC GAC CGC AGC TGG TAC AAG GCC TGG CAT			5376	
Tyr Ser Ala Ala Thr Glu His Asp Arg Ser Trp Tyr Lys Ala Trp His				
1780	1785	1790		
GCG TGG GCA GTG ATG AAC TTC GAA GCT GTG CTA CAC TAC AAA CAT CAG			5424	
Ala Trp Ala Val MET Asn Phe Glu Ala Val Leu His Tyr Lys His Gln				
1795	1800	1805		
AAC CAA GCC CGC GAT GAG AAG AAG AAA CTG CGT CAT GCC AGC GGG GCC			5472	
Asn Gln Ala Arg Asp Glu Lys Lys Lys Leu Arg His Ala Ser Gly Ala				20
1810	1815	1820		
AAC ATC ACC AAC GCC ACC ACT GCC GCC ACC ACG GCC GCC ACT GCC ACC			5520	
Asn Ile Thr Asn Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr				
1825	1830	1835		
ACC ACT GCC AGC ACC GAG GGC AGC AAC AGT GAG AGC GAG GCC GAG AGC			5568	
Thr Thr Ala Ser Thr Glu Gly Ser Asn Ser Glu Ser Glu Ala Glu Ser				
1840	1845	1850		1855
ACC GAG AAC AGC CCC ACC CCA TCG CCG CTG CAG AAG AAG GTC ACT GAG			5616	
Thr Glu Asn Ser Pro Thr Pro Ser Pro Leu Gln Lys Lys Val Thr Glu				
1860	1865	1870		
GAT CTG TCC AAA ACC CTC CTG ATG TAC ACG GTG CCT GCC GTC CAG GGC			5664	
Asp Leu Ser Lys Thr Leu Leu MET Tyr Thr Val Pro Ala Val Gln Gly				
1875	1880	1885		
TTC TTC CGT TCC ATC TCC TTG TCA CGA GGC AAC AAC CTC CAG GAT ACA			5712	
Phe Phe Arg Ser Ile Ser Leu Ser Arg Gly Asn Asn Leu Gln Asp Thr				40
1890	1895	1900		
CTC AGA GTT CTC ACC TTA TGG TTT GAT TAT GGT CAC TGG CCA GAT GTC			5760	
Leu Arg Val Leu Thr Leu Trp Phe Asp Tyr Gly His Trp Pro Asp Val				
1905	1910	1915		
AAT GAG GCC TTA GTG GAG GGG GTG AAA GCC ATC CAG ATT GAT ACC TGG			5808	
Asn Glu Ala Leu Val Glu Gly Val Lys Ala Ile Gln Ile Asp Thr Trp				
1920	1925	1930		1935

CTA CAG GTT ATA CCT CAG CTC ATT GCA AGA ATT GAT ACG CCC AGA CCC	5856	
Leu Gln Val Ile Pro Gln Leu Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro		
1940 1945 1950		
TTG GTG GGA CGT CTC ATT CAC CAG CTT CTC ACA GAC ATT GGT CGG TAC	5904	
Leu Val Gly Arg Leu Ile His Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr		
1955 1960 1965		
CAC CCC CAG GCC CTC ATC TAC CCA CTG ACA GTG GCT TCT AAG TCT ACC	5952	10
His Pro Gln Ala Leu Ile Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr		
1970 1975 1980		
ACG ACA GCC CGG CAC AAT GCA GCC AAC AAG ATT CTG AAG AAC ATG TGT	6000	
Thr Thr Ala Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn MET Cys		
1985 1990 1995		
GAG CAC AGC AAC ACC CTG GTC CAG CAG GCC ATG ATG GTG AGC GAG GAG	6048	
Glu His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala MET MET Val Ser Glu Glu		
2000 2005 2010 2015		20
CTG ATC CGA GTG GCC ATC CTC TGG CAT GAG ATG TGG CAT GAA GGC CTG	6096	
Leu Ile Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu MET Trp His Glu Gly Leu		
2020 2025 2030		
GAA GAG GCA TCT CGT TTG TAC TTT GGG GAA AGG AAC GTG AAA GGC ATG	6144	
Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly MET		
2035 2040 2045		
TTT GAG GTG CTG GAG CCC TTG CAT GCT ATG ATG GAA CGG GGC CCC CAG	6192	30
Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala MET MET Glu Arg Gly Pro Gln		
2050 2055 2060		
ACT CTG AAG GAA ACA TCC TTT AAT CAG GCC TAT GGT CGA GAT TTA ATG	6240	
Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu MET		
2065 2070 2075		
GAG GCC CAA GAG TGG TGC AGG AAG TAC ATG AAA TCA GGG AAT GTC AAG	6288	
Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr MET Lys Ser Gly Asn Val Lys		
2080 2085 2090 2095		40
GAC CTC ACC CAA GCC TGG GAC CTC TAT TAT CAT GTG TTC CGA CGA ATC	6336	
Asp Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile		
2100 2105 2110		
TCA AAG CAG CTG CCT CAG CTC ACA TCC TTA GAG CTG CAA TAT GTT TCC	6384	
Ser Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser		
2115 2120 2125		
CCA AAA CTT CTG ATG TGC CGG GAC CTT GAA TTG GCT GTG CCA GGA ACA	6432	50
Pro Lys Leu Leu MET Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr		

