

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533815

(P2004-533815A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 202 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-571846 (P2002-571846)	(71) 出願人	500086515
(86) (22) 出願日	平成14年3月14日 (2002. 3. 14)		ミリアド・ジェネティックス・インコーポ
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月16日 (2003. 9. 16)		レイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/008146		アメリカ合衆国84108ユタ州ソルト・
(87) 国際公開番号	W02002/072790		レイク・シティ、ワカラ・ウェイ320番
(87) 国際公開日	平成14年9月19日 (2002. 9. 19)	(74) 代理人	100099623
(31) 優先権主張番号	60/276, 259		弁理士 奥山 尚一
(32) 優先日	平成13年3月14日 (2001. 3. 14)	(74) 代理人	100096769
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 有原 幸一
(31) 優先権主張番号	09/972, 035	(74) 代理人	100107319
(32) 優先日	平成13年10月4日 (2001. 10. 4)		弁理士 松島 鉄男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ウェットスタイン, ダニエル・アルバート
(31) 優先権主張番号	09/971, 549		アメリカ合衆国ユタ州84105, ソルト
(32) 優先日	平成13年10月4日 (2001. 10. 4)		・レイク・シティ, イースト・900・サ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ウス 1208
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 T S G 1 0 1 - G A G 相互作用およびその使用

(57) 【要約】

T s g 1 0 1 および H I V G A G または G A G p 6 を含む単離されたタンパク質複合体を提供する。タンパク質複合体は、タンパク質複合体内の T s g 1 0 1 - H I V G A G または G A G p 6 相互作用の調整に有効な化合物を選択するためのスクリーニングアッセイで有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを含むレトロウイルス G A G ポリペプチドまたは前記レトロウイルス G A G ポリペプチドのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントである第 2 のタンパク質と相互作用する T s g 1 0 1 またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントである第 1 のタンパク質を含む、単離されたタンパク質複合体。

【請求項 2】

前記第 1 のタンパク質が、

(i) T s g 1 0 1 タンパク質と、

(i i) 前記 T s g 1 0 1 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有し、 H I V G A G p 6 と相互作用することができる T s g 1 0 1 タンパク質ホモログと、

(i i i) T s g 1 0 1 U E V ドメインを含む T s g 1 0 1 タンパク質フラグメントと、

(i v) 前記 T s g 1 0 1 タンパク質、前記 T s g 1 0 1 タンパク質のホモログ、または前記 T s g 1 0 1 タンパク質のフラグメントを含む融合タンパク質と
からなる群から選択される、請求項 1 に記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 3】

前記第 2 のタンパク質が、

(1) P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを有するレトロウイルス G A G ポリペプチドと、

(2) 前記レトロウイルス G A G ポリペプチドと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有し、 T s g 1 0 1 と相互作用することができる前記レトロウイルス G A G ポリペプチドのホモログと、

(3) T s g 1 0 1 と相互作用することができる前記レトロウイルス G A G ポリペプチドのフラグメントと、

(4) 前記レトロウイルス G A G ポリペプチド、前記レトロウイルス G A G ポリペプチドホモログ、または前記レトロウイルス G A G ポリペプチドフラグメントを含む融合タンパク質と

からなる群から選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 4】

前記レトロウイルスがレンチウイルスである、請求項 1、請求項 2、または請求項 3 に記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 5】

前記レンチウイルスが霊長類レンチウイルスである、請求項 4 に記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 6】

前記霊長類レンチウイルスが、 H I V - 1、H I V - 2、H I V - 3、およびサル免疫不全ウイルス類からなる群から選択される、請求項 5 に記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 7】

前記レンチウイルスが、ウシレンチウイルス類、ネコレンチウイルス類、およびヒツジ / ヤギレンチウイルス類からなる群から選択される非霊長類レンチウイルスである、請求項 4 に記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 8】

前記第 2 のタンパク質が、 H I V G A G ポリペプチドまたはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントである、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 9】

前記第 2 のタンパク質が (a) H I V G A G ポリペプチドまたは (b) H I V G A G

10

20

30

40

50

ポリペプチドフラグメントを含む融合タンパク質である、請求項 1 ~ 6 および 8 のいずれかに記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 10】

前記第 2 のタンパク質が、H I V G A G p 6 またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントである、請求項 1 ~ 6、8、および 9 のいずれかに記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 11】

前記第 2 のタンパク質が、(a) H I V G A G p 6 ポリペプチドまたは (b) H I V G A G p 6 フラグメントを含む融合タンパク質である、請求項 1 ~ 6、8、9、および 10 のいずれかに記載の単離されたタンパク質複合体。

10

【請求項 12】

前記 H I V G A G p 6 フラグメントが配列番号 31 または配列番号 32 のアミノ酸配列を含む、請求項 10 または請求項 11 に記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 13】

前記 H I V G A G p 6 フラグメントが、天然に存在する H I V G A G p 6 の少なくとも 10 アミノ酸残基の連続スパンを有し、該連続スパンが P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを含む、請求項 10 または 11 に記載の単離されたタンパク質複合体。

【請求項 14】

前記第 1 のタンパク質および前記第 2 のタンパク質を得るステップと、
該第 1 のタンパク質に該第 2 のタンパク質を接触させるステップと
を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のタンパク質複合体の産生方法。

20

【請求項 15】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のタンパク質複合体を含むタンパク質マイクロアレイ。

【請求項 16】

第 2 のポリペプチドに共有結合した第 1 のポリペプチドを有し、前記第 1 のポリペプチドが T s g 101 またはそのホモログもしくはフラグメントであり、前記第 2 のポリペプチドが H I V G A G またはそのホモログもしくはフラグメントである、融合タンパク質。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の融合タンパク質をコードする単離された核酸。

30

【請求項 18】

タンパク質複合体を得るステップと、
前記タンパク質複合体に試験化合物を接触させるステップと、
前記試験化合物の前記タンパク質複合体への結合の有無を決定するステップと
を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のタンパク質複合体のモジュレーターの選択方法。

【請求項 19】

1 つまたは複数の試験化合物の存在下で前記第 1 のタンパク質に前記第 2 のタンパク質を接触させるステップと、
前記第 1 のタンパク質と前記第 2 のタンパク質との間の相互作用を検出するステップと
を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のタンパク質複合体のモジュレーターの選択方法。

40

【請求項 20】

前記タンパク質複合体に試験化合物を接触させるステップと、
前記第 1 のタンパク質と前記第 2 のタンパク質との間の相互作用を検出するステップと
を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のタンパク質複合体のモジュレーターの選択方法。

【請求項 21】

前記第 1 のタンパク質および第 2 のタンパク質の少なくとも 1 つが検出可能なタグを有する融合タンパク質である、請求項 18、19、または 20 に記載の方法。

50

【請求項 2 2】

前記接触ステップを実質的に無細胞の環境下で行う、請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記接触ステップを宿主細胞において行う、請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

宿主細胞中に前記第 1 のタンパク質を有する第 1 の融合タンパク質と、第 2 のタンパク質を有する第 2 の融合タンパク質とを得るステップであって、DNA 結合ドメインが前記第 1 のタンパク質と前記第 2 のタンパク質との一方に融合し、転写活性化ドメインが前記第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質との他方に融合しており、前記宿主細胞中にレポーター遺伝子を得るステップであって、該レポーター遺伝子の転写を、前記第 1 のタンパク質と前記第 2 のタンパク質との間の相互作用によって決定し、試験化合物の存在下、前記宿主細胞内において、前記第 1 の融合タンパク質と前記第 2 の融合タンパク質とを相互作用させるステップと、前記レポーター遺伝子発現の有無を決定するステップとを含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載のタンパク質複合体の第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質との間の相互作用のモジュレーターを選択する方法。

【請求項 2 6】

前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

(a) 請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の前記第 1 のタンパク質をコードする核酸を有する第 1 の発現ベクターと、
(b) 請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の前記第 2 のタンパク質をコードする核酸を有する第 2 の発現ベクターとを含む組成物。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の前記第 1 の発現ベクターと前記第 2 の発現ベクターとを含む宿主細胞。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の前記第 1 のタンパク質をコードする第 1 の核酸に作動可能に連結された第 1 のプロモーターを有する第 1 の発現カセットと、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の前記第 2 のタンパク質をコードする第 2 の核酸に作動可能に連結された第 2 のプロモーターを有する第 2 の発現カセットとを含む宿主細胞。

【請求項 3 0】

前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項 2 8 または 2 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 1】

前記第 1 の核酸および第 2 の核酸の一方が DNA 結合ドメインをコードする核酸に連結され、前記第 1 の核酸および第 2 の核酸の他方が転写活性化ドメインをコードする核酸に連結され、それにより 2 つの融合タンパク質を前記宿主細胞中において産生することができる、請求項 2 8、2 9、または 3 0 の宿主細胞。

【請求項 3 2】

レポーター遺伝子をさらに含み、該レポーター遺伝子の発現を前記第 1 のタンパク質と前記第 2 のタンパク質との間の相互作用によって決定する、請求項 3 1 の宿主細胞。

【請求項 3 3】

タンパク質複合体の三次元構造を定義する原子座標を得るステップと、該原子座標に基づいて、第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質との間の相互作用を妨害す

10

20

30

40

50

ることができる化合物を設計または選択するステップとを含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のタンパク質複合体中の第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質との間の相互作用を妨害することができる化合物を得る方法。

【請求項 34】

試験化合物に、

(i) T s g 1 0 1 タンパク質と、

(ii) T s g 1 0 1 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、H I V G A G p 6 と相互作用することができる T s g 1 0 1 タンパク質ホモログと、

(iii) T s g 1 0 1 U E V ドメインを含む T s g 1 0 1 タンパク質フラグメントと

(iv) 前記 T s g 1 0 1 タンパク質、前記 T s g 1 0 1 タンパク質ホモログ、または T s g 1 0 1 タンパク質フラグメントを含む融合タンパク質と

からなる群から選択されるタンパク質を接触させるステップと、

前記試験化合物が前記タンパク質に結合することができるかどうかを決定するステップとを含む、T s g 1 0 1 と H I V G A G p 6 との間のタンパク質 - タンパク質相互作用を阻害することができる化合物の選択方法。

【請求項 35】

前記タンパク質に結合することができる試験化合物の、T s g 1 0 1 と H I V G A G p 6 との間のタンパク質 - タンパク質相互作用を妨害する能力を試験するステップをさらに含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記タンパク質に結合することができる試験化合物の、H I V に感染した宿主細胞からの H I V ウイルスの出芽を阻害する能力を試験するステップをさらに含む、請求項 34 または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

(i) T s g 1 0 1 タンパク質と、

(ii) T s g 1 0 1 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、H I V G A G p 6 と相互作用することができる T s g 1 0 1 タンパク質ホモログと、

(iii) T s g 1 0 1 U E V ドメインを含む T s g 1 0 1 タンパク質フラグメントと

(iv) 前記 T s g 1 0 1 タンパク質、前記 T s g 1 0 1 タンパク質ホモログ、または T s g 1 0 1 タンパク質フラグメントを含む融合タンパク質と

からなる群から選択されるタンパク質の三次元構造を定義する原子座標を得るステップと

、該原子座標に基づいて、前記タンパク質と相互作用することができる化合物を設計または選択するステップと

を含む、T s g 1 0 1 と H I V G A G p 6 との間のタンパク質 - タンパク質相互作用を阻害することができる化合物の選択方法。

【請求項 38】

前記タンパク質と相互作用することができる化合物の、T s g 1 0 1 と H I V G A G p 6 との間のタンパク質 - タンパク質相互作用を妨害する能力を試験するステップをさらに含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記タンパク質と相互作用することができる試験化合物の、H I V に感染した宿主細胞からの H I V ウイルスの出芽を阻害する能力を試験するステップをさらに含む、請求項 37 または 38 に記載の方法。

【請求項 40】

請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載のタンパク質複合体と選択的に免疫反応性を示す単離された抗体。

【請求項 41】

10

20

30

40

50

細胞中のタンパク質複合体の濃度を減少させるステップを含む、H I V G A Gである第2のタンパク質と相互作用するT s g 1 0 1である第1のタンパク質を有するタンパク質複合体を調整する方法。

【請求項42】

前記減少させるステップが前記第1のタンパク質と前記第2のタンパク質との間の相互作用を妨害するステップを含む、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記減少させるステップが前記第1のタンパク質と前記第2のタンパク質との間の相互作用を妨害することができる化合物を前記細胞に投与するステップを含む、請求項42に記載の方法。

10

【請求項44】

前記化合物がT s g 1 0 1に結合することができる、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記化合物がT s g 1 0 1タンパク質のU E Vドメインに結合することができる、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

前記化合物がT s g 1 0 1に免疫反応性を示す抗体である、請求項43に記載の方法。

【請求項47】

前記化合物がT s g 1 0 1に免疫反応性を示す抗体をコードする核酸である、請求項43に記載の方法。

20

【請求項48】

前記抗体が一本鎖抗体である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記化合物が前記タンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体である、請求項43に記載の方法。

【請求項50】

前記化合物が、前記タンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体をコードする核酸である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記抗体が一本鎖抗体である、請求項50に記載の方法。

30

【請求項52】

前記減少させるステップが、前記細胞中のT g s 1 0 1濃度を減少させるステップを含む、請求項41に記載の方法。

【請求項53】

前記細胞中のT g s 1 0 1濃度を減少させるステップが、T s g 1 0 1核酸と特異的にハイブリッド形成するアンチセンス化合物を該細胞に投与するステップを含む、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

前記細胞中のT g s 1 0 1濃度を減少させるステップが、T s g 1 0 1核酸と特異的にハイブリッド形成するリボザイム化合物を該細胞に投与するステップを含む、請求項52に記載の方法。

40

【請求項55】

宿主細胞中のT s g 1 0 1とH I V G A Gとの間の相互作用を妨害するステップを含む、宿主細胞からのH I Vウイルスの出芽を阻害する方法。

【請求項56】

前記妨害するステップが、T s g 1 0 1とH I V G A Gとの間の相互作用を妨害することができる化合物を宿主細胞に投与するステップを含む、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記妨害するステップが、T s g 1 0 1タンパク質に結合することができる化合物を前記宿主細胞に投与するステップを含む、請求項55に記載の方法。

50

【請求項 58】

前記化合物が T s g 1 0 1 に免疫反応性を示す抗体である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記化合物が T s g 1 0 1 に免疫反応性を示す抗体であり、該抗体が T s g 1 0 1 の U E V ドメインに結合することができる、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】

H I V G A G p 6 と相互作用する T s g 1 0 1 を含むタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を前記宿主細胞に投与するステップを含む、宿主細胞からの H I V ウイルスの出芽を阻害する方法。

【請求項 61】

T s g 1 0 1 免疫反応性を示す抗体をコードする核酸を宿主細胞に投与するステップを含む、宿主細胞からの H I V ウイルスの出芽を阻害する方法。

【請求項 62】

前記抗体が一本鎖抗体である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

H I V G A G p 6 と相互作用する T s g 1 0 1 を含むタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体をコードする核酸を前記宿主細胞に投与するステップを含む、宿主細胞からの H I V ウイルスの出芽を阻害する方法。

【請求項 64】

前記抗体が一本鎖抗体である、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

H I V 出芽の阻害、H I V 感染の治療、または A I D S の予防における、T s g 1 0 1 核酸と特異的にハイブリッド形成するアンチセンス化合物の使用。

【請求項 66】

H I V 出芽の阻害、H I V 感染の治療、または A I D S の予防における、T s g 1 0 1 核酸と特異的にハイブリッド形成するリボザイム化合物の使用。

【請求項 67】

H I V 出芽の阻害、H I V 感染の治療、または A I D S の予防における、T s g 1 0 1 タンパク質に結合することができる化合物の使用。

【請求項 68】

H I V 出芽の阻害、H I V 感染の治療、または A I D S の予防における、T s g 1 0 1 に免疫反応性を示す抗体の使用。

【請求項 69】

H I V 出芽の阻害、H I V 感染の治療、または A I D S の予防における、T s g 1 0 1 の U E V ドメインに結合することができる抗体の使用。