2130	2135	2140		
TAT GAC CCC AAC CAG CCA ATC ATT CGC ATT CAG TCC ATA GCA CCG TCT			6480	
Tyr Asp Pro Asn Gln Pro Ile Ile Arg Ile Gln Ser Ile Ala Pro Ser				
2145	2150	2155		
TTG CAA GTC ATC ACA TCC AAG CAG AGG CCC CGG AAA TTG ACA CTT ATG			6528	
Leu Gln Val Ile Thr Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Thr Leu MET				
2160	2165	2170	2175	
GGC AGC AAC GGA CAT GAG TTT GTT TTC CTT CTA AAA GGC CAT GAA GAT			6576	
Gly Ser Asn Gly His Glu Phe Val Phe Leu Leu Lys Gly His Glu Asp				
2180	2185	2190		10
CTG CGC CAG GAT GAG CGT GTG ATG CAG CTC TTC GGC CTG GTT AAC ACC			6624	
Leu Arg Gln Asp Glu Arg Val MET Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr				
2195	2200	2205		
CTT CTG GCC AAT GAC CCA ACA TCT CTT CGG AAA AAC CTC AGC ATC CAG			6672	
Leu Leu Ala Asn Asp Pro Thr Ser Leu Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln				20
2210	2215	2220		
AGA TAC GCT GTC ATC CCT TTA TCG ACC AAC TCG GGC CTC ATT GGC TGG			6720	
Arg Tyr Ala Val Ile Pro Leu Ser Thr Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp				
2225	2230	2235		
GTT CCC CAC TGT GAC ACA CTG CAC GCC CTC ATC CGG GAC TAC AGG GAG			6768	
Val Pro His Cys Asp Thr Leu His Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu				
2240	2245	2250	2255	
AAG AAG AAG ATC CTT CTC AAC ATC GAG CAT CGC ATC ATG TTG CGG ATG			6816	
Lys Lys Lys Ile Leu Leu Asn Ile Glu His Arg Ile MET Leu Arg MET				
2260	2265	2270		30
GCT CCG GAC TAT GAC CAC TTG ACT CTG ATG CAG AAG GTG GAG GTG TTT			6864	
Ala Pro Asp Tyr Asp His Leu Thr Leu MET Gln Lys Val Glu Val Phe				
2275	2280	2285		
GAG CAT GCC GTC AAT AAT ACA GCT GGG GAC GAC CTG GCC AAG CTG CTG			6912	
Glu His Ala Val Asn Asn Thr Ala Gly Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu				40
2290	2295	2300		
TGG CTG AAA AGC CCC AGC TCC GAG GTG TGG TTT GAC CGA AGA ACC AAT			6960	
Trp Leu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Val Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn				
2305	2310	2315		
TAT ACC CGT TCT TTA GCG GTC ATG TCA ATG GTT GGG TAT ATT TTA GGC			7008	
Tyr Thr Arg Ser Leu Ala Val MET Ser MET Val Gly Tyr Ile Leu Gly				
2320	2325	2330	2335	

CTG GGA GAT AGA CAC CCA TCC AAC CTG ATG CTG GAC CGT CTG AGT GGG	7056	
Leu Gly Asp Arg His Pro Ser Asn Leu MET Leu Asp Arg Leu Ser Gly		
2340	2345	2350
AAG ATC CTG CAC ATT GAC TTT GGG GAC TGC TTT GAG GTT GCT ATG ACC	7104	
Lys Ile Leu His Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala MET Thr		
2355	2360	2365
CGA GAG AAG TTT CCA GAG AAG ATT CCA TTT AGA CTA ACA AGA ATG TTG	7152	
Arg Glu Lys Phe Pro Glu Lys Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg MET Leu		10
2370	2375	2380
ACC AAT GCT ATG GAG GTT ACA GGC CTG GAT GGC AAC TAC AGA ATC ACA	7200	
Thr Asn Ala MET Glu Val Thr Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr		
2385	2390	2395
TGC CAC ACA GTG ATG GAG GTG CTG CGA GAG CAC AAG GAC AGT GTC ATG	7248	
Cys His Thr Val MET Glu Val Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val MET		
2400	2405	2410
2415		
		20
GCC GTG CTG GAA GCC TTT GTC TAT GAC CCC TTG CTG AAC TGG AGG CTG	7296	
Ala Val Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu		
2420	2425	2430
2435		
ATG GAC ACA AAT ACC AAA GGC AAC AAG CGA TCC CGA ACG AGG ACG GAT	7344	
MET Asp Thr Asn Thr Lys Gly Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp		
2435	2440	2445
TCC TAC TCT GCT GGC CAG TCA GTC GAA ATT TTG GAC GGT GTG GAA CTT	7392	
Ser Tyr Ser Ala Gly Gln Ser Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu		
2450	2455	2460
		30
GGA GAG CCA GCC CAT AAG AAA ACG GGC ACC ACA GTG CCA GAA TCT ATT	7440	
Gly Glu Pro Ala His Lys Lys Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile		
2465	2470	2475
CAT TCT TTC ATT GGA GAC GGT TTG GTG AAA CCA GAG GCC CTA AAT AAG	7488	
His Ser Phe Ile Gly Asp Gly Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys		
2480	2485	2490
2495		
		40
AAA GCT ATC CAG ATT ATT AAC AGG GTT CGA GAT AAG CTC ACT GGT CGG	7536	
Lys Ala Ile Gln Ile Ile Asn Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg		
2500	2505	2510
GAC TTC TCT CAT GAT GAC ACT TTG GAT GTT CCA ACG CAA GTT GAG CTG	7584	
Asp Phe Ser His Asp Asp Thr Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu		
2515	2520	2525
CTC ATC AAA CAA GCG ACA TCC CAT GAA AAC CTC TGC CAG TGC TAT ATT	7632	
Leu Ile Lys Gln Ala Thr Ser His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile		
		50