【請求項 70】

H I V 出芽の阻害、H I V 感染の治療、または A I D S の予防における、T s g 1 0 1 と H I V G A G との間の相互作用を妨害することができる化合物の使用。

【請求項 71】

H I V 出芽の阻害、H I V 感染の治療、または A I D S の予防における、H I V G A G と相互作用する T s g 1 0 1 を含むタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体の使用。

【請求項 72】

H I V 出芽の阻害、H I V 感染の治療、または A I D S の予防における、T s g 1 0 1 に免疫反応性を示す抗体をコードする核酸の使用。

【請求項 73】

H I V 出芽の阻害、H I V 感染の治療、または A I D S の予防における、H I V G A G と相互作用する T s g 1 0 1 を含むタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体をコードする核酸の使用。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、タンパク質 - タンパク質相互作用と、薬物スクリーニングおよび疾患治療におけるその使用とに関する。

【背景技術】

【0002】

1つのタンパク質分子の作用に注目する伝統的なタンパク質機能の所見と対照的に、タンパク質機能についての現代の幅広い所見では、タンパク質を相互作用ネットワークの構成要素と考える。Eisenbergら、Nature, 405, 823~826(2000)を参照のこと。すなわち、タンパク質機能の完全な理解には、タンパク質自体の特徴だけでなく、同一の相互作用ネットワーク中での他のタンパク質との相互作用または関連についての知識が必要である。本質的に、タンパク質 - タンパク質相互作用はほとんど全ての生物学的プロセスの基本を形成し、各生物学的プロセスがタンパク質相互作用ネットワークの構成要素である。例えば、細胞骨格、核孔、中心体、および動原体などの細胞構造は、多数のタンパク質の間の複雑な相互作用によって形成される。多数の酵素反応は、酵素、タンパク質基質、およびタンパク質モジュレーターとの相互作用によって形成された巨大タンパク質複合体に関連する。さらに、タンパク質 - タンパク質相互作用はまた、シグナル伝達ならびにDNA複製、転写、および翻訳などの他の基本的細胞機能の機構の一部である。例えば、複雑な転写阻害プロセスには、一般に、多数の転写因子、RNAポリメラーゼ、および他のタンパク質との間のタンパク質 - タンパク質相互作用が必要である。例えば、Tjian and Maniatis, Cell, 77, 5~8, 1994を参照のこと。

10

20

【0003】

ほとんどのタンパク質は他のタンパク質との相互作用を介して機能するので、試験タンパク質が公知のタンパク質と相互作用する場合、試験タンパク質は、例えば、公知のタンパク質と同一の構造または同一の細胞プロセスにおいて公知のタンパク質の機能に関連することを合理的に予想することができる。したがって、相互作用パターンにより、相互作用タンパク質の機能を迅速且つ確実に理解することができる。相互作用タンパク質の同定により、疾患経路および細胞プロセスがより良好に理解され、それにより疾患を克服し、疾患経路における重要なレギュレーターおよび潜在的な薬物標識を同定することができる。

30

【0004】

プロテオミクス分野ではタンパク質 - タンパク質相互作用に非常に関心が寄せられている。多数の生化学的アプローチを使用して、タンパク質相互作用が同定されている。これらのアプローチは、一般に、束縛状態のタンパク質を単離するために相互作用タンパク質間の親和性を使用する。このような方法の例には、任意選択的に結合を安定化させるための架橋と組み合わせた免疫共沈および同時精製が含まれる。パートナーと相互作用する単離されたタンパク質の同一性を、例えば、質量分析法によって特徴付けることができる。例えば、Routら、J. Cell. Biol., 148, 635~651, 2000; Houryら、Nature, 402, 147~154, 1999; Winterら、Curr. Biol., 7, 517~529, 1997を参照のこと。大規模スクリーニングで有用な一般的アプローチは、バクテリオファージのキャプシドおよび外殻タンパク質に融合した目的のペプチドまたはタンパク質を発現するために組換えDNA技術によって繊維状バクテリオファージ粒子を作製するファージディスプレイ法である。目的のペプチドまたはタンパク質の全ライブラリーを発現させ、ベイトタンパク質をライブラリーのスクリーニングに使用して、該ベイトタンパク質に結合することができるペプチドまたはタンパク質を同定することができる。例えば、米国特許第5,223,409号、米国特許第5,403,484号、米国特許第5,571,698号、および米国特許第5,837,500号を参照のこと。とりわけ、ファージディスプレイ法のみによりインビトロ環境で相互作用することができるタンパク質が同定され、免疫共沈および同時精製法はハイスループットスクリーニングを行うことができない。

40

50

【0005】

酵母2ハイブリッドシステムは、上記アプローチの一定の欠点を克服する遺伝的方法である。酵母2ハイブリッドシステムは、インビボでの特定のタンパク質の発見に強力な方法であることが証明された。一般に、Bartel and Fields編、「酵母2ハイブリッドシステム」、Oxford University Press、New York、NY、1997を参照のこと。酵母2ハイブリッド技術は、異なる融合タンパク質中に含まれるDNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインは、互いに接近している場合依然として遺伝子を活性化することができるという事実に基づいている。酵母2ハイブリッドシステムでは、酵母細胞中で2つの融合タンパク質を発現させる。一方は、試験タンパク質に融合した転写アクチベーターのDNA結合ドメインを有する。それに対して、他方は、別の試験タンパク質に融合した転写アクチベーターの転写活性化ドメインを含む。2つの試験タンパク質がインビボで相互作用する場合、転写アクチベーターの2つのドメインは互いに転写アクチベーターを構築し、転写アクチベーターによって制御されるレポーター遺伝子を活性化する。例えば、米国特許第5,283,173号を参照のこと。

10

【0006】

酵母2ハイブリッドシステムは、その簡便さ、有効性、および信頼性のために、多数の研究領域で非常に支持されてきた。さらに、酵母細胞は真核細胞である。酵母2ハイブリッドシステムで検出される哺乳動物タンパク質間の相互作用は、典型的には、生理学的条件下で哺乳動物細胞において生ずる正真正銘の相互作用である。事実上、酵母2ハイブリッドシステムを使用して多数の哺乳動物タンパク質-タンパク質相互作用が同定されている。同定されたタンパク質は、多数のシグナル伝達経路および他の生物学的プロセスの理解に大いに役立っている。例えば、複雑な細胞周期調節で重要な多数の新規の哺乳動物細胞周期調節の同定に酵母2ハイブリッドシステムが首尾よく使用されている。細胞周期調節に重要な公知のタンパク質をベイトとして使用して、そのベイトと相互作用する能力によって細胞周期制御に関連する他のタンパク質を同定した。一般に、Hannonら、「酵素2ハイブリッドシステム」、Bartel and Fields編、183~196、Oxford University Press、New York、NY、1997を参照のこと。酵母2ハイブリッドシステムによって同定された哺乳動物細胞周期レギュレーターの例には、CDK4/CDK6インヒビター（例えば、p16、p15、p18、およびp19）、Rbファミリーメンバー（例えば、p130）、Rbホスファターゼ（例えば、PP1-2）、Rb結合転写因子（例えば、E2F-4およびE2F-5）、一般的なCDKインヒビター（例えば、p21およびp27）、CAKサイクリン（例えば、サイクリンH）、およびCDK Thr161ホスファターゼ（例えば、KAPおよびCD11）が含まれる。前出、192頁を参照のこと。「2ハイブリッドアプローチは細胞サイクルパズルの新規断片について、我々の継続中の研究における有用なツールであることが約束されている」、前出、193頁を参照のこと。

20

30

【0007】

酵母2ハイブリッドシステムを使用して、疾患経路に関連する特定の公知のタンパク質と相互作用するタンパク質を同定し、それにより疾患機構に関する貴重な理解を得ることができる。同定されたタンパク質および関与するタンパク質-タンパク質相互作用は、疾患治療用の新規薬物選択のための潜在的な薬物標的である。

40

【0008】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染は、後天性免疫不全症候群(一般に、AIDSとして公知)を引き起こす。HIVは、ヘルパーT細胞としても公知のCD4糖タンパク質を発現するT細胞(すなわち、CD4⁺T細胞)に主に感染するレトロウイルスである。HIVウイルスは、ヘルパーT細胞中で増殖し、宿主ヘルパーT細胞を急速に破壊して細胞性免疫を低下させ、日和見感染症、悪性疾患、および種々の他の病態に感受性を示す感染患者が発生する。最終的に、HIV感染により、ヘルパーT細胞が枯渇し、患者の免疫防御が崩壊する。当然のことではあるが、HIV感染個体およびAIDS患者は、AIDS関連症候群(ARC)、進行性全身性リンパ節腫脹症(PGL)、痴呆、熱帯性不全対麻

50

痺、カポジ肉腫、血小板減少性紫斑病、ヘルペス感染、サイトメガロウイルス感染、エプスタイン-バーウイルス関連リンパ腫などのAIDS関連病態を発症する。任意の場合では、感染個体のHIVウイルスは感染性であり、輸血または性的接触を介して他のヒトに伝播し得る。

【0009】

過去15年間またはHIV感染およびAIDS治療のための方法および薬学的化合物の開発に多大な努力が払われてきた。治療アプローチのほとんどが限られた数の薬物標的(すなわち、HIV逆転写酵素、HIVプロテアーゼ、およびHIVインテグラーゼ)に注目している。多数の逆転写酵素インヒビターおよびプロテアーゼインヒビターが開発または市場に出されている。ヌクレオシド逆転写酵素インヒビターの例には、Zidovudine、Stavudine、Lamivudine、およびddIが含まれる。非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビターの例には、Efavirenz、Delavirdine、およびAbacavirが含まれる。さらに、Ritonavir、Nelfinavir、Indinavir、およびSaquinavirを含む多数のHIVプロテアーゼインヒビターが市販されている。

10

【0010】

しかし、HIVは、典型的には、増殖するにつれて活発に変異する。さらに、高い変異率によって、部分的に、HIVにおいて広範な遺伝子変異が存在する。したがって、感染患者でHIV逆転写酵素およびプロテアーゼの変異が頻繁に起こり、ウイルスは患者に投与したインヒビターに耐性を示す。異なる抗HIVインヒビターの組み合わせを患者に投与するHAART(高活性抗レトロウイルス療法)と呼ばれる併用療法が開発されている。しかし、併用療法に対するウイルス耐性も頻繁に高められる。

20

【0011】

さらに、当分野で公知の多数の抗HIV化合物は、他の重大な欠点を有する。例えば、AZTおよびddIなどの逆転写酵素インヒビターは非常に有毒であり、このような化合物で治療した患者は重篤な副作用を起こす。したがって、以前に開発された抗HIV化合物ではHIV感染およびAIDSの制御は限られているので、現在利用可能な薬物の欠点を克服する別の治療アプローチが必要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0012】

ヒト腫瘍感受性遺伝子101(「Tsg101」)はHIV GAG p6と相互作用することが発見された。特に、Tsg101とHIV GAGとの相互作用は、宿主細胞からのHIV出芽に不可欠である。従って、Tsg101とHIV GAGまたはGAG p6によって形成されたタンパク質複合体ならびにTsg101のみをスクリーニングアッセイで使用して、Tsg101ならびにTsg101とHIV GAGまたはGAG p6とを含むタンパク質複合体の機能および活性を調整することができる化合物を選択することができる。同定された化合物は、レンチウイルス増殖(特に、HIV増殖)の阻害ならびにHIV感染およびAIDS治療に有用であり得る。

40

【0013】

したがって、本発明の第1の態様によれば、HIV GAGポリペプチドまたはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントである第2のタンパク質と相互作用するTsg101またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントである第1のタンパク質を有する単離されたタンパク質複合体が得られる。好ましい実施形態では、第1のタンパク質は、(a) Tsg101、または(b) Tsg101ホモログ、または(c) Tsg101フラグメントを含む融合タンパク質である。別の好ましい実施形態では、第2のタンパク質は、(a) HIV GAGポリペプチド、または(b) HIV GAGホモログ、または(c) HIV GAGフラグメントを含む融合タンパク質であり得る。

【0014】

本発明の別の態様では、HIV GAG p6ポリペプチドまたはそのホモログ、誘導体、

50

もしくはフラグメントである第2のタンパク質と相互作用するT s g 1 0 1またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントである第1のタンパク質を有する単離されたタンパク質複合体が得られる。好ましい実施形態では、第1のタンパク質は、(a) T s g 1 0 1、または(b) T s g 1 0 1ホモログ、または(c) T s g 1 0 1フラグメントを含む融合タンパク質である。別の好ましい実施形態では、第2のタンパク質は、(a) H I V G A G p 6ポリペプチド、または(b) H I V G A G p 6ホモログ、または(c) H I V G A G p 6フラグメントを含む融合タンパク質であり得る。

【0015】

本発明はまた、(a) (i) T s g 1 0 1タンパク質、(i i) 前記T s g 1 0 1と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、H I V G A G p 6と相互作用することができるT s g 1 0 1タンパク質ホモログ、(i i i) T s g 1 0 1 U E Vドメインを含むT s g 1 0 1タンパク質フラグメント、および(i v) 前記T s g 1 0 1タンパク質、前記T s g 1 0 1タンパク質のホモログ、または前記T s g 1 0 1タンパク質のフラグメントを含む融合タンパク質からなる群から選択される第1のタンパク質、および(b) (1) H I V G A G ポリペプチド、(2) 前記H I V G A G ポリペプチドと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、T s g 1 0 1と相互作用することができる前記H I V G A G ポリペプチドのホモログ、(3) H I V G A G p 6、(4) H I V G A G p 6ポリペプチドと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、T s g 1 0 1と相互作用することができるH I V G A G p 6のホモログ、(5) T s g 1 0 1と相互作用することができるH I V G A G p 6のフラグメント、および(6) 前記H I V G A G ポリペプチド、前記H I V G A G ポリペプチドのホモログ、前記H I V G A G p 6タンパク質、H I V G A G p 6のホモログ、またはH I V G A G p 6のフラグメントを含む融合タンパク質からなる群から選択される第2のタンパク質を含む単離されたタンパク質複合体を提供する。特定の実施形態では、H I V G A G p 6のフラグメントは、天然に存在するH I V G A G p 6のP (T / S) A P後期ドメインモチーフを含む少なくとも10アミノ酸残基の連続スパンを有する。好ましくは、H I V G A G p 6のフラグメントは、配列番号25~32からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0016】

本発明は、さらに、P (T / S) A P後期ドメインモチーフを含むレトロウイルスG A G ポリペプチドまたは前記レトロウイルスG A G ポリペプチドのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントである第2のタンパク質と相互作用するT s g 1 0 1またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントである第1のタンパク質を含む単離されたタンパク質複合体を提供する。好ましくは、レトロウイルスはレンチウイルスである。より好ましくは、レトロウイルスは、H I V - 1、H I V - 2、H I V - 3、およびサル免疫不全ウイルスからなる群から選択されるウイルスなどの霊長類レンチウイルスである。レンチウイルスはまた、ウシレンチウイルス、ネコレンチウイルス、およびヒツジ/ヤギレンチウイルスからなる群から選択される非霊長類レンチウイルスであり得る。したがって、単離されたタンパク質複合体には、

(a) (i) T s g 1 0 1タンパク質、
 (i i) 前記T s g 1 0 1と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、H I V G A G p 6と相互作用することができるT s g 1 0 1タンパク質ホモログ、
 (i i i) T s g 1 0 1 U E Vドメインを含むT s g 1 0 1タンパク質フラグメント、
 および
 (i v) 前記T s g 1 0 1タンパク質、前記T s g 1 0 1タンパク質のホモログ、または前記T s g 1 0 1タンパク質のフラグメントを含む融合タンパク質からなる群から選択される第1のタンパク質；および
 (b) (1) P (T / S) A P後期ドメインモチーフを有するレトロウイルスG A G ポリペプチド、
 (2) 前記レトロウイルスG A G ポリペプチドと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、T s g 1 0 1と相互作用することができる前記レトロウイルスG A G ポリペプチド

のホモログ、

(3) T s g 1 0 1 と相互作用することができる前記レトロウイルス G A G ポリペプチドのフラグメント、および

(4) 前記レトロウイルス G A G ポリペプチド、前記レトロウイルス G A G ポリペプチドホモログ、または前記レトロウイルス G A G ポリペプチドフラグメントを含む融合タンパク質からなる群から選択される第2のタンパク質を含み得る。

別の特定の実施形態では、単離されたタンパク質複合体には、

(a) (i) T s g 1 0 1 タンパク質、

(ii) 前記 T s g 1 0 1 と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、H I V G A G p 6 と相互作用することができる T s g 1 0 1 タンパク質ホモログ、

(iii) T s g 1 0 1 U E V ドメインを含む T s g 1 0 1 タンパク質フラグメント、および

(iv) 前記 T s g 1 0 1 タンパク質、前記 T s g 1 0 1 タンパク質のホモログ、または前記 T s g 1 0 1 タンパク質のフラグメントを含む融合タンパク質からなる群から選択される第1のタンパク質；および

(b) (1) 霊長類レンチウイルス G A G ポリペプチド、

(2) 霊長類レンチウイルス G A G ポリペプチドと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、T s g 1 0 1 と相互作用することができる霊長類レンチウイルス G A G ポリペプチドのホモログ、

(3) 霊長類レンチウイルス G A G p 6 タンパク質、

(4) H I V G A G p 6 ポリペプチドと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、T s g 1 0 1 と相互作用することができる霊長類レンチウイルス G A G p 6 のホモログ、

(5) T s g 1 0 1 と相互作用することができる霊長類レンチウイルス G A G p 6 のフラグメント、

(6) 霊長類レンチウイルス G A G ポリペプチド、霊長類レンチウイルス G A G ポリペプチドのホモログ、霊長類レンチウイルス G A G p 6 タンパク質、霊長類レンチウイルス G A G p 6 のホモログ、または霊長類レンチウイルス G A G p 6 のフラグメントを含む融合タンパク質からなる群から選択される第2のタンパク質を含み得る。

【0017】

さらに別の態様では、本発明は、本発明のタンパク質複合体の産生方法を提供する。本方法は、本発明のタンパク質複合体中に第1のタンパク質および第2のタンパク質を得るステップと、前記第1のタンパク質を前記第2のタンパク質に接触させるステップとを含む。さらに、タンパク質複合体を、組織および細胞からの単離または精製によって調製するか、そのタンパク質メンバーの組換え発現によって産生することができる。

【0018】

本発明は、さらに、第2のポリペプチドの共有結合した第1のポリペプチドを有し、前記第1のポリペプチドが T s g 1 0 1 またはそのホモログもしくはフラグメントであり、前記第2のポリペプチドが H I V G A G またはそのホモログもしくはフラグメントである融合タンパク質に関する。融合タンパク質をコードする単離された核酸もまた提供する。

【0019】

本発明のさらに別の態様では、本発明のタンパク質複合体に免疫反応性を示す抗体が得られる。1つの実施形態では、抗体は本発明のタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す。別の実施形態では、2つの異なる抗原結合部位を有し、それぞれ本発明のタンパク質複合体中の異なる相互作用タンパク質メンバーに特異的な二機能性抗体が得られる。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント(s c F v)、F a b ' フラグメント、およびF (a b) ' フラグメントのような抗体フラグメントを含む種々の形態を取ることができる。好ましくは、抗体は、部分的または完全にヒト化された抗体である。本発明の抗体を、当分野で一般的に公知の手順を使用して容易に調製することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリーおよびリボソームディスプレイライブラリーなどの組換えライブラリーを使

10

20

30

40

50

用して、所望の特異性を有する抗体をスクリーニングすることができる。さらに、部位特異的変異誘発およびPCR多様化などの種々の変異誘発技術を、スクリーニングアッセイと組み合わせて使用することができる。

【0020】

本発明は、さらに、1つまたは複数の本発明のタンパク質複合体および/または1つまたは複数の本発明の抗体を含むタンパク質マイクロチップに関する。このようなタンパク質マイクロチップは、タンパク質複合体を含む大規模ハイスループットスクリーニングアッセイで有用であり得る。

【0021】

本発明のさらに別の態様では、Tsg101またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントと、HIV GAGまたはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントとの間に形成されたタンパク質複合体のモジュレーターを選択するためのスクリーニング法が得られる。Tsg101のモジュレーターを選択するためのスクリーニング法もまた得られる。本発明のスクリーニング法で同定された化合物は、Tsg101とHIV GAGとの間の相互作用の研究ならびにHIVウイルス増殖機構の理解で使用することができる。選択された化合物はまた、ウイルス感染、特異HIV感染およびAIDSなどの疾患または障害の予防または改善に有用であり得る。

10

【0022】

したがって、本発明のタンパク質複合体またはTsg101に結合することができる化合物を選択するためのインビトロ結合アッセイで、試験化合物をスクリーニングすることができる。さらに、インビトロ解離アッセイを使用して、本発明によって同定されたタンパク質複合体を解離することができる化合物を選択することもできる。インビトロスクリーニングアッセイを使用して、本発明のタンパク質複合体の形成を誘発、または開始させるか本発明のタンパク質複合体を安定化する化合物を選択することもできる。好ましい実施形態では、酵母2ハイブリッドアッセイおよびその種々の派生アッセイ（好ましくは、逆2ハイブリッドアッセイ）などのインビボアッセイを、Tsg101またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントとHIV GAG p6またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントとの間のタンパク質-タンパク質相互作用を妨害または破壊する化合物の選択に使用する。さらに、酵母2ハイブリッドアッセイなどの系はまた、Tsg101またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントとHIV GAG p6またはその

20

30

【0023】

したがって、1つの実施形態では、スクリーニング法には、1つまたは複数の試験化合物の存在下で本発明のタンパク質複合体の第1のタンパク質および第2のタンパク質を接触させるステップと、前記第1のタンパク質と前記第2のタンパク質との間の相互作用を検出するステップとを含む。好ましくは、第1のタンパク質および第2のタンパク質は、検出可能なタグを有する融合タンパク質である。実質的に無細胞の環境下または宿主細胞、好ましくは酵母細胞中で本発明の方法を行うことができる。

【0024】

好ましい実施形態では、スクリーニング法は、(a) Tsg101またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントを有する第1の融合タンパク質およびレトロウイルスGAG（例えば、HIV GAG）またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントを有する第2の融合タンパク質を宿主細胞中に得るステップであって、DNA結合ドメインが一方の前記第1のタンパク質および第2のタンパク質と融合する一方で、転写活性化ドメインが他方の前記第1のタンパク質および第2のタンパク質に融合することと、(b) 前記宿主細胞中にレポーター遺伝子を得るステップであって、レポーター遺伝子の転写を第1のタンパク質と第2のタンパク質との間の相互作用によって決定するステップと、(c) 前記第1および第2の融合タンパク質を試験化合物の存在下で前記宿主内で相互作用させるステップと、(d) 前記レポーター遺伝子発現の有無を決定するステップとを含む。

40

50

【0025】

本発明の別の態様によれば、

- (a) (i) T s g 1 0 1 タンパク質、
- (i i) 前記 T s g 1 0 1 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有し、H I V G A G p 6 と相互作用することができる T s g 1 0 1 タンパク質ホモログ、
- (i i i) T s g 1 0 1 U E V ドメインを含む T s g 1 0 1 タンパク質フラグメント、
および
- (i v) 前記 T s g 1 0 1 タンパク質、前記 T s g 1 0 1 タンパク質のホモログ、または前記 T s g 1 0 1 タンパク質のフラグメントを含む融合タンパク質からなる群から選択される第 1 のタンパク質をコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターを有する第 1 の発現カセットと、および
- (b) (1) P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを有するレトロウイルス G A G ポリペプチド、
- (2) 前記レトロウイルス G A G ポリペプチドと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有し、T s g 1 0 1 と相互作用することができる前記レトロウイルス G A G ポリペプチドのホモログ、
- (3) T s g 1 0 1 と相互作用することができる前記レトロウイルス G A G ポリペプチドのフラグメント、および
- (4) 前記レトロウイルス G A G ポリペプチド、前記レトロウイルス G A G ポリペプチドホモログ、または前記レトロウイルス G A G ポリペプチドフラグメントを含む融合タンパク質からなる群から選択される第 2 のタンパク質をコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターを有する第 2 の発現カセットとを含む宿主が得られる。

好ましい実施形態では、第 2 のタンパク質は、

- (1) H I V G A G ポリペプチド、
- (2) H I V G A G ポリペプチドと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有し、T s g 1 0 1 と相互作用することができる H I V G A G ポリペプチドのホモログ、
- (3) H I V G A G p 6 タンパク質、
- (4) H I V G A G p 6 ポリペプチドと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有し、T s g 1 0 1 と相互作用することができる H I V G A G p 6 のホモログ、
- (5) T s g 1 0 1 と相互作用することができる H I V G A G p 6 のフラグメント、
- (6) 前記 H I V G A G ポリペプチド、前記 H I V G A G ポリペプチドのホモログ、前記 H I V G A G p 6 タンパク質、前記 H I V G A G p 6 のホモログ、または前記 H I V G A G p 6 のフラグメントを含む融合タンパク質からなる群から選択される。

【0026】

本発明の宿主細胞の別の好ましい実施形態では、前記第 1 の核酸および第 2 の核酸の一方を、DNA 結合ドメインをコードする核酸に連結し、第 1 の核酸および第 2 の核酸の他方を、転写活性化ドメインをコードする核酸に連結させ、それにより前記宿主細胞中に 2 つの融合タンパク質を産生することができる。好ましくは、宿主細胞はレポーター遺伝子をさらに含み、レポーター遺伝子の発現を第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質との間の相互作用によって決定する。

【0027】

本発明は、さらに、タンパク質複合体の三次元構造を定義する原子座標を得るステップと、該原子座標に基づいて前記第 1 のタンパク質と前記第 2 のタンパク質との間の相互作用を妨害することができる化合物を設計または選択するステップとを含む、本発明のタンパク質複合体中における第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質との間の相互作用を妨害することができる化合物を得る方法に関する。

【0028】

さらに、本発明はまた、試験化合物に、

- (i) T s g 1 0 1 タンパク質、
- (i i) 前記 T s g 1 0 1 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有し、H I V G A

G p 6 と相互作用することができる T s g 1 0 1 タンパク質ホモログ、
 (i i i) T s g 1 0 1 U E V ドメインを含む T s g 1 0 1 タンパク質フラグメント、
 (i v) 前記 T s g 1 0 1 タンパク質であって、前記 T s g 1 0 1 タンパク質のホモログ
 、または前記 T s g 1 0 1 タンパク質のフラグメントを含む融合タンパク質と
 からなる群から選択されるタンパク質を接触させるステップと、
 前記試験化合物が前記タンパク質に結合することができるかどうかを決定するステップと
 を含む、T s g 1 0 1 と H I V G A G p 6 との間のタンパク質 - タンパク質相互作用を
 阻害することができる化合物を選択する方法を提供する。好ましい実施形態では、本方法
 は、さらに、タンパク質に結合することができる試験化合物の T s g 1 0 1 と H I V G
 A G p 6 との間のタンパク質 - タンパク質相互作用を妨害する能力を試験するステップと
 、任意選択的に、タンパク質に結合することができる選択された試験化合物の H I V に感
 染した宿主細胞からの H I V ウイルスの出芽を阻害する能力を試験するステップをさらに
 含む。

10

【0029】

本発明は、さらに、T s g 1 0 1 とレトロウイルス G A G 含有 P (T / S) A P モチーフ
 との間のタンパク質 - タンパク質相互作用を阻害することができる化合物を選択する方法
 を提供する。本方法は、(a) (i) T s g 1 0 1 タンパク質、(i i) 前記 T s g 1 0
 1 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有し、H I V G A G p 6 と相互作用するこ
 とができる T s g 1 0 1 タンパク質ホモログ、(i i i) T s g 1 0 1 U E V ドメイン
 を含む T s g 1 0 1 タンパク質フラグメント、および (i v) 前記 T s g 1 0 1 タンパク
 質、前記 T s g 1 0 1 タンパク質のホモログ、または前記 T s g 1 0 1 タンパク質のフラ
 グメントを含む融合タンパク質からなる群から選択されるタンパク質の三次元構造を定義
 する原子座標を得るステップと、(b) 該原子座標に基づいて前記タンパク質に相互作用
 することができる化合物を設計または選択するステップとを含む。好ましい実施形態では
 、本方法は、さらに、前記タンパク質と相互作用することができる選択された化合物の T
 s g 1 0 1 とレトロウイルス G A G との間のタンパク質 - タンパク質相互作用を妨害する
 能力を試験するステップと、任意選択的に、前記タンパク質と相互作用することができる
 選択された化合物のウイルス出芽、特に H I V に感染した宿主細胞からの H I V ウイルス
 の出芽を阻害する能力を試験するステップとを含む。

20

【0030】

本発明はまた、哺乳動物細胞中で T s g 1 0 1 および P (T / S) A P 後期ドメインモチ
 ーフを含むレトロウイルス G A G を含むタンパク質複合体を調整する方法を提供する。特
 別な実施形態では、レトロウイルス G A G は H I V G A G である。本方法を使用して、
 ウイルス出芽、特に、感染宿主細胞からの H I V ウイルスの出芽を阻害することができる
 。ウイルス出芽の阻害により、感染宿主細胞からのウイルスの放出が防止され、それによ
 りさらなるウイルス増殖が抑制される。したがって、本発明はまた、ウイルス感染、特に
 H I V 感染を治療する方法および患者の A I D S を予防する方法を含む。

30

【0031】

1 つの実施形態では、細胞中のレトロウイルス G A G と相互作用する T s g 1 0 1 を有す
 るタンパク質複合体の濃度を減少させる。種々の方法を使用して、タンパク質複合体濃度
 を減少させることができる。タンパク質複合体濃度を、T s g 1 0 1 とレトロウイルス G
 A G (例えば、H I V G A G) との間の相互作用の妨害によって減少させることができ
 る。例えば、T s g 1 0 1 と H I V G A G との間の相互作用を妨害することができる化
 合物を、患者の細胞にインビトロまたはインビボで投与することができる。このような化
 合物は、T s g 1 0 1 タンパク質、特に、T s g 1 0 1 タンパク質の U E V ドメイン、ま
 たは H I V G A G p 6 に結合することができる有機小分子であり得る。これらはまた、
 T s g 1 0 1 タンパク質または H I V G A G p 6 に免疫反応性を示す抗体であり得る。
 好ましくは、T s g 1 0 1 タンパク質の U E V ドメインに結合する抗体を使用する。また
 、化合物は、H I V G A G p 6 タンパク質に由来する小ペプチドもしくは T s g 1 0 1
 に結合することができるその模倣物または T s g 1 0 1 タンパク質由来の小ペプチドもし

40

50

くはH I V G A G p 6 に結合することができるその模倣物であり得る。

【0032】

別の実施形態では、本方法は、T s g 1 0 1 タンパク質および/またはH I V G A G タンパク質の発現を阻害するステップを含む。阻害は、転写、翻訳、または翻訳後レベルであり得る。例えば、アンチセンス化合物およびリボザイム化合物を、インビトロでヒト細胞に投与するかヒトの身体に投与することができる。

【0033】

さらに別の実施形態では、レトロウイルスG A G (例えば、H I V G A G)と相互作用するT s g 1 0 1 を有するタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を、インビトロで細胞に投与するか、ヒトの身体に投与して、タンパク質複合体の活性を阻害し、及び/または細胞もしくは患者中のタンパク質複合体濃度を減少させる。

10

【0034】

本発明は、当分野でこれまでに公知の治療アプローチとは異なるH I V 感染およびA I D S の治療方法を提供する。本方法は、宿主細胞の細胞タンパク質およびウイルスタンパク質とのその相互作用を標的する。相互作用には、感染宿主細胞からのH I V の出芽が必要である。したがって、H I V が本発明の治療に対してウイルス耐性を高める可能性は低い。