2530

2535

2540

GGC TGG TAC CCT TTC TGG TAA

Gly Trp Tyr Pro Phe Trp

2545

【 0 0 7 6 】

配列番号：2

配列の長さ：3 4 2 3

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A t o m R N A

ハイポセチカル配列：N o

アンチセンス：N o

起源

生物名：モルト4ヒトT細胞白血病細胞

株名：A T C C C R L 1 5 8 2 株

配列：

ATG TCC CCT ATA CTA GGT TAT TGG AAA ATT AAG GGC CTT GTG CAA CCC 48 20

MET Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro

1

5

10

15

ACT CGA CTT CTT TTG GAA TAT CTT GAA GAA AAA TAT GAA GAG CAT TTG 96

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu

20

25

30

TAT GAG CGC GAT GAA GGT GAT AAA TGG CGA AAC AAA AAG TTT GAA TTG 144

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu

35

40

45

GGT TTG GAG TTT CCC AAT CTT CCT TAT TAT ATT GAT GGT GAT GTT AAA 192

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys

50

55

60

TTA ACA CAG TCT ATG GCC ATC ATA CGT TAT ATA GCT GAC AAG CAC AAC 240

Leu Thr Gln Ser MET Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn

65

70

75

80

ATG TTG GGT GGT TGT CCA AAA GAG CGT GCA GAG ATT TCA ATG CTT GAA 288 40

MET Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser MET Leu Glu

85

90

95

GGA GCG GTT TTG GAT ATT AGA TAC GGT GTT TCG AGA ATT GCA TAT AGT 336

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser

100

105

110

AAA GAC TTT GAA ACT CTC AAA GTT GAT TTT CTT AGC AAG CTA CCT GAA 384

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu

115

120

125

10

20

30

40

50

ATG CTG AAA ATG TTC GAA GAT CGT TTA TGT CAT AAA ACA TAT TTA AAT	432	
MET Leu Lys MET Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn		
130 135 140		
GGT GAT CAT GTA ACC CAT CCT GAC TTC ATG TTG TAT GAC GCT CTT GAT	480	
Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe MET Leu Tyr Asp Ala Leu Asp		
145 150 155 160		
GTT GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTG GAT GCG TTC CCA AAA TTA	528	10
Val Val Leu Tyr MET Asp Pro MET Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu		
165 170 175		
GTT TGT TTT AAA AAA CGT ATT GAA GCT ATC CCA CAA ATT GAT AAG TAC	576	
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr		
180 185 190		
TTG AAA TCC AGC AAG TAT ATA GCA TGG CCT TTG CAG GGC TGG CAA GCC	624	
Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala		
195 200 205		20
ACG TTT GGT GGT GGC GAC CAT CCT CCA AAA TCG GAT CTG GTT CCG CGT	672	
Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg		
210 215 220		
GGT GGA TCC CCG GGA ATT TCC GGT GGT GGT GGT GGT GGA ATT CTA GAC	720	
Gly Gly Ser Pro Gly Ile Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Leu Asp		
225 230 235 240		
GAC TCC ATG AGC TTC AAG TAT GCA AGC CTG TGC GGC AAG AGT GGC AGG	768	30
Asp Ser MET Ser Phe Lys Tyr Ala Ser Leu Cys Gly Lys Ser Gly Arg		
245 250 255		
CTG GCT CTT GCT CAT AAA ACT TTA GTG TTG CTC CTG GGA GTT GAT CCG	816	
Leu Ala Leu Ala His Lys Thr Leu Val Leu Leu Leu Gly Val Asp Pro		
260 265 270		
TCT CGG CAA CTT GAC CAT CCT CTG CCA ACA GTT CAC CCT CAG GTG ACC	864	
Ser Arg Gln Leu Asp His Pro Leu Pro Thr Val His Pro Gln Val Thr		
275 280 285		40
TAT GCC TAC ATG AAA AAC ATG TGG AAG AGT GCC CGC AAG ATC GAT GCC	912	
Tyr Ala Tyr MET Lys Asn MET Trp Lys Ser Ala Arg Lys Ile Asp Ala		
290 295 300		
TTC CAG CAC ATG CAG CAT TTT GTC CAG ACC ATG CAG CAA CAG GCC CAG	960	
Phe Gln His MET Gln His Phe Val Gln Thr MET Gln Gln Gln Ala Gln		
305 310 315 320		
CAT GCC ATC GCT ACT GAG GAC CAG CAG CAT AAG CAG GAA CTG CAC AAG	1008	50

His	Ala	Ile	Ala	Thr	Glu	Asp	Gln	Gln	His	Lys	Gln	Glu	Leu	His	Lys		
				325					330					335			
CTC	ATG	GCC	CGA	TGC	TTC	CTG	AAA	CTT	GGA	GAG	TGG	CAG	CTG	AAT	CTA	1056	
Leu	MET	Ala	Arg	Cys	Phe	Leu	Lys	Leu	Gly	Glu	Trp	Gln	Leu	Asn	Leu		
			340					345					350				
CAG	GGC	ATC	AAT	GAG	AGC	ACA	ATC	CCC	AAA	GTG	CTG	CAG	TAC	TAC	AGC	1104	
Gln	Gly	Ile	Asn	Glu	Ser	Thr	Ile	Pro	Lys	Val	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Ser		10
			355					360					365				
GCC	GCC	ACA	GAG	CAC	GAC	CGC	AGC	TGG	TAC	AAG	GCC	TGG	CAT	GCG	TGG	1152	
Ala	Ala	Thr	Glu	His	Asp	Arg	Ser	Trp	Tyr	Lys	Ala	Trp	His	Ala	Trp		
		370					375					380					
GCA	GTG	ATG	AAC	TTC	GAA	GCT	GTG	CTA	CAC	TAC	AAA	CAT	CAG	AAC	CAA	1200	
Ala	Val	MET	Asn	Phe	Glu	Ala	Val	Leu	His	Tyr	Lys	His	Gln	Asn	Gln		
385					390					395					400		
GCC	CGC	GAT	GAG	AAG	AAG	AAA	CTG	CGT	CAT	GCC	AGC	GGG	GCC	AAC	ATC	1248	20
Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Lys	Lys	Leu	Arg	His	Ala	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile		
				405					410					415			
ACC	AAC	GCC	ACC	ACT	GCC	GCC	ACC	ACG	GCC	GCC	ACT	GCC	ACC	ACC	ACT	1296	
Thr	Asn	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr		
				420					425					430			
GCC	AGC	ACC	GAG	GGC	AGC	AAC	AGT	GAG	AGC	GAG	GCC	GAG	AGC	ACC	GAG	1344	
Ala	Ser	Thr	Glu	Gly	Ser	Asn	Ser	Glu	Ser	Glu	Ala	Glu	Ser	Thr	Glu		30
			435					440						445			
AAC	AGC	CCC	ACC	CCA	TCG	CCG	CTG	CAG	AAG	AAG	GTC	ACT	GAG	GAT	CTG	1392	
Asn	Ser	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Lys	Lys	Val	Thr	Glu	Asp	Leu		
			450				455						460				
TCC	AAA	ACC	CTC	CTG	ATG	TAC	ACG	GTG	CCT	GCC	GTC	CAG	GGC	TTC	TTC	1440	
Ser	Lys	Thr	Leu	Leu	MET	Tyr	Thr	Val	Pro	Ala	Val	Gln	Gly	Phe	Phe		
465					470					475					480		
CGT	TCC	ATC	TCC	TTG	TCA	CGA	GGC	AAC	AAC	CTC	CAG	GAT	ACA	CTC	AGA	1488	40
Arg	Ser	Ile	Ser	Leu	Ser	Arg	Gly	Asn	Asn	Leu	Gln	Asp	Thr	Leu	Arg		
				485						490					495		
GTT	CTC	ACC	TTA	TGG	TTT	GAT	TAT	GGT	CAC	TGG	CCA	GAT	GTC	AAT	GAG	1536	
Val	Leu	Thr	Leu	Trp	Phe	Asp	Tyr	Gly	His	Trp	Pro	Asp	Val	Asn	Glu		
				500					505						510		
GCC	TTA	GTG	GAG	GGG	GTG	AAA	GCC	ATC	CAG	ATT	GAT	ACC	TGG	CTA	CAG	1584	
Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Val	Lys	Ala	Ile	Gln	Ile	Asp	Thr	Trp	Leu	Gln		50
			515					520							525		