【0035】

本発明の上記の利点、他の利点および特徴、ならびにこれらの利点が達成される形態は、添付の実施例と併せて以下の本発明の詳細の説明を考慮することにより、さらに容易に明らかとなるが、これらは好ましい、例示的な実施形態を示すものである。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

1. 定義

用語「ポリペプチド」、「タンパク質」、および「ペプチド」は、本明細書中で、ペプチド結合または修飾ペプチド結合によってアミノ酸残基が結合したアミノ酸鎖をいうために、同じ意味で使用される。アミノ酸鎖は、2個を超えるアミノ酸の任意の長さであり得る。特記しない限り、用語「ポリペプチド」、「タンパク質」、および「ペプチド」はまた、これらの種々の修飾形態を含む。このような修飾形態は、天然に存在する修飾形態または化学修飾形態であり得る。修飾形態の例には、グリコシル化形態、リン酸化形態、ミリスチル化形態、パルミチル化形態、リボシル化形態、アセチル化形態、ユビキチン化形態などが含まれるが、これらに限定されない。修飾には、分子内の架橋および脂質、フラビン、ビオチン、ポリエチレングリコールまたは誘導体などの様々な分子に対する共有結合も含まれる。また修飾には、環状化、分岐、および架橋も含まれる。さらに、遺伝子によってコードされる通常の20個のアミノ酸以外のアミノ酸もまたポリペプチドに含めることができる。

30

【0037】

本明細書中で使用される、用語「タンパク質フラグメント」は、タンパク質の一部を示すポリペプチドを意味する。タンパク質フラグメントが別のタンパク質またはタンパク質フラグメントとの相互作用を示す場合、2つの単位(entities)は、単位内に含まれる相互作用ドメインによって相互作用するという。

40

【0038】

本明細書中で使用される、用語「相互作用する」は、2つのタンパク質のドメイン、フラグメント、または完全なタンパク質が、2つの「相互作用」タンパク質ドメインまたはタンパク質が互いに物理的に密接なように互いに十分に物理的な親和性を示すことを意味する。相互作用の極端な例は、2つのドメインが連続するか、安定に近位である化学結合の形成である。通常、化学結合相互作用よりも動的であるにもかかわらず、物理的親和性のみに基づく相互作用は、同時局在化している2つのタンパク質に等しく有効であり得る。物理的親和性および化学結合の例には、電荷の相違、疎水性、水素結合、ファンデルワールス力、イオン力、共有結合、およびそれらの組み合わせによって生じる力が含まれるが

50

、これらに限定されない。相互作用ドメインまたは単位間の近位の状態は、一過性もしくは不変または可逆性もしくは不可逆性であり得る。任意の事象では、これは2つの単位の天然の無作為な移動に起因する接触と対照的であるか異なる。必ずしもそうでないが、典型的には、「相互作用」は、相互作用ドメインまたは単位との間の結合によって示される。相互作用の例には、抗原と抗体との間、リガンドと受容体との間、酵素と基質との間などの特定の相互作用が含まれる。

【0039】

2つのタンパク質ドメイン、フラグメント、または完全なタンパク質間の「相互作用」を、多数の方法によって決定することができる。例えば、相互作用を、2ハイブリッドシステムなどの機能アッセイによって決定することができる。タンパク質-タンパク質相互作用を、2つの相互作用パートナー間の親和性結合に基づいた種々の生化学的アプローチによっても決定することができる。一般に当分野で公知のこのような生化学的方法には、タンパク質親和性クロマトグラフィー、親和性プロッティング、免疫沈降などが含まれるが、これらに限定されない。相互作用の強度または質を反映する2つの相互作用タンパク質の結合定数を、当分野で公知の方法を使用して決定することもできる。Phizicky and Field、Microbiol. Rev. , 59、94~123、1995を参照のこと。

10

【0040】

本明細書中で使用される、用語「ドメイン」は、タンパク質またはポリペプチドの機能的部分、セグメント、または領域を意味する。「相互作用ドメイン」は、特に、別のタンパク質、タンパク質フラグメント、または単離されたドメインに対するタンパク質、タンパク質フラグメント、または単離されたドメインの物理的親和性を担うタンパク質、ポリペプチド、またはタンパク質フラグメントの一部、セグメント、または領域をいう。

20

【0041】

本明細書中で使用される、用語「タンパク質複合体」は、タンパク質間の相互作用によって形成された2つまたはそれ以上のタンパク質の組み合わせである複合単位を意味する。典型的には、「タンパク質複合体」は、特異的非共有結合親和性による2つまたはそれ以上のタンパク質の相互の結合によって形成されるが、必ずしもそうでない。しかし、相互作用パートナーとの間に共有結合も存在し得る。例えば、2つの相互作用するパートナーを、タンパク質複合体がより安定化するように共有結合で架橋することができる。

30

【0042】

用語「単離されたタンパク質複合体」は、天然または元の細胞または体内環境で天然に見出されるものと異なる組成物または環境下で存在するタンパク質複合体を意味する。好ましくは、「単離されたタンパク質複合体」は、他の天然に共存する細胞または組織成分から少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも90%分離されている。したがって、「単離されたタンパク質複合体」はまた、人工調製物または非天然宿主細胞中に天然に存在するタンパク質複合体であり得る。「単離されたタンパク質複合体」はまた、「精製されたタンパク質複合体」(すなわち、他の細胞成分、他のポリペプチド、ウイルス物質、もしくは培養培地またはタンパク質複合体中のタンパク質成分が化学合成されている場合は、タンパク質合成に関連する化合物前駆体もしくは副産物を実質的に含まない実質的に均一な調製物中の実質的に精製された形態)であり得る。「精製されたタンパク質複合体」は、典型的には、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも95%の特定のタンパク質複合体を含む調製物を意味する。「精製されたタンパク質複合体」を、標準的な精製技術によって天然もしくは組換え宿主細胞もしくは体内サンプルから得るか化学合成によって得ることができる。

40

【0043】

用語「ハイブリッドタンパク質」、「ハイブリッドポリペプチド」、「ハイブリッドペプチド」、「融合タンパク質」、「融合ポリペプチド」、および「融合ペプチド」を、本明細書中では、天然には特定のポリペプチドと結合しない1つまたは複数のポリペプチド分

50

子に共有結合する該特定のポリペプチド分子を有する天然に存在しないタンパク質を意味するために交換可能に使用する。したがって、「ハイブリッドタンパク質」は、共有結合によって結合した天然に存在するタンパク質またはそのフラグメントであり得る。「ハイブリッドタンパク質」はまた、2つの人工ポリペプチドの相互の共有結合によって形成されたタンパク質であり得る。必ずしもそうでないが、典型的には、2つまたはそれ以上のポリペプチド分子は、ペプチド結合によって互いに「融合」し、分枝状ではない1つのポリペプチド鎖を形成する。

【0044】

本明細書中で使用される、用語「ホモログ」は、本発明によって第2の天然のタンパク質またはそのフラグメントと相互作用することが発見された第1の天然のタンパク質またはそのフラグメントに関して使用する場合、第1の天然の相互作用タンパク質または第2の天然のタンパク質に相互作用することができるように第1の天然のタンパク質の相互作用ドメインの1つにアミノ酸配列が相同であり、及び/または構造が類似するポリペプチドを意味する。典型的には、天然のタンパク質のタンパク質ホモログは、天然のタンパク質と少なくとも50%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、または89%、さらにより好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、または94%、および最も好ましくは95%、96%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を有し得る。ホモログの例は、動物、植物、酵母、および細菌などを含む他の種のオルソログタンパク質であり得る。ホモログを、例えば、天然のタンパク質の変異誘発によって選択することもできる。例えば、ホモログを、本発明に属する当業者には明らかなタンパク質-タンパク質相互作用の検出アッセイ(例えば、下記の酵母2ハイブリッドシステム)と組み合わせた部位特異的変異誘発によって同定することができる。

【0045】

2つの異なる核酸またはポリペプチド配列を比較するために、1つの配列(試験配列)を、本明細書中に開示の他の配列(基準配列)との特定の「%同一」と記載することができる。これに関して、試験配列の長さが基準配列の長さの90%未満である場合、同一%を、Myers and Miller、Bull. Math. Biol., 51、5~37、1989およびMyers and Miller、Comput. Appl. Biosci., 4(1)、11~7、1988のアルゴリズムによって決定する。特に、同一性を、IGH、Montpellier、FRANCEによって継続される<http://www2.igh.cnrs.fr>で利用可能なALIGNプログラムによって決定する。典型的には、デフォルトパラメータを使用すべきである。ALIGNプログラムの改変形態を使用することもできる。

【0046】

試験配列の長さが基準配列の長さの少なくとも90%である場合、同一%を、種々のBLASTプログラムに組み込まれているKarlin and Altschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90、5873~77、1993のアルゴリズムによって決定する。特に、同一%を、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.htm>で利用可能な「BLAST2配列」ツールによって決定する。Tatusova and Madden、FEMS Microbiol. Lett., 174(2):247~50、1999を参照のこと。ペアワイズDNA-DNA比較のために、BLASTN2.1.2プログラムをデフォルトパラメータ(マッチ:1; mismatch:-2; オープンギャップ:5、ペナルティー; 伸長ギャップ:2ペナルティ; ギャップx__ドロップオフ:50; 排除:10; ワードサイズ:11(フィルターあり))で使用する。ペアワイズタンパク質-タンパク質配列比較のために、デフォルトパラメータ(行列:BLSUM62; ギャップオープン:11; ギャップ伸長:1; x__ドロップオフ:15; 排除:10.0; およびワードサイズ:3(フィルターあり))を使用したBLASTP2.1.2プログラムを使用する。

【0047】

10

20

30

40

50

用語「誘導体」は、本発明によって第2の天然のタンパク質（またはそのフラグメント）と相互作用することが発見された第1の天然のタンパク質（またはそのフラグメント）に関して使用する場合、第1の天然のタンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく第1の天然のタンパク質の側鎖群の修飾によって調整された第1の天然のタンパク質の修飾形態を意味する。修飾形態（すなわち、誘導体）は、第2の天然のタンパク質と相互作用することができるはずである。修飾形態の例には、グリコシル化形態、リン酸化形態、ミリスチル化形態、リボシル化形態、およびユビキチン化形態などが含まれる。誘導体には、天然のタンパク質またはそのフラグメントを含む融合タンパク質のハイブリッドも含まれる。公知の技術を使用して誘導体を調整するか、第2の天然のタンパク質との相互作用を試験することができる。

10

【0048】

本明細書中で使用される、用語「抗体」は、任意の抗体クラス（例えば、IgG、IgM、IgA）またはその誘導体に含まれるモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両方を含む。用語「抗体」には、抗体フラグメント（Fab、F(ab')₂）が含まれるがこれらに限定されない）、このようなフラグメントの結合体、および抗原認識エピトープを含む一本鎖抗体も含まれる。さらに、用語「抗体」はまた、部分的または完全なヒト化抗体を含むヒト化抗体を意味する。抗体を、動物またはモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株から得るか、特定の抗体をコードする遺伝子を組換えによって発現する細胞またはライブラリーから得ることができる。

【0049】

本明細書中で使用される、用語「選択的に免疫反応性を示す」とは、抗体が反応性を示すことにより特定のタンパク質またはタンパク質複合体に結合するが、他の類似のタンパク質またはそのフラグメントもしくは成分に結合しないことを意味する。

20

【0050】

本明細書中で使用される、用語「化合物」は、全ての有機または無機分子型（タンパク質、ペプチド、多糖類、脂質、核酸、有機小分子、無機小化合物、およびこれらの誘導体）が含まれるが、これらに限定されない）を含む。

【0051】

特記しない限り、本明細書中で使用される、用語「Tsg101」は、ヒトTsg101を意味する。特記しない限り、本明細書中で使用される、用語「HIV GAG」は、HIV GAGタンパク質を意味する。特記しない限り、本明細書中で使用される、用語「HIV GAGp6」は、HIV GAGp6タンパク質を意味する。

30

【0052】

本明細書中で使用される、用語「HIV感染」は、一般に、レトロウイルスのヒト免疫不全ウイルス（HIV）ファミリー（HIV I、HIV II、およびHIV IIIなどが含まれるが、これらに限定されない）による宿主動物（特に、ヒト宿主）の感染を含む。したがって、HIV感染の治療は、任意のレトロウイルスHIVファミリーを保有する患者およびAIDSが活性と診断された患者の治療ならびにこのような患者のAIDS関連病態の治療もしくは予防を含む。HIVキャリアを、当分野で公知の任意の方法によって同定することができる。例えば、患者が抗HIV抗体陽性であるか、HIV陽性であるか、AIDSの症状が現れていることを基本として患者をHIVキャリアと同定することができる。すなわち、「HIV感染の治療」は、HIV感染のいくつかの進行度（例えば、急性一次感染症候群（無症状または熱、倦怠、下痢、および頭痛などの神経学的症状を示すインフルエンザ様疾患に関連し得る）、無症状感染（循環しているCD4⁺T細胞が段階的に減少する長期の潜伏期間を有する）、およびAIDS（より重篤なAIDSに特徴的な疾患および/または有効な免疫機能と適合するレベル未満の循環しているCD4細胞の減少によって定義される））の任意の1つである患者の治療と理解すべきである。さらに、「HIV感染の治療または予防」はまた、例えば、輸血、体液の交換、刺傷、不測の針の突き刺し、または手術による患者の血液に対する曝露による疑わしい過去のHIVへの曝露後の疑わしいHIV感染の治療を含む。

40

50

【 0 0 5 3 】

用語「A I Dの治療」は、より重篤なA I D Sに特徴的な疾患および/または有効な免疫機能と適合するレベル未満の循環しているC D 4細胞の減少を示す患者の治療を意味する。用語「A I D Sの治療」はまた、A I D S関連症候群(A R C)、進行性全身性リンパ節腫脹症(P G L)、抗H I V抗体陽性病態、およびH I V陽性病態、A I D S関連神経病態(痴呆または熱帯性不全対麻痺など)、カポジ肉腫、血小板減少性紫斑病、およびニューモシスチスカリニ肺炎、ヒト型結核菌などの関連日和見感染、脳のトキソプラズマ症、C M V網膜炎、H I V関連脳症、H I V関連消耗症候群などのA I D SまたはH I V感染に付随するか関連する障害および疾患を意味するA I D S関連病態の治療を含む。

【 0 0 5 4 】

したがって、本明細書中で使用される、用語「A I D Sの予防」は、H I Vに感染しているかH I V感染の疑いがあるか、A I D S発症由来のH I V感染の危険性があるか(より重篤なA I D Sに特徴的な疾患および/または有効な免疫機能と適合するレベル未満の循環しているC D 4細胞の減少によって特徴付けられる)、および/またはA I D S関連病態を示す患者の予防を意味する。

【 0 0 5 5 】

2. タンパク質複合体

酵母2ハイブリッドシステムを使用して新規のタンパク質-タンパク質相互作用を発見および確認した。特に、T s g 1 0 1はH I V G A G p 6と相互作用することが発見された。酵母2ハイブリッドシステムで発見されたT s g 1 0 1およびH I V G A G p 6の結合領域を表1に示す。T s g 1 0 1およびH I V G A G p 6の遺伝子配列およびアミノ酸配列のG e n B a n k 寄託番号を、以下の表1に示す。

【 0 0 5 6 】

【表1】

H I V G a gおよびT s g 1 0 1の結合領域

ベイト			プレイ		
ベイトタンパク質	アミノ酸座標		プレイタンパク質	アミノ酸座標	
	始め	終わり		始め	終わり
HIV Gag(GenBank 寄託番号AF324493)	449	500	腫瘍抑制遺伝子101 (Tsg101)(GenBank 寄託番号U82130)	7	390

【 0 0 5 7 】

2. 1 T s g 1 0 1はH I Vウイルス出芽に関連する

腫瘍感受性遺伝子101(T s g 1 0 1)は、当初、腫瘍形成に関連する381アミノ酸ポリペプチドと同定された。T s g 1 0 1を、細胞周期の段階に依存して核内および細胞質に局在化することができる。T s g 1 0 1は、スタスミン(腫瘍形成に關与する細胞質リタンパク質)と相互作用し、N I H - 3 T 3細胞中でのT s g 1 0 1抗センス転写物の過剰発現により細胞が形質転換される。L i a n d C o h e n、C e l l、8 5 (3)、3 1 9 ~ 2 9、1 9 9 6を参照のこと。さらに、乳癌腫瘍形成および/または乳癌進行の間にT s g 1 0 1の欠損が起こり得ることが示唆されている。L iら、C e l l、8 8 (1)、1 4 3 ~ 5 4、1 9 9 7。T s g 1 0 1は、ユビキチン結合酵素E 2触媒ドメインを含む。最近、ユビキチン/プロテアソーム分解経路の可能な成分としてT s g 1 0 1が注目されている。データベースでの検索および比較により、N末端T s g 1 0 1は、E 2ユビキチン結合(U b c)酵素に関連するドメインを含むが、活性部位のシステインを欠くことが見出された。K o o n i n a n d A b a g y a n、N a t . G e n e t . , 1 6 (4)、3 3 0 ~ 1、1 9 9 7を参照のこと。したがって、T s g 1 0 1は、明らかに不活性なU b c酵素のホモログ群に属し得る。前出を参照のこと。E 2ユビキチ

10

20

30

40

50

ン結合 (Ubc) 酵素に関連するドメインを、ユビキチン E2 変異 (UEV) ドメインという。

【0058】

本発明によれば、HIV-1のGAGポリタンパク質(アミノ酸449~500、p6ドメイン、すなわち「GAGp6」)を使用したヒト脾臓ライブラリーの検索により、腫瘍感受性TSG101タンパク質(Tsg101、アミノ酸7~390)が単離された。本明細書中で使用したGAGp6ペイトは、後期ドメインモチーフ(-PTAP-)を含む。レトロウイルスのGAGポリタンパク質により、内部ビリオンコアを産生する成熟タンパク質セット(基質、キャプシド、およびヌクレオキャプシド)が得られる。さらに、GAGはまた、p6と呼ばれるC末端部分を含む。HIV1の場合、GAGp6は、宿主細胞表面からのHIVウイルスの出芽の後期段階に必要であるので後期ドメインと呼ばれる配列を含む。後期ドメインは、ウイルスの出芽で後期ドメインが必要であるという点で、ユビキチンと機能的に関連し、遊離ユビキチンの細胞内プールは類似の後期表現型を産生する。Patnaikら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97(24)、13069~74、2000; Schubertら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97(24)、13057~62、2000; Strackら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97(24)、13063~8、2000。後期ドメインは、ユビキチン化機構のドッキング部位を示すと考えられている。

10

【0059】

当分野で公知のように、P(T/S)APモチーフは、公知の全霊長類レンチウイルスのGAGp6ドメイン間で保存される。GAGp6ドメインを欠く非霊長類レンチウイルスでは、P(T/S)APモチーフは、GAGポリタンパク質のC末端近傍に存在する。P(T/S)APモチーフには宿主細胞表面からのウイルス出芽の後期段階が必要であることが示された。これは、レンチウイルス、特にHIVの粒子産生に重要である。Huangら、J. Virol.、69、6810~6818、1995を参照のこと。詳細には、PTAPモチーフの欠失により、ウイルス粒子産生が劇的に減少する。さらに、PTAP欠損ウイルスは、典型的な形態形成段階を介して進行するが、プロセスを完了することができない。むしろ、このウイルスは、原形質膜に拘束されたままであり、したがって非感染性となる。すなわち、ウイルス出芽プロセスが引き止められる。Huangら、J. Virol.、69、6810~6818、1995を参照のこと。

20

30

【0060】

本発明によれば、異なるGAGp6の点変異(E6G、P7L、A9R、またはP10L)を作製し、Tsg101タンパク質の結合する能力について試験した。以下の実施例2を参照のこと。野生型GAGp6ペプチドおよびE6G GAGp6変異体は、Tsg101タンパク質に結合することができ、P7L、A9R、およびP10Lの各点変異によりTsg101に対するGAGp6結合親和性が破壊される。P7L、A9R、およびP10Lの点変異により、GAGp6ペプチドのPTAPモチーフが変化する。HIV GAGp6 gagタンパク質のPTAPモチーフの点変異により、HIV粒子の宿主細胞からの出芽が防止される。Huangら、J. Virol.、69、6810~6818、1995を参照のこと。さらに、以下の実施例3に示すように、本発明者らは、HIV GAGp6の最初の14アミノ酸残基(PTAP後期ドメインモチーフを含む)がTsg101のN末端部分(Tsg101 UEVドメインを含むアミノ酸残基1~207)への結合に十分であることを発見した。

40

【0061】

Tsg101は、エンドサイトーシス、細胞内小胞の輸送、および液胞タンパク質選別(VPS)に密接に関連する。VPS経路は、リソソーム(酵母中の空胞)での最終的な分解のための膜結合タンパク質を選別する。Lemmon and Traub、Curr. Opin. Cell. Biol.、12、457~66、2000を参照のこと。2つの別のVPS経路への侵入は、ゴルジ装置からの小胞輸送を介するか(例えば、異常な折り畳み構造の膜タンパク質の分解)、原形質膜からのエンドサイトーシス(例えば、上皮

50

成長因子受容体 (EGFR) のような表面タンパク質のダウンレギュレーション) を介する。いずれかの供給源からの小胞輸送タンパク質は、エンドソームとの融合によって VPS 経路に入ることができる。これらのエンドソームが成熟するにつれて、多小胞体 (MVB) と呼ばれる構造の形成を介したリソソーム分解についてこれらの積荷が選別される。後期エンドソーム上の表面パッチが区画に出芽した場合に MVB が作製されて、小胞 (約 50 ~ 100 nm) が形成される。成熟 MVB は、数百個のこれらの小胞を含む。次いで、MVB をリソソームに融合した場合、この加水分解性のオルガネラの分解のための小胞が遊離する。

【0062】

酵母 2 ハイブリッドアッセイで単離された Tsg101 プレイフラグメントは、ユビキチン E2 変異型 (UEV) ドメインを含み、これは、UEV ドメインが P (T/S) AP ドメインへの結合に関与することを示す。Tsg101 UEV ドメインの関連は、ユビキチンがレトロウイルス出芽に必要であり、プロテオソーム阻害により HIV-1 感染細胞中の遊離ユビキチンレベルを減少させ、HIV-1 および HIV-2 の放出および成熟を妨害するという事実と一致する。Patnaik ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97 (24)、13069 ~ 74、2000; Schubert ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97 (24)、13057 ~ 62、2000; Strack ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97 (24) 13063 ~ 8、2000 を参照のこと。

【0063】

Ub の短い鎖 (1 ~ 3 分子) がリソソーム中でのエンドサイトーシスおよび分解のための表面受容体を「標識」することができることが公知である。Hicke、Trends Cell. Biol.、9、107 ~ 112、1999; Rotin ら、J. Membr. Biol.、176、1 ~ 17、2000。P (T/S) AP モチーフを保有するいくつかのタンパク質のクラスは、VPS 経路を介して分解され、VPS 経路で機能することが公知の表面受容体である。Farr ら、Biochem. J.、345 (3)、503 ~ 509、2000; Staub and Rotin、Structure、4、495 ~ 499、1996 を参照のこと。Tsg101 がユビキチンリガーゼ活性を欠くかどうかは知られていないにもかかわらず、本発明で発見された多数の Tsg101 相互作用物質に基づいて、VPS 経路における Tsg101 のもっともらしい役割は P (T/S) AP モチーフを保有し、MVB に出芽する小胞への組み込みの調整を援助するユビキチン化タンパク質を認識することであると考えられる。

【0064】

MVB の形成は、細胞が細胞質から別の区画に小胞を出芽する唯一公知の細胞プロセスであるので、これは特に魅力的である。この出芽は、原形質膜で細胞質から細胞外の空間にウイルスを出芽するウイルス出芽と位相的に等しい。したがって、いかなる理論にも拘束されることを望まないが、レンチウイルス GAG ポリタンパク質中での P (T/S) AP モチーフの細胞タンパク質 Tsg101 への結合により、P (T/S) AP モチーフを有するレンチウイルスが通常 MVB 形成に使用される細胞機構を侵害し、原形質膜からウイルスを出芽すると考えられる。レンチウイルス感染細胞での Tsg101 の欠失または Tsg101 と P (T/S) AP モチーフとの相互作用の妨害により細胞からのレンチウイルスの出芽が防止されるとも考えられる。

【0065】

さらに、ウイルス出芽を容易にする細胞機構の漸増は一般的な現象のようであり、他の封入ウイルスの構造タンパク質中で異なる後期ドメインが同定されている。Vogt、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97、12945 ~ 12947、2000 を参照のこと。2 つの十分に特徴付けられた後期ドメインは、一定の封入ウイルス由来の膜結合タンパク質中で見出された「PY」モチーフ (コンセンサス配列: PPXY; X = 任意のアミノ酸) である。Craven ら、J. Virol.、73、3359 ~ 3365、1999; Harty ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97、

13871~13876、2000; Hartylら、J. virol., 73、2921~2929、1999; および Jayakarら、J. Virol., 74、9818~9827、2000を参照のこと。PYモチーフの細胞標的は、HectユビキチンE3リガーゼドメインも含むNedd4である。ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)のGAGタンパク質中に「YL」モチーフ(YXXL)が見出された。Pufferら、J. Virol., 71、6541~6546、1997; Pufferら、J. Virol., 72、10218~10221、1998。「YL」モチーフの細胞受容体は、AP-2のAP-50サブユニットであるようである。Pufferら、J. Virol., 72、10218~10221、1998。興味深いことに、P(T/S)APモチーフ、PYモチーフ、およびYLモチーフなどの後期ドメインは、レトロウイルスGAGタンパク質内の異なる位置に移動した場合でも依然として機能することができ、これにより、これらは構造エレメントよりもむしろ細胞因子のドッキング部位であることが示唆される。Parentら、J. Virol., 69、5455~5460、1995; Yuanら、EMBO J., 18、4700~4710、2000。さらに、P(T/S)APモチーフ、PYモチーフ、およびYLモチーフなどの後期ドメインは、交換可能に機能することができる。すなわち、ある後期ドメインモチーフをウイルス出芽に影響を与えることなく別の後期ドメインの代わりに使用することができる。Parentら、J. Virol., 69、5455~5460、1995; Yuanら、EMBO J., 18、4700~4710、2000; Strackら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97、13063~13068、2000。

【0066】

したがって、いかなる理論に拘束されることも望まないが、図1に示すように、3つの後期ドメインモチーフは異なる細胞標的に結合するにもかかわらず、ウイルス出芽に影響を与える共通の細胞経路を利用すると考えられる。特に、ウイルス後期ドメインモチーフの異なる細胞受容体が液胞タンパク質選別(VPS)およびMVB経路の共通の下流ステップに送られると考えられる。上記で考察したように、Tsg101はVPS経路で機能する。別のタンパク質Vps4は、Tsg101循環およびエンドソーム輸送で機能する。特に、Vps4変異体は、正常なTsg101輸送を防止し、エンドサイトーシス基質の選別および再利用を欠損した異常な高度に空胞のあるエンドソームの形成を誘導する。Babstら、Traffic, 1、248~258、2000を参照のこと。

【0067】

興味深いことに、腫瘍感受性タンパク質Tsg101を使用した脾臓ライブラリーの検索によっても、成長停止タンパク質GAS7bとの相互作用が同定される。さらに、同一出願人による米国特許仮出願番号第60/311,528号で開示されるように、GAS7bは、HIV GAGポリタンパク質のキャプシド領域の相互作用物質である。静止状態に入る細胞でGAS7bが発現することが好ましい。マウス胚小脳の最終的に分化した培養物でのGAS7b発現の阻害により神経突起伸長が遅延し、未分化の神経芽細胞培養物の過剰発現により神経突起様伸長が劇的に促進される。Jurら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(19)、11423~8、1998; Lazakovitchら、Genomics, 61(3)、298~306、1999。これらの所見により最終的な細胞分化の調節におけるGAS7bの役割が示唆され、GAS7bのドメイン構造によりこのドメイン構造が細胞骨格の制御によってこれを行うことができることが示唆される。さらに、GAS7bはまた、アクチン細胞骨格を調節する小GTPアーゼの2つの異なるレギュレーターと相互作用する。GAS7bのHIVキャプシドおよびTsg101との相互作用により(その後HIV GAG p6タンパク質と相互作用する)、これらのタンパク質がウイルスの構築および出芽の後期に関連する多細胞複合体を形成することが強く示唆される。

【0068】

2.2. タンパク質複合体

上記で考察するように、Tsg101タンパク質のUEVドメインおよびHIV GAG

p 6のPTAPモチーフは相互作用を担う。さらに、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を使用した本発明者らによるGenBankでのHIVアミノ酸配列実験によりモチーフの変異体で置換された標準的なPTAPモチーフを有する多数のHIV株が同定され、このような変異体もまたウイルス出芽が可能であり、このような変異体を含むペプチドもまたTsg101に結合することができることが示された。このような同定された変異体には、PSAPモチーフ、PIAPモチーフ (Zhangら、J. virol., 71, 6662~6670, 1997; Farrarら、J. Ned. Virol., 34, 104~113, 1991を参照のこと)、およびPTTPモチーフ (Zhangら、J. virol., 71, 6662~6670, 1997を参照のこと) が含まれる。

10

【0069】

したがって、本発明は、Tsg101とHIV GAGポリペプチドとの間の相互作用によって形成されたタンパク質複合体を提供する。本発明はまた、HIV GAGポリペプチドと相互作用するTsg101のホモログ、誘導体、またはフラグメントを有するタンパク質複合体を提供する。さらに、本発明はまた、HIV GAGポリペプチドのホモログ、誘導体、またはフラグメントと相互作用するTsg101を有するタンパク質複合体を含む。さらに異なる実施形態では、Tsg101のホモログ、誘導体、またはフラグメントおよびHIV GAGポリペプチドのホモログ、誘導体、またはフラグメントを有するタンパク質複合体が得られる。言い換えれば、1つまたは複数の本発明のタンパク質複合体の相互作用タンパク質メンバーは、天然のタンパク質または天然のタンパク質のホモ

20

【0070】

したがって、例えば、タンパク質複合体中の1つの相互作用パートナーは、完全な天然のTsg101、HIV GAG p6と相互作用することができるTsg101のホモログ、Tsg101の誘導体、Tsg101ホモログの誘導体、HIV GAG p6と相互作用

30

【0071】

他のパートナーは、(1) HIV GAGポリペプチド、(2) HIV GAGポリペプチドと少なくとも85%、90%、または95%同一のアミノ酸配列を有し、Tsg101と相互作用することができるHIV GAGポリペプチドのホモログ、(3) HIV GAG p6タンパク質、(4) HIV GAG p6と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一のアミノ酸配列を有し、Tsg101と相互作用することができるHIV GAG p6のホモログ、(5) Tsg101と相互作用することができるHIV GAG p6のフラグメント、(6) HIV GAGポリペプチド、HIV GAGポリペプチドのホモログ、HIV GAG p6、HIV GAG p6のホモログ、またはHIV GAG p6のフラグメントを含む融合タンパク質であり得る。

40

【0072】

本発明のタンパク質複合体は、相互作用パートナーとしてHIV GAGポリペプチドを含む。さらに、P(T/S/I)(A/T)P(配列番号1~6)を含む他のレトロウイルス由来のGAGポリペプチドおよびそのフラグメントは、HIV GAGポリペプチド