GTT ATA CCT CAG CTC ATT GCA AGA ATT GAT ACG CCC AGA CCC TTG GTG	1632	
Val Ile Pro Gln Leu Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro Leu Val		
530 535 540		
GGA CGT CTC ATT CAC CAG CTT CTC ACA GAC ATT GGT CGG TAC CAC CCC	1680	
Gly Arg Leu Ile His Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr His Pro		
545 550 555 560		
CAG GCC CTC ATC TAC CCA CTG ACA GTG GCT TCT AAG TCT ACC ACG ACA	1728	10
Gln Ala Leu Ile Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr Thr Thr		
565 570 575		
GCC CGG CAC AAT GCA GCC AAC AAG ATT CTG AAG AAC ATG TGT GAG CAC	1776	
Ala Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn MET Cys Glu His		
580 585 590		
AGC AAC ACC CTG GTC CAG CAG GCC ATG ATG GTG AGC GAG GAG CTG ATC	1824	
Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala MET MET Val Ser Glu Glu Leu Ile		
595 600 605		20
CGA GTG GCC ATC CTC TGG CAT GAG ATG TGG CAT GAA GGC CTG GAA GAG	1872	
Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu MET Trp His Glu Gly Leu Glu Glu		
610 615 620		
GCA TCT CGT TTG TAC TTT GGG GAA AGG AAC GTG AAA GGC ATG TTT GAG	1920	
Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly MET Phe Glu		
625 630 635 640		
GTG CTG GAG CCC TTG CAT GCT ATG ATG GAA CGG GGC CCC CAG ACT CTG	1968	30
Val Leu Glu Pro Leu His Ala MET MET Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu		
645 650 655		
AAG GAA ACA TCC TTT AAT CAG GCC TAT GGT CGA GAT TTA ATG GAG GCC	2016	
Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu MET Glu Ala		
660 665 670		
CAA GAG TGG TGC AGG AAG TAC ATG AAA TCA GGG AAT GTC AAG GAC CTC	2064	
Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr MET Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu		
675 680 685		40
ACC CAA GCC TGG GAC CTC TAT TAT CAT GTG TTC CGA CGA ATC TCA AAG	2112	
Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys		
690 695 700		
CAG CTG CCT CAG CTC ACA TCC TTA GAG CTG CAA TAT GTT TCC CCA AAA	2160	
Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser Pro Lys		
705 710 715 720		
CTT CTG ATG TGC CGG GAC CTT GAA TTG GCT GTG CCA GGA ACA TAT GAC	2208	50

Leu	Leu	MET	Cys	Arg	Asp	Leu	Glu	Leu	Ala	Val	Pro	Gly	Thr	Tyr	Asp			
				725					730					735				
CCC	AAC	CAG	CCA	ATC	ATT	CGC	ATT	CAG	TCC	ATA	GCA	CCG	TCT	TTG	CAA	2256		
Pro	Asn	Gln	Pro	Ile	Ile	Arg	Ile	Gln	Ser	Ile	Ala	Pro	Ser	Leu	Gln			
			740					745					750					
GTC	ATC	ACA	TCC	AAG	CAG	AGG	CCC	CGG	AAA	TTG	ACA	CTT	ATG	GGC	AGC	2304		
Val	Ile	Thr	Ser	Lys	Gln	Arg	Pro	Arg	Lys	Leu	Thr	Leu	MET	Gly	Ser			10
			755					760					765					
AAC	GGA	CAT	GAG	TTT	GTT	TTC	CTT	CTA	AAA	GGC	CAT	GAA	GAT	CTG	CGC	2352		
Asn	Gly	His	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Leu	Lys	Gly	His	Glu	Asp	Leu	Arg			
	770						775				780							
CAG	GAT	GAG	CGT	GTG	ATG	CAG	CTC	TTC	GGC	CTG	GTT	AAC	ACC	CTT	CTG	2400		
Gln	Asp	Glu	Arg	Val	MET	Gln	Leu	Phe	Gly	Leu	Val	Asn	Thr	Leu	Leu			
	785					790				795					800			
GCC	AAT	GAC	CCA	ACA	TCT	CTT	CGG	AAA	AAC	CTC	AGC	ATC	CAG	AGA	TAC	2448		20
Ala	Asn	Asp	Pro	Thr	Ser	Leu	Arg	Lys	Asn	Leu	Ser	Ile	Gln	Arg	Tyr			
				805					810					815				
GCT	GTC	ATC	CCT	TTA	TCG	ACC	AAC	TCG	GGC	CTC	ATT	GGC	TGG	GTT	CCC	2496		
Ala	Val	Ile	Pro	Leu	Ser	Thr	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Trp	Val	Pro			
			820						825					830				
CAC	TGT	GAC	ACA	CTG	CAC	GCC	CTC	ATC	CGG	GAC	TAC	AGG	GAG	AAG	AAG	2544		
His	Cys	Asp	Thr	Leu	His	Ala	Leu	Ile	Arg	Asp	Tyr	Arg	Glu	Lys	Lys			30
		835						840					845					
AAG	ATC	CTT	CTC	AAC	ATC	GAG	CAT	CGC	ATC	ATG	TTG	CGG	ATG	GCT	CCG	2592		
Lys	Ile	Leu	Leu	Asn	Ile	Glu	His	Arg	Ile	MET	Leu	Arg	MET	Ala	Pro			
		850					855				860							
GAC	TAT	GAC	CAC	TTG	ACT	CTG	ATG	CAG	AAG	GTG	GAG	GTG	TTT	GAG	CAT	2640		
Asp	Tyr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	MET	Gln	Lys	Val	Glu	Val	Phe	Glu	His			
				865			870				875				880			
GCC	GTC	AAT	AAT	ACA	GCT	GGG	GAC	GAC	CTG	GCC	AAG	CTG	CTG	TGG	CTG	2688		40
Ala	Val	Asn	Asn	Thr	Ala	Gly	Asp	Asp	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Trp	Leu			
				885					890					895				
AAA	AGC	CCC	AGC	TCC	GAG	GTG	TGG	TTT	GAC	CGA	AGA	ACC	AAT	TAT	ACC	2736		
Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Glu	Val	Trp	Phe	Asp	Arg	Arg	Thr	Asn	Tyr	Thr			
				900					905					910				
CGT	TCT	TTA	GCG	GTC	ATG	TCA	ATG	GTT	GGG	TAT	ATT	TTA	GGC	CTG	GGA	2784		
Arg	Ser	Leu	Ala	Val	MET	Ser	MET	Val	Gly	Tyr	Ile	Leu	Gly	Leu	Gly			50
			915						920					925				