50

と同一の様式で T s g 1 0 1 とも相互作用すると考えられる。したがって、これらを、T s g 1 0 1 またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントを使用したタンパク質複合体の形成に使用することができる。好ましくは、P (T / S) A P 後期ドメインを含むレンチウイルスの G A G ポリペプチドまたはフラグメントを使用して、タンパク質複合体を形成する。このような G A G ポリペプチドまたはフラグメントは、ウシレンチウイルス（例えば、ウシ免疫不全ウイルス (B I V)、J e m b r a n a 病ウイルス）、ネコレンチウイルス（例えば、ネコの免疫不全、消耗性疾患、および脳炎を発症するネコ免疫不全ウイルス (F I V)）、およびヒツジ/ヤギレンチウイルス（例えば、ヤギの貧血および消耗性疾患を発症するヤギ関節炎 - 脳炎ウイルス (C A E V)、ヒツジレンチウイルス、肺炎、消耗性疾患、脳炎、および関節炎を発症するビスナウイルス）を含む非霊長類レンチウイルスに由来し得る。好ましくは、G A G ポリペプチドまたはそのフラグメントは、霊長類レンチウイルス（ヒト免疫不全ウイルス 1 (H I V - 1)、ヒト免疫不全ウイルス 2 (H I V - 2)、ヒト免疫不全ウイルス 3 (H I V - 3)（これらは全て A I D S を発症する）、チンパンジー、マンガベア、サバンナモンキー、マンドリル、L ' H o e s t、サイクスモンキー、または G u e r e z a C o l o b u s モンキーなどの宿主に感染する種々のサル免疫不全ウイルスが含まれるが、これらに限定されない）に由来する。

【 0 0 7 3 】

天然のレトロウイルス G A G ポリペプチドに加えて、T s g 1 0 1 またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントの有用な相互作用パートナーには、T s g 1 0 1 と相互作用することができる天然のレトロウイルス G A G ポリペプチドのホモログ、T s g 1 0 1 と相互作用することができる天然の誘導体またはホモログ G A G ポリペプチド、T s g 1 0 1 と相互作用することができる G A G ポリペプチドのフラグメント（例えば P (T / S) A P モチーフを含むフラグメント）、G A G ポリペプチドフラグメントの誘導体、または (1) 完全な G A G ポリペプチド、(2) T s g 1 0 1 と相互作用することができる G A G ポリペプチドのホモログ、もしくは (3) T s g 1 0 1 と相互作用することができる G A G ポリペプチドのフラグメントを含む融合タンパク質が含まれる。

【 0 0 7 4 】

H I V G A G p 6 と相互作用することができる T s g 1 0 1 のフラグメントは、T s g 1 0 1 をコードする核酸とタンパク質 - タンパク質相互作用試験との分子光学 (m o l e c u l a r e n g i n e e r i n g) の組み合わせであり得る。例えば、表 1 の座標を開始点として使用し、座標範囲内の種々の T s g 1 0 1 フラグメントを、座標の片方または両方の末端からの欠失によって作製することができる。得られたフラグメントを、タンパク質 - タンパク質相互作用の検出に関して当分野で公知の任意の方法（例えば、酵母 2 ハイブリッド法）を使用して H I V G A G p 6 と相互作用する能力を試験することができる。同様に、T s g 1 0 1 と同語作用することができる H I V G A G のフラグメント、H I V G A G p 6 のフラグメント、および他のレトロウイルス G A G ポリペプチドのフラグメントを、同様の様式で同定することもできる。

【 0 0 7 5 】

特定の実施形態では、本発明のタンパク質複合体は、天然に存在する H I V G A G 配列の少なくとも 7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、またはそれ以上のアミノ酸残基の連続スパンを含むポリペプチドを含む。好ましくは、ポリペプチドは、天然に存在する H I V G A G 配列の 10 と 20 との間の連続スパンを含む。連続スパンは、P (T / S) A P モチーフまたはその変異体（例えば、P I A P モチーフおよび P T T P モチーフ）であり得る H I V 後期ドメインモチーフに及ぶ。好ましくは、連続スパン中の後期ドメインモチーフは、P (T / S) A P モチーフである。他の特定の実施形態では、タンパク質複合体は、P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを含む他のレトロウイルス由来の天然に存在する G A G ポリペプチド配列の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、またはそれ以上のアミノ酸残基の連続スパンを含むポリペプチドを含む。連続スパンは、レトロウイルス後期ドメインモチーフに及ぶはずである。好ましい実施形態では

、このような他のレトロウイルスは、霊長類レンチウイルスまたは非霊長類レンチウイルス（EIAV以外）である。特定の実施形態では、本発明のタンパク質複合体には、EPTAP（配列番号7）、EPSAP（配列番号8）、PTAPP（配列番号9）、PSAPP（配列番号10）、EPTAPP（配列番号11）、EPSAPP（配列番号12）、PEPTAP（配列番号13）、PEPSAP（配列番号14）、RPEPTAP（配列番号15）、RPEPSAP（配列番号16）、PEPTAPP（配列番号17）、PEPSAPP（配列番号18）、EPTAPPEE（配列番号19）、EPSAPPEE（配列番号20）、EPTAPPAE（配列番号21）、PEPTAPPEE（配列番号22）、PEPTAPPAE（配列番号23）、PEPSAPPEE（配列番号24）、RPEPTAPPEE（配列番号25）、RPEPSAPPEE（配列番号26）、RPEPTAPPAE（配列番号27）、RPEPSAPPAE（配列番号28）、LQSRPEPTAPPEE（配列番号29）、LQSRPEPSAPPEE（配列番号30）、LQSRPEPTAPPEES（配列番号31）、およびLQSRPEPSAPPEES（配列番号32）の群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。

10

20

30

40

50

【0076】

さらに、P(T/S)AP、PIAP、またはPTTPモチーフ自体でTs g 101結合に十分であり得ると考えられる。したがって、本質的にP(T/S)AP、PIAP、またはPTTPモチーフを含むポリペプチド（すなわち、P(T/S)AP、PIAP、またはPTTPモチーフおよびいくつかの隣接アミノ酸を有するポリペプチド）と相互作用するTs g 101タンパク質またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントを含むタンパク質複合体も得られる。

【0077】

本発明のタンパク質複合体の特定の実施形態では、2つまたはそれ以上の相互作用パートナー（Ts g 101およびHIV GAG p 6またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメント）を、直接互いに融合させるか、ペプチドリンカーによって互いに共有結合させて、1つの分枝状でないポリペプチド鎖を有するハイブリッドタンパク質を形成する。従って、タンパク質複合体を、ハイブリッドタンパク質の2つの部分の間の「分子内」相互作用によって形成することができる。また、このタンパク質複合体中の融合または結合相互作用パートナーの一方または両方は、天然のタンパク質または天然のタンパク質のそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントであり得る。

【0078】

本発明のタンパク質複合体は、修飾形態であり得る。例えば、タンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を、タンパク質複合体に結合させることができる。別の実施形態では、タンパク質複合体中の相互作用パートナー間の相互作用を増強することができる非抗体モジュレーターを含み得る。あるいは、安定化のためにタンパク質複合体中のタンパク質メンバーを架橋することができる。種々の架橋方法を使用することができる。例えば、R-S-S-R'の形態（RおよびR'基はタンパク質複合体中の一定のアミノ酸鎖と反応して共有結合を形成することができる）の二価性試薬を使用することができる。例えば、Trautら、Creighton編、「タンパク質機能：実践アプローチ」、IRL Press、Oxford、1989；Bairdら、J. Biol. Chem., 251, 6953~6962, 1976を参照のこと。他の有用な架橋剤には、例えば、Denny-Jaffee試薬（アゾ結合によって切断可能な異種生体機能性光反応性部分）（Dennyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5286~5290, 1984を参照のこと）および¹²⁵I - {S - [N - (3 - ヨード - 4 - アジドサリチル) システアミニル] - 2 - チオピリジン}、システイン特異的光架橋試薬（Chenら、Science, 265, 90~92, 1994を参照のこと）が含まれる。

【0079】

上記のタンパク質複合体には、任意のさらなる成分（例えば、他のタンパク質、核酸、脂質分子、単糖類もしくは多糖類、イオン、または他の分子）をさらに含み得る。

【0080】

2.3. タンパク質複合体の調製方法

本発明のタンパク質複合体を、種々の方法によって調製することができる。詳細には、タンパク質複合体を、動物組織サンプル、好ましくはタンパク質複合体を含むヒト組織サンプルから直接単離することができる。あるいは、タンパク質複合体を、タンパク質複合体を組換えによって発現する宿主細胞から精製することができる。当業者に明らかなように、タンパク質複合体を、相互作用タンパク質パートナーに免疫反応性を示す抗体、好ましくは以下に詳細に考察したタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を使用した免疫共沈によって組織サンプルまたは組換え宿主細胞から調製することができる。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。免疫共沈は、結合タンパク質の単離または検出のために当分野で一般に使用されている方法である。この手順では、一般に、血清サンプルまたは組織もしくは細胞の溶解物を適切な抗体と混合する。抗体に結合したタンパク質複合体を、沈殿および洗浄する。次いで、結合タンパク質複合体を溶出する。

10

【0081】

あるいは、相互作用タンパク質パートナーに免疫反応性を示す抗体、または好ましくはタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を使用した天然の組織サンプルまたは組換え宿主細胞からのタンパク質複合体の単離で免疫親和性クロマトグラフィーおよび免疫プロットング技術を使用することもできる。例えば、タンパク質免疫親和性クロマトグラフィーでは、抗体を、例えば、カラム中の Sepharose などのマトリクスに共有結合または非共有結合させることができる。次いで、組換え細胞由来の組織サンプルまたは細胞を、抗体またはマトリクスに接触させることができる。次いで、カラムを低塩溶液で洗浄して、非結合成分を洗い流す。次いで、カラムに保持されたタンパク質複合体を、高塩溶液、抗体の競合抗原、カオトロピック剤、またはドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などを使用してカラムから溶出することができる。免疫プロットングでは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) およびその後の例えばニトロセルロースメンブレンへの移行により組織サンプルまたは組換え宿主細胞溶解物から粗タンパク質を分画することができる。メンブレン上のタンパク質複合体の位置を、特異的抗体を使用して同定し、その後タンパク質複合体を単離することができる。

20

【0082】

別の実施形態では、各相互作用タンパク質パートナーを、上記の類似の方法を使用して組織サンプルまたは組換え宿主細胞から独立して単離または精製することができる。次いで、各相互作用タンパク質パートナーを、相互作用を誘導する条件下で互いに接触させて、本発明のタンパク質複合体を形成させる。異なるタンパク質相互作用には異なる条件が必要であり得ることに留意すべきである。出発点では、例えば、20 mM の Tris-HCl (pH 7.0) および 500 mM の NaCl を含む緩衝液を使用することができる。温度、pH、塩濃度、還元剤などを含むいくつかの異なるパラメータを評価することができる。最適なインキュベーション条件を決定するためにいくつかの小規模実験が必要であり得るが、これは、本開示を参照すれば、十分に当業者の能力の範囲内である。

30

【0083】

さらに別の実施形態では、本発明のタンパク質複合体を、タンパク質親和性クロマトグラフィーまたは親和性プロットングによって組織サンプル、または組換え宿主細胞、または他の適切な供給源から調製することができる。すなわち、1つの相互作用タンパク質パートナーを使用して、結合親和性により他の相互作用タンパク質パートナーを単離し、タンパク質複合体を形成させる。したがって、精製によって組織サンプルからまたは組換え発現もしくは化学合成によって調製された相互作用タンパク質パートナーを、例えば、クロマトグラフィーカラム中の Sepharose などのマトリクスに共有結合または非共有結合させることができる。次いで、組換え細胞由来の組織サンプルまたは細胞溶解物を、マトリクス上の結合タンパク質に接触させることができる。低塩溶液を使用して非結合成分を洗い流し、高塩溶液を使用してカラム中の結合タンパク質複合体を溶出する。親和性プロットングでは、組織サンプルまたは組換え宿主細胞溶解物由来のタンパク質サン

40

50

ブルをポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で分画し、例えば、ニトロセルロースメンブレンに移すことができる。次いで、精製された相互作用タンパク質メンバーを、メンブレン上の相互作用タンパク質パートナーに結合させて、タンパク質複合体を形成し、メンブレンから単離する。

【0084】

本発明においてタンパク質複合体または各相互作用タンパク質の組換え発現の目的で任意の組換え発現法を使用することができることが当業者に明らかである。一般に、相互作用タンパク質メンバーをコードする核酸を、適切な宿主細胞に移入することができる。宿主細胞内でタンパク質複合体を組換えで形成する目的のために、2つまたはそれ以上の相互作用タンパク質メンバーをコードする核酸を、宿主細胞に移入すべきである。

10

【0085】

典型的には、核酸、好ましくはDNAの形態の核酸をベクターに組み込んで、ひとたび宿主細胞に移入されると相互作用タンパク質メンバーを発現することができる発現ベクターを形成する。本発明に多数のベクター型を使用することができる。本発明の目的のための発現ベクターの構築方法は、本発明を知らされた当業者で明白である。一般に、「現代の分子生物学プロトコール」、第2版、Ausubelら、Greene Publish, Assoc. & Wiley Interscience、第13章、1988; Glover、「DNAクローニング」、第II巻、IRL Press, Wash., D. C., 第3章、1986; Bitterら、Methods in Enzymology、153、516~544、1987; 「酵母サッカロミセスの分子生物学」、Strathernら編、Cold Spring Harbor Press、第I巻および第II巻、1982; および Sambrookら、「分子クローニング: 実験マニュアル」、Cold Spring Harbor Press、1989を参照のこと。

20

【0086】

一般に、発現ベクターには、相互作用タンパク質パートナーをコードするDNAに作動可能に連結されたプロモーターを有する発現カセットが含まれる。プロモーターは、天然のプロモーター(すなわち、細胞中での相互作用タンパク質発現を担うための天然に存在する細胞中に見出されるプロモーター)であり得る。あるいは、発現カセットは、キメラな発現カセット(すなわち、天然に存在する細胞中での相互作用タンパク質メンバーの発現を担う天然のプロモーターではない異種プロモーター)であり得る。発現ベクターには、宿主細胞中でのベクター複製のためのDNA複製起点をさらに含み得る。好ましくは、発現ベクターには、例えば、大腸菌中でのベクター複製用の複製起点、ならびに発現ベクターを保有する宿主細胞のみを選択および維持するための選択マーカーも含まれる。さらに、発現カセットは、好ましくは、相互作用タンパク質メンバーをコードするDNA由来の転写を調節するように機能する誘導エレメントも含む。転写エンハンサー配列および転写調節配列(例えば、シャイン・ダルカルノ配列)など他の調節配列を、発現カセット中で作動可能に含むこともできる。ウシ成長ホルモン由来のポリアデニル化シグナルなどの末端配列(SV40、lacZ、およびAcMNPV多面体タンパク質遺伝子)を、発現カセット中の相互作用タンパク質メンバーをコードするDNAに作動可能に連結させることもできる。発現したタンパク質の検出および/または精製のためのエピトープタグコード配列を、融合タンパク質が発現されるように相互作用タンパク質メンバーをコードするDNAに作動可能に連結させることもできる。有用なエピトープタグの例には、インフルエンザウイルス血球凝集素(HA)、サルウイルス5(V5)、ポリヒスチジン(6xHis)、c-myc、lacZ、およびGSTなどが含まれるが、これらに限定されない。ポリヒスチジntagを有するタンパク質を、Ni親和性カラムを使用して容易に検出および/または精製することができ、多数のエピトープタグに免疫反応性を示す特異的抗体は、市販されている。発現ベクターはまた、細胞外に発現したタンパク質または特定の細胞内区画に指向する成分を含み得る。シグナルペプチド、核局在化配列、小胞体保持シグナル、ミトコンドリア局在化配列、ミリスチル化シグナル、パルミトイル化シグナル、膜貫通配列は、発現タンパク質の運命を決定することができる任意選択的なベクター成分の

30

40

50

例である。1つの宿主細胞中で2つまたはそれ以上の相互作用タンパク質メンバーを発現することが望ましい場合、相互作用タンパク質メンバーをコードするDNAフラグメントを、1つのベクターまたは異なるベクターに組み込むことができる。

【0087】

従って、構築された発現ベクターを、当分野で公知の任意の技術（例えば、直接的DNA形質転換、微量注入、エレクトロポレーション、ウイルス感染、リポフェクション、および遺伝子銃など）によって宿主細胞に移入することができる。相互作用タンパク質メンバーの発現は、一過性であっても安定していても良い。発現ベクターを染色体外状態（すなわち、自己複製プラスミドまたはウイルス）で宿主細胞中に維持することができる。あるいは、発現ベクターを、安定な細胞株の選択または部位特異的組換えなどの従来技術によ

10

【0088】

ベクター構築物を、種々の宿主細胞（細菌、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞ならびに哺乳動物およびヒト細胞が含まれるが、これらに限定されない）での発現に適切のように設計することができる。異なる宿主細胞中での発現用の発現ベクターの調製方法は、当業者に明らかにはずである。

【0089】

天然の相互作用タンパク質メンバーのホモログおよびフラグメントを、上記の組換え法を使用して容易に発現させることもできる。例えば、タンパク質のフラグメントを発現させるために、発現ベクターに組み込まれたDNAフラグメントを、タンパク質のフラグメントのみをコードするように選択することができる。同様に、特定のハイブリッドタンパク質を、ハイブリッドタンパク質をコードする組換えDNAを使用して発現することができる。同様に、ホモログタンパク質を、ホモログタンパク質またはタンパク質フラグメントをコードするDNA配列から発現させることができる。ホモログコードDNA配列を、組換えDNA技術を使用した天然タンパク質コード配列の操作によって得ることができる。この目的のために、一般に当分野で公知の技術を使用して、無作為または部位特異的変異誘発を行うことができる。タンパク質誘導体を作製するために、例えば、天然の相互作用タンパク質メンバーのアミノ酸配列を、予め決定した様式で、例えば、タンパク質キナーゼのリン酸化、グリコシル化、リポシル化、ミリストイル化、およびパルミトイル化など

20

30

40

【0090】

さらに、本発明の天然の相互作用タンパク質メンバーの誘導体を、天然のタンパク質のアミノ酸側鎖への一定の部分の化学結合によって調製することもできる。

【0091】

所望の場合、このようにして作製したホモログおよび誘導体を、意図する相互作用パートナーと相互作用させてタンパク質複合体を形成することができるかどうかを決定するために試験することができる。例えば、酵母2ハイブリッドシステムまたはタンパク質-タンパク質相互作用の検出のための当分野で公知の他の方法によって試験を行うことができる。

50

【0092】

ペプチド結合およびペプチドリinkerによってHIV GAGもしくはHIV GAG p6またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントに共有結合したTsg101またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントを有する上記のハイブリッドタンパク質を、キメラ核酸（例えば、融合タンパク質をコードするDNAまたはRNAフラグメント）から組換えによって発現することができる。したがって、本発明はまた、本発明のハイブリッドタンパク質をコードする核酸を提供する。さらに、本発明のハイブリッドタンパク質をコードする核酸が組み込まれた発現ベクターも提供する。キメラ核酸およびこれを含む発現ベクターの産生方法は、本発明を開示された当業者に明らかであるはずである。

【0093】

10

2.4. タンパク質マイクロチップ

本発明の別の実施形態によれば、1つまたは複数のタンパク質複合体および/または本発明のタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を有するタンパク質マイクロチップまたはマイクロアレイが得られる。タンパク質マイクロアレイは、プロテオミクス研究ならびに疾患のタンパク質ベースの検出および診断で重要となりつつある。本発明のこの実施形態のタンパク質マイクロアレイは、種々の適用（例えば、タンパク質複合体に結合してタンパク質複合体中の相互作用タンパク質メンバー間の相互作用を調整することができる化合物の大規模またはハイスループットスクリーニングが含まれる）に有用である。

【0094】

本発明のタンパク質マイクロアレイを、当分野で公知の多数の方法で調製することができる。適切な方法の例は、MacBeath and Schreiber、Science、289、1760～1763、2000で開示されている方法である。本質的に、ガラス製の顕微鏡スライドを、アルデヒド含有シラン試薬（TeleChem International、Cupertino、Californiaから購入したSuper Aldehyde Substrate）で処理する。40%のグリセロールを含むリン酸緩衝化生理食塩水中のnl体積のタンパク質サンプルを、高精度密着印画ロボットを用いて処理したスライドにスポットする。インキュベーション後、スライドをウシ血清アルブミン（BSA）含有緩衝液中に浸漬し、次のマイクロチップへの適用において非特異的タンパク質結合を防止するように機能するBSA層を形成させる。あるいは、MacBeath and Schreiberで開示のように、本発明のタンパク質またはタンパク質複合体に、共有結合によってBSA-NHSスライドを結合させることができる。BSAの分子層のガラススライドへの第1の結合およびN,N'-ジスクシニミジルカーボネートでのBSA活性化によってBSA-NHSスライドを組み立てる。結果として、BSA上のリジン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸残基のアミノ酸残基が活性化され、尿素またはアミドがスライドにスポットしたタンパク質サンプルと共有結合を形成することができる。MacBeath and Schreiber、Science、289、1760～1763、2000を参照のこと。

20

30

【0095】

本発明のタンパク質マイクロチップの有用な調製方法の別の例は、PCT公開番号WO00/4389A2およびWO00/04382（共にZymyxに譲渡されており、引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に開示の方法である。第1に、基質またはチップベースを薄い有機フィルムの1つまたは複数の層で覆って、任意の表面の血管を排除し、ベース材料からタンパク質を隔離し、均一なタンパク質アレイを確保する。次に、複数のタンパク質捕捉剤（例えば、抗体、ペプチドなど）を配列し、薄いフィルムで覆ったベースに結合させる。次いで、タンパク質またはタンパク質複合体を捕捉剤に結合させてタンパク質マイクロアレイを形成することができる。タンパク質マイクロチップを、水溶液を含むフローチャンバー中で保持する。

40

【0096】

本発明のタンパク質マイクロアレイを、Packard Bioscience Companyに譲渡されたPCT公開番号WO99/36576（引用することにより本明細

50

書の一部をなすものとする)で開示の方法によって作製することもできる。例えば、三次元親水性ポリマーマトリクス(すなわち、ゲル)を、最初にガラススライドなどの個体基質上の配置する。ポリマーマトリクスゲルは、伸縮し、アミン基と反応するカップリング試薬を含む。従って、タンパク質およびタンパク質複合体を、膨張させた水性で多孔質状態のマトリクスゲルと接触させて、カップリング剤によりタンパク質またはタンパク質複合体上のアミン基を反応させて基質上にタンパク質およびタンパク質複合体を固定することができる。その後、ゲルをマトリクスゲル中に浸漬した結合タンパク質およびタンパク質複合体に接触させる。

【0097】

あるいは、本発明のタンパク質およびタンパク質複合体を、市販のタンパク質マイクロチップ(例えばCIPHERGEN Biosystems Inc., Palo Alto, CAのProteinChipシステム)に組み込むことができる。ProteinChipシステムは、タンパク質と相互作用する処理表面を有する金属チップを含む。基本的には、金属チップ表面が、二酸化ケイ素フィルムで覆われている。タンパク質およびタンパク質複合体などの目的の分子を、シランカップリング剤を介してチップ表面に共有結合することができる。

【0098】

本発明のタンパク質マイクロチップを、例えば、米国特許第6,087,102号、米国特許第6,139,831号、米国特許第6,087,103号、PCT公開番号WO99/60156、WO99/39210、WO00/54046、WO00/53625、WO99/51773、WO99/35289、WO97/42507、WO01/01142、WO00/63694、WO00/61806、WO99/61148、WO99/40434(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に開示の当分野で公知の他の方法を使用して調製することもできる。

【0099】

3. 抗体

本発明の別の態様によれば、本発明のタンパク質複合体に対して免疫反応性を示す抗体が得られる。1つの実施形態では、抗体は、本発明のタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す。詳細には、本明細書中で使用される、句「タンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す」は、本発明の抗体のタンパク質複合体との免疫反応性は、実質的にタンパク質複合体の各相互作用メンバーよりも高く、その結果タンパク質複合体への抗体の結合を、結合親和性の強度に基づいてタンパク質の各相互作用メンバーへの抗体の結合と容易に区別することができることを意味する。好ましくは、結合定数は、少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも5倍、さらにより好ましくは少なくとも10倍、最も好ましくは少なくとも100倍異なる。特定の実施形態では、抗体は、タンパク質複合体の相互作用タンパク質メンバーに実質的に免疫反応性を示さない。

【0100】

本発明の抗体を、当分野で一般に公知の手順を使用して容易に調製することができる。例えば、Harlow and Lane、「抗体：実験マニュアル」、Cold Spring Harbor Press、1988を参照のこと。典型的には、作製された抗体が免疫反応性を示すタンパク質複合体を、宿主動物における免疫応答の誘導のための抗原として使用する。1つの実施形態では、使用したタンパク質複合体は、天然のタンパク質からなる。好ましくは、タンパク質複合体には、Tsg101およびHIV GAgp6の結合ドメインのみをそれぞれ含む。結果として、全抗体のより大きな部分がタンパク質複合体に選択的に免疫反応を示すことができる。結合ドメインを、例えば、表1でまとめたものから選択することができる。さらに、エピトープ予測のための当分野で公知の種々の技術を使用して、本発明のタンパク質複合体中での相互作用タンパク質メンバーに基づいて、タンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体が作製される可能性が増加するように抗原ペプチドを設計することもできる。適切なエピトープ予測コンピュータプログラムには、例えば、International Biotechnologies, 50

Inc. の Mac Vector および DNA Star の Protean が含まれる。

【0101】

特定の実施形態では、上記セクション2のハイブリッドタンパク質を、ペプチド結合またはペプチドリンカーによって HIV GAG もしくは HIV GAG p6 またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントに共有結合した Ts g 101 またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントを有する抗原として使用する。好ましい実施形態では、ハイブリッドタンパク質は、ペプチド結合またはリンカー分子によって互いに共有結合した表1から選択した2つの相互作用結合ドメインまたはそのホモログもしくは誘導体からなる。

【0102】

本発明の抗体は、本発明のタンパク質複合体に対するポリクローナル抗体であり得る。ポリクローナル抗体を産生するために、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、モルモット、およびハムスターなどの種々の動物宿主を使用することができる。上記の本発明のタンパク質複合体またはその誘導体である適切な抗原を、免疫反応を惹起するために宿主動物に直接投与することができる。あるいは、抗原を、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、ウシ血清アルブミン (B S A)、オボアルブミン、および破傷風トキソイドなどのキャリアと共に投与することができる。任意選択的に、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、および M B S などのカップリング剤によって抗原をキャリアに結合させることができる。従来のアジュバントを使用して、タンパク質複合体抗原に対する宿主動物の免疫応答を増強することができる。当分野で公知の適切なアジュバントには、フロイント完全アジュバント (死滅させた細菌細胞および鉱物油を含む)、フロイント不完全アジュバント (細胞成分を欠く)、アルミニウム塩、Biocine の M F 59、モノリン脂質、合成トレハロースジコリノミコレート (T D M) および細胞壁骨格 (C W S) (共に R I B I I m m u n o C h e m R e s e a r c h I n c . , H a m i l t o n , M T)、Proteus International PLC、Cheshire、U. K. の非イオン性界面活性剤小胞 (N I S V)、およびサポニンが含まれるが、これらに限定されない。抗原調製物を、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、腹腔内注射、またはリンパ器官への注射によって宿主動物に投与することができる。

【0103】

本発明の抗体はまた、モノクローナルであり得る。このようなモノクローナル抗体を、当分野で公知の任意の従来技術を使用して開発することができる。例えば、Kohler and Milstein、Nature、256、495~497、1975に開示の一般的なハイブリドーマ法は、現在本発明で使用することができる十分に開発された技術である。米国特許第4,376,110号 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする)を参照のこと。本質的に、本発明のタンパク質複合体に対してポリクローナル抗体を産生するBリンパ球を骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマクローンのライブラリーを作製することができる。次いで、ハイブリドーマ集団を、抗原結合特異性および免疫グロブリンクラス (イソ型) についてスクリーニングする。この様式では、特定の均一な抗体を産生する純粋なハイブリドーマクローンを選択することができる。一般に、Harlow and Lane、「抗体：実験マニュアル」、Cold Spring Harbor Press、1988を参照のこと。あるいは、当分野で公知の他の技術 (E B V ハイブリドーマ技術、ヒトN細胞ハイブリドーマ技術、およびトリオーマ技術が含まれるが、これらに限定されない) を使用して、モノクローナル抗体を調製することもできる。

【0104】

さらに、本発明のタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を、組換えによって産生することもできる。例えば、PCR増幅によって活性化Bリンパ球またはハイブリドーマから調製したcDNAを、発現ベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを形成し、その後組換え発現のために宿主細胞に移入する。次いで、特定の所望のタンパク質をコードするcDNAを、ライブラリーから単離することができる。タンパク質発現の

10

20

30

40

50

ために、単離された cDNA を適切な宿主細胞に移入することができる。したがって、組換え技術を使用して、特定の天然抗体、一以上の抗原と同時に反応することができるハイブリッド抗体、キメラ抗体（例えば、定常領域および可変領域が異なる供給源に由来する）、第3の（重）鎖のFc領域に結合した1つの重鎖および軽鎖の対を含む一価抗体、Fabタンパク質などを産生することができる。米国特許第4,816,567号；欧州特許出願番号0088994号；Munro, Nature, 312, 597, 1984；Morrisson, Science, 229, 1202, 1985；Oira, Biotechniques, 4, 214, 1986；およびWoodら、Nature, 314, 446~449, 1985（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）を参照のこと。Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント(scFv)、Fab'フラグメント、およびF(ab')₂フラグメントなどの抗体フラグメントを、例えば、米国特許第4,946,778号、Skerra & Plueckthum, Science, 240, 1038~1041, 1988；Betterら、Science, 240, 1041~1043, 1988；およびBirdら、Science, 242, 423~426, 1988（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に開示の方法による組換えによって産生することもできる。

10

【0105】

好ましい実施形態では、本は明によって得られた抗体は、部分的にまたは完全にヒト化された抗体である。この目的のために、当分野で公知の任意の方法を使用することができる。例えば、腫瘍特異的マウスモノクローナル抗体に由来するV領域を有するがヒトC領域を含まない部分的にヒト化されたキメラ抗体が、Morrisson and Oi, Adv. Immunol., 44, 65~92, 1989で開示されている。さらに、トランスジェニック非ヒト動物を使用して、十分にヒト化された抗体を作製することができる。例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子を抑制または欠失し、ゲノムに組換えによって移入された外因性免疫グロブリン遺伝子、好ましくはヒト免疫グロブリン遺伝子によって異種抗体全体をコードする、トランスジェニックマウスなどのトランスジェニック非ヒト動物を産生することができる。例えば、米国特許第5,530,101号；米国特許第5,545,806号；米国特許第6,075,181号；PCT出願番号WO94/02602；Greenら、Nat. Genetics, 7, 13~21, 1994；およびLonbergら、Nature, 368, 856~859, 1994（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）を参照のこと。トランスジェニック非ヒト宿主動物を、特定の免疫応答を惹起するために本発明のタンパク質複合体または1つまたは複数の相互作用タンパク質メンバーなどの適切な抗原で免疫化して、ヒト化抗体を産生することができる。さらに、特定のヒト化抗体を産生する細胞株はまた、免疫化トランスジェニック非ヒト動物に由来し得る。例えば、ヒト化抗体を産生するトランスジェニック動物から得た成熟Bリンパ球を骨髄腫細胞に融合し、得られたハイブリドーマクローンを、所望の結合親和性を有する特定のヒト化抗体について選択することができる。あるいは、cDNAを成熟Bリンパ球から抽出し、所望の結合親和性を有するヒト化抗体をコードするクローンをスクリーニングするライブラリーの確立で使用することができる。