GAT AGA CAC CCA TCC AAC CTG ATG CTG GAC CGT CTG AGT GGG AAG ATC	2832	
Asp Arg His Pro Ser Asn Leu MET Leu Asp Arg Leu Ser Gly Lys Ile		
930 935 940		
CTG CAC ATT GAC TTT GGG GAC TGC TTT GAG GTT GCT ATG ACC CGA GAG	2880	
Leu His Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala MET Thr Arg Glu		
945 950 955 960		
AAG TTT CCA GAG AAG ATT CCA TTT AGA CTA ACA AGA ATG TTG ACC AAT	2928	10
Lys Phe Pro Glu Lys Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg MET Leu Thr Asn		
965 970 975		
GCT ATG GAG GTT ACA GGC CTG GAT GGC AAC TAC AGA ATC ACA TGC CAC	2976	
Ala MET Glu Val Thr Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr Cys His		
980 985 990		
ACA GTG ATG GAG GTG CTG CGA GAG CAC AAG GAC AGT GTC ATG GCC GTG	3024	
Thr Val MET Glu Val Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val MET Ala Val		20
995 1000 1005		
CTG GAA GCC TTT GTC TAT GAC CCC TTG CTG AAC TGG AGG CTG ATG GAC	3072	
Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu MET Asp		
1010 1015 1020		
ACA AAT ACC AAA GGC AAC AAG CGA TCC CGA ACG AGG ACG GAT TCC TAC	3120	
Thr Asn Thr Lys Gly Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp Ser Tyr		
1025 1030 1035 1040		
TCT GCT GGC CAG TCA GTC GAA ATT TTG GAC GGT GTG GAA CTT GGA GAG	3168	30
Ser Ala Gly Gln Ser Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu Gly Glu		
1045 1050 1055		
CCA GCC CAT AAG AAA ACG GGG ACC ACA GTG CCA GAA TCT ATT CAT TCT	3216	
Pro Ala His Lys Lys Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile His Ser		
1060 1065 1070		
TTC ATT GGA GAC GGT TTG GTG AAA CCA GAG GCC CTA AAT AAG AAA GCT	3264	
Phe Ile Gly Asp Gly Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys Lys Ala		40
1075 1080 1085		
ATC CAG ATT ATT AAC AGG GTT CGA GAT AAG CTC ACT GGT CGG GAC TTC	3312	
Ile Gln Ile Ile Asn Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg Asp Phe		
1090 1095 1100		
TCT CAT GAT GAC ACT TTG GAT GTT CCA ACG CAA GTT GAG CTG CTC ATC	3360	
Ser His Asp Asp Thr Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu Leu Ile		
1105 1110 1115 1120		
AAA CAA GCG ACA TCC CAT GAA AAC CTC TGC CAG TGC TAT ATT GGC TGG	3408	50

Lys Gln Ala Thr Ser His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile Gly Trp
1125 1130 1135

TAC CCT TTC TGG TAA
Tyr Pro Phe Trp
1140

【配列表】

2008253264000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 3/10	
	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 稜

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(72)発明者 キャサリン・ルー・モルナー - キンバー

アメリカ合衆国 1 9 0 3 8 ペンシルベニア州グレンサイド、ハリソン・アベニュー 2 2 2 番

(72)発明者 ヤンキュー・チェン

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州ニューヨーク、イースト・シックスティナインス・ストリート 4 2 7 番 ナンバー 3 イー

(72)発明者 中西 香爾

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州ニューヨーク、リバーサイド・ドライブ 5 6 0 番 アパートメント 9 ジェイ

(72)発明者 アメデオ・アルトゥロ・ファイリ

アメリカ合衆国 0 8 5 5 0 ニュージャージー州プリンストン・ジャンクション、ランディング・レイン 1 4 番

(72)発明者 トーマス・ジョゼフ・カッジャーノ

アメリカ合衆国 1 9 0 6 7 ペンシルベニア州モリスビル、ストックハム・アベニュー 3 5 0 番

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA36 DA80 FB03

4B024 AA01 BA80 CA04 CA12 DA06 EA04 GA11

4B064 AG01 AG27 BA16 CA19 CC24 DA01 DA13

4C085 AA13 AA14 CC03 CC26 CC31 CC32 DD23 DD32

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA42 DA50 EA22 EA23 EA28 FA74

专利名称(译)	雷帕霉素的效应蛋白		
公开(公告)号	JP2008253264A	公开(公告)日	2008-10-23
申请号	JP2008098368	申请日	2008-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司 纽约市哥伦比亚大学理事会		
申请(专利权)人(译)	魏斯 哥伦比亚大学在纽约市的受托人		
[标]发明人	キャサリンルーモルナーキンバー ヤンキューチェン 中西香爾 アメデオアルトゥロファイリ トーマスジョゼフカッジャーノ		
发明人	キャサリンルーモルナーキンバー ヤンキューチェン 中西 香爾 アメデオアルトゥロファイリ トーマスジョゼフカッジャーノ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C12N15/02 C12P21/02 C07K16/18 G01N33/15 G01N33/50 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 A61P3/10 C12P21/08 G01N33/53 A61K31/70 A61K38/00 A61K48/00 A61P37 /00 C07H21/04 C07K1/22 C07K14/705 C12N9/12 C12N15/12 C12R1/19 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P9/10 A61P9/14 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/08 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P35/00 A61P35 /02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/705 C12N9/1205 G01N33/68		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12N15/00.C C12P21/02.C C07K16/18 G01N33/15.Z G01N33/50.Z A61K39/395.E A61K39/395.T A61K39/395.U A61P35/00 A61P37/02 A61P3/10 C12P21/08 C12N15/00. A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/DA80 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024 /CA12 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/BA16 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/CC26 4C085 /CC31 4C085/CC32 4C085/DD23 4C085/DD32 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA42 4H045/DA50 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫		
优先权	08/207975 1994-03-08 US 08/312023 1994-09-26 US 08/384524 1995-02-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供哺乳动物来源的新型雷帕霉素-FKBP12结合蛋白，用于免疫调节剂，抗再狭窄剂或抗肿瘤剂的鉴定，设计和合成。一种新的哺乳动物雷帕霉素-FKBP12结合蛋白及其片段，用于鉴定，设计和合成免疫调节剂，抗再狭窄剂或抗肿瘤剂，DNA，cDNA，反义RNA和DNA片段。此外，分离这些蛋白质的方法，以及与此些蛋白质相关的治疗用途。[效果]提供了一种新的哺乳动物雷帕霉素-FKBP12结合蛋白，用于鉴定，设计和合成免疫调节剂，抗再狭窄剂或抗肿瘤剂等。【选择图】无