20

30

【0106】

さらに別の実施形態では、2つの異なる抗原結合部位（それぞれ本発明のタンパク質複合体中の異なる相互作用タンパク質メンバーに特異的である）を有する二機能性抗体が得られる。当分野で公知の種々の方法を使用して、二機能性抗体を産生することができる。例えば、2つの異なるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを互いに融合することができる。2つのハイブリドーマのうちの一つは、本発明のタンパク質複合体の相互作用タンパク質メンバーに特異的なモノクローナル抗体を産生することができ、他方のハイブリドーマはタンパク質複合体の別の相互作用タンパク質メンバーに免疫反応性を示すモノクローナル抗体を作製する。このようにして形成された新規のハイブリドーマは、所望の二機能性抗体（すなわち、相互作用タンパク質メンバーの両方に免疫反応性を示す抗体）を含む異なる抗体を産生する。二機能性抗体を容易に精製することができる。Milstein

40

50

and Cuello、Nature、305、537~540、1983を参照のこと。

【0107】

あるいは、2つの異なるモノクローナル抗体（それぞれタンパク質複合体の異なる相互作用タンパク質メンバーに免疫反応性を示す）を化学結合するためのヘテロ二機能性架橋剤を使用して二機能性抗体を産生することもできる。したがって、凝集体が、タンパク質複合体の2つの相互作用タンパク質メンバーに結合する。Staerzら、Nature、314、628~631、1985；Perezら、Nature、316、354~356、1985を参照のこと。

【0108】

さらに、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ中の軽鎖および重鎖遺伝子の組換え発現によって、二機能性抗体を産生することもできる。結果として、二機能性抗体を含む抗体混合物が産生される。DeMonteら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A、87、2941~2945、1990；Lenz and Weidle、Gene、87、213~218、1990を参照のこと。

【0109】

好ましくは、米国特許第5,582,996号（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に開示の方法によって本発明の二官能性抗体を産生する。例えば、2つの異なるFabを得ることができ、これらを混合する。第1のFabはタンパク質複合体の相互作用タンパク質メンバーに結合することができ、Fab中に天然に存在しないが第2の相補ドメインに結合することができる第1の相補ドメインを有する重鎖定常領域を有する。第2のFabは、タンパク質複合体の別の相互作用タンパク質メンバーに結合することができ、Fab中に天然に存在しないが、第1の相補ドメインに結合することができる第2の相補ドメインを含む重鎖定常領域を有する。2つの各相補ドメインは、他のドメインに安定に結合することができるが、これら自体と結合しない。例えば、c-fosおよびc-jun癌遺伝子のロイシンジッパー領域を、第1および第2の相補ドメインとして使用することができる。結果として、第1および第2の相補ドメインが互いに相互作用してロイシンジッパーを形成し、それにより2つの異なるFabが2つの抗原部位に結合することができる1つの抗原構築物に結合する。

【0110】

二機能性抗体の産生のための当分野で公知の他の適切な方法（Holligerら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A、90、6444~6448、1993；deKruifら、J.Biool.Chem.、271、7630~7634、1996；Coloma and Morrison、Nat.Biotechnol.、15、159~163、1997；Mullerら、FEBS Lett.、422、259~264、1998；およびMullerら、FEBS Lett.、432、45~49、1998（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に開示の方法が含まれる）を使用することもできる。

【0111】

4.スクリーニングアッセイ

本発明のタンパク質複合体（Tsg101およびHIV GAGまたはHIV GAGp6）をスクリーニングアッセイで使用して、Tsg101、HIV GAGp6、および本発明のタンパク質複合体のモジュレーターを選択することができる。さらに、Tsg101、HIV GAG、HIV GAGp6nホモログ、誘導体、およびフラグメントならびにこのようなホモログ、誘導体、およびフラグメントを含むタンパク質複合体を、スクリーニングアッセイで使用することもできる。本明細書中で使用される、用語「モジュレーター」は、タンパク質またはタンパク質複合体の性質、生物活性、または機能が変化した（例えば、生物活性の増減、安定性の増減、一定の他の生体分子に対する親和性または特異性の変化など）任意の形態を得ることができる任意の化合物を含む。さらに、本明細書中で使用される、用語「モジュレーター」もまた、Tsg101、HIV GAGp

10

20

30

40

50

6、および/または本発明のタンパク質複合体に単純に結合する任意の化合物を含む。例えば、モジュレーターは、T s g 1 0 1またはそのホモログもしくは誘導体とH I V G A G p 6またはそのホモログもしくは誘導体との間のタンパク質 - タンパク質相互作用を妨害するか、破壊するか、解離することができる相互作用アンタゴニストであってもよい。

【0112】

同様に、H I V G A GまたはH I V G A G p 6の代わりに、P (T / S) A P後期ドメインモチーフまたはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントを含む他のレトロウイルスG A Gポリペプチドをスクリーニングアッセイに使用することもできる。言い換えれば、本発明（例えばセクション2.に記載）によって得られたタンパク質複合体の任意の相互作用メンバーを、スクリーニングアッセイに使用することができる。

10

【0113】

本明細書中で使用される、用語「相互作用アンタゴニスト」は、タンパク質 - タンパク質相互作用を妨害、遮断、破壊、または不安定化し、タンパク質複合体形成を遮断または妨害し、または既存のタンパク質複合体を不安定化、破壊、または解離する化合物を意味する。

【0114】

本明細書中で使用される、用語「相互作用アゴニスト」は、タンパク質 - タンパク質相互作用の形成を開始するか、拡大するか、凝集するか、増強し、タンパク質複合体形成を誘発、開始、拡大、凝集するか、増強し、または既存のタンパク質複合体を安定化する化合物を意味する。

20

【0115】

従って、本発明は、T s g 1 0 1、またはH I V G A G p 6、その変異形態またはT s g 1 0 1またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントとH I V G A GもしくはH I V G A G p 6またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントとの間に形成されたタンパク質複合体のモジュレーターを選択するためのスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング法に適切な標的には、セクション2.に記載の本発明のタンパク質複合体の任意の実施形態を含み得る。好ましくは、タンパク質複合体の形成でタンパク質フラグメントを使用する。例えば、好ましい標的タンパク質複合体には、U E Vドメインを含むT s g 1 0 1タンパク質フラグメントを含み得る。また、例えば、H I V G A G p 6またはそのフラグメントを、標的タンパク質複合体の形成に使用することができる。特定の実施形態では、H I V G A G p 6の第1の14アミノ酸を、標的タンパク質複合体形成で使用する。別の実施形態では、検出可能なエピトープタグがT s g 1 0 1タンパク質またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントならびに/またはH I V G A G p 6ポリペプチドまたはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントに融合された融合タンパク質を使用する。このようなエピトープタグの適切な例には、例えば、インフルエンザウイルス血球凝集素（H A）、サルウイルス5（V 5）、ポリヒスチジン（6 x H i s）、c - m y c、l a c Z、およびG S Tなどに由来する配列が含まれる。

30

【0116】

T s g 1 0 1タンパク質またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントを本発明のスクリーニング法での標的タンパク質として使用する場合、T s g 1 0 1タンパク質またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメント中にT s g 1 0 1 U E Vドメインが含まれることが好ましい。T s g 1 0 1タンパク質またはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントを、例えばインフルエンザウイルス血球凝集素（H A）、サルウイルス5（V 5）、ポリヒスチジン（6 x H i s）、c - m y c、l a c Z、およびG S Tなどに由来する配列などの検出可能なタグに融合させることが好ましい。これに関して、T s g 1 0 1タンパク質、好ましくはT s g 1 0 1タンパク質のU E Vドメインに結合することができる方法によって選択された化合物を、T s g 1 0 1とH I V G A G p 6との間の相互作用を阻害または妨害する能力について試験することができる。化合物のH I Vウイルス出芽またはH I V増殖を阻害する能力も試験することができる。このような試験のため

40

50

の適切な方法は、本発明を開示された当業者には明らかなはずである。

【0117】

本発明のスクリーニング法によって選択されたモジュレーターは、T s g 1 0 1、H I V G A G、H I V G A G p 6、P (T / S) A Pモチーフを含む他のレトロウイルスG A Gポリペプチド、または本発明のタンパク質複合体の機能または活性の調整で有効であり得る。例えば、タンパク質複合体に結合することができる化合物は、タンパク質複合体の機能を調整することができる。さらに、タンパク質複合体の相互作用タンパク質メンバーの間のタンパク質-タンパク質相互作用を妨害するか、弱めるか、解離するか、破壊するか、あるいは開始するか、促進するか、安定化する化合物もまた、タンパク質複合体の機能または活性の調整で有効であり得る。したがって、本発明のスクリーニング法で同定された化合物から、タンパク質複合体、T s g 1 0 1、H I V G A G、H I V G A G p 6、または他のレトロウイルスG A Gポリペプチドに起因するか関連する疾患、障害、または症状を予防または改善するための治療または予防に有効な薬物を産生することができる。あるいは、化合物を、本発明のタンパク質複合体またはその相互作用メンバーに起因するか関連する疾患、障害、または症状のための治療または予防に有効な化合物の設計および同定を補助するためにリードとして使用することができる。本発明のタンパク質複合体および/またはその相互作用タンパク質メンバーを、任意の種々の薬物スクリーニング技術で使用することができる。薬物スクリーニングを本明細書中に記載のように行うか、周知の技術(米国特許第5,800,998号および米国特許第5,891,628号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に記載の技術など)を使用して行うことができる。

【0118】

4.1. 試験化合物

本発明のスクリーニングアッセイで任意の試験化合物をスクリーニングして、本発明のT s g 1 0 1含有タンパク質複合体またはその相互作用メンバーを選択することができる。用語モジュレーターの「選択」または「選択する」は、(a)本発明のT s g 1 0 1含有タンパク質複合体および/またはその相互作用メンバーのモジュレーターであることが以前に知られていない群からの化合物の選択、および(b)本発明のT s g 1 0 1含有タンパク質複合体および/またはその相互作用メンバーに結合するか、機能および活性を調整することができることが公知の化合物の試験の両方を含むことを意図する。両化合物型を、本明細書中で一般に、「試験化合物」という。試験化合物には、例として、タンパク質(例えば、抗体、小ペプチド、人工または天然タンパク質)、核酸、ならびにその誘導體、模倣物、および類似体、10,000ダルトン以下、より好ましくは5,000未満の分子量の有機小分子が含まれる。好ましくは、当分野で公知のライブラリー形式(例えば、化学合成ライブラリー、組換え発現ライブラリー(例えば、ファージディスプレイライブラリー)、およびインビトロ翻訳ベースのライブラリー(例えば、リボゾームディスプレイライブラリー))で試験化合物が得られる。

【0119】

例えば、本明細書のセクション3.に記載の抗体産生プロセスで本発明のスクリーニングアッセイを使用して、所望の特異性を有する抗体を選択することができる。種々の抗体または誘導體形態(ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二機能性抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント(s c F v)、F a b 'フラグメント、およびF (a b ')₂フラグメントなどの抗体フラグメント、ならびに触媒抗体、毒素または薬物に結合した抗体などの種々の修飾形態が含まれるが、これらに限定されない)をスクリーニングすることができる。抗体は、I g G、I g E、I g A、またはI g Mなどの任意の形態であり得る。ヒト化抗体が特に好ましい。好ましくは、大規模ハイスループットスクリーニングが可能なライブラリーで種々の抗体および抗体フラグメントを得ることができる。例えば、抗体または抗体フラグメントを発現する発現ライブラリーを、例えば、H u s e r a、S c i e n c e、246、1275~1281、1989(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に開示の方法によって構築するこ

とができる。一本鎖 Fv (s c F v) 抗体は、診断および治療への適用において特に興味深い。抗体ライブラリーの製造方法もまた、米国特許第 6 , 0 9 6 , 5 5 1 号、米国特許第 5 , 8 4 4 , 0 9 3 号、5 , 8 3 7 , 4 6 0 号、米国特許第 5 , 7 8 9 , 2 0 8 号、および米国特許第 5 , 6 6 7 , 9 8 8 号 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) で得られる。

【 0 1 2 0 】

ペプチド試験化合物は、Lアミノ酸および/またはDアミノ酸、リンペプチド、および他のペプチド型を有するペプチドであり得る。スクリーニングされたペプチドは、任意のサイズであり得るが、好ましくは約 5 0 アミノ酸未満である。ペプチドが小さいほど患者の体内への送達が容易である。種々の修飾ペプチド形態をスクリーニングすることができる。抗体と同様に、ペプチドも例えば組み合わせライブラリーで得ることができる。一般に、Gallopら、J. Med. Chem. , 3 7 , 1 2 3 3 ~ 1 2 5 1 , 1 9 9 4 を参照のこと。無作為なペプチドライブラリーの製造方法は、例えば、Devlinら、Science、2 4 9 , 4 0 4 ~ 4 0 6 , 1 9 9 0 に開示されている。ペプチドライブラリーの構築およびライブラリーからのペプチドのスクリーニングのための他の適切な方法は、例えば、Scott and Smith, Science, 2 4 9 , 3 8 6 ~ 3 9 0 , 1 9 9 0 ; Moranら、J. Am. Chem. Soc. , 1 1 7 , 1 0 7 8 7 ~ 1 0 7 8 8 , 1 9 9 5 (電氣的にタグ化した合成ペプチドのライブラリー) ; Stachelhausら、Science、2 6 9 , 6 9 ~ 7 2 , 1 9 9 5 ; 米国特許第 6 , 1 5 6 , 5 1 1 号、米国特許第 6 , 1 0 7 , 0 5 9 号、米国特許第 6 , 1 0 5 , 5 6 1 号、米国特許第 5 , 7 5 0 , 3 4 4 号、米国特許第 5 , 8 3 4 , 3 1 8 号、米国特許第 5 , 7 5 0 , 3 4 4 号 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に開示されている。例えば、大腸菌繊維状ファージの第 I I I 遺伝子または第 V I I I 遺伝子への合成オリゴヌクレオチドのクローニングによって無作為配列ペプチドファージディスプレイライブラリーを作製することができる。このようにして作製したファージは、大腸菌中で増殖し、ファージ表面上で融合タンパク質としてオリゴヌクレオチドによってコードされるペプチドを発現することができる。Scott and Smith, Science, 2 4 9 , 3 6 8 ~ 3 9 0 , 1 9 9 0 。あるいは、「プラスミド上のペプチド」法を使用してペプチドライブラリーを形成することもできる。この方法では、組換え技術によって無作為ペプチドを大腸菌の C 末端に融合し、Lacリプレッサー結合部位も含むプラスミドから発現することができる。結果として、ペプチド融合物は、それをコードする同一のプラスミドに結合する。

【 0 1 2 1 】

5 , 0 0 0 ダルトン未満の分子量の小有機または無機非ペプチドまたは非ヌクレオチド化合物が、本発明のスクリーニングアッセイ用の好ましい試験化合物である。これらは、ライブラリー形式でも得ることができる。一般に、Gordanら、J. Med. Chem. , 3 7 , 1 3 8 5 ~ 1 4 0 1 , 1 9 9 4 を参照のこと。例えば、Bunin and Ellman、J. Am. Chem. Soc. , 1 1 4 , 1 0 9 9 7 ~ 1 0 9 9 8 , 1 9 9 2 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) でベンゾジアゼピンライブラリーが得られている。ペプチドライブラリーの構築およびスクリーニング法は、Simonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、8 9 , 9 3 6 7 ~ 9 3 7 1 , 1 9 9 2 に開示されている。ライブラリー形式での新規のポリケチドの生合成方法は、McDanielら、Science、2 6 2 , 1 5 4 6 ~ 1 5 5 0 , 1 9 9 3 および Kaoら、Science、2 6 5 , 5 0 9 ~ 5 1 2 , 1 9 9 4 に記載されている。小有機分子の種々のライブラリーおよびその構築方法は、米国特許第 6 , 1 6 2 , 9 2 6 号 (多置換フラレン誘導体) ; 米国特許第 6 , 0 9 3 , 7 9 8 号 (ヒドロキサム酸誘導体) ; 米国特許第 5 , 9 6 2 , 3 3 7 号 (コンピナトリアル 1 , 4 - ベンゾジアゼピン - 2 , 5 - ジオンライブラリー) ; 米国特許第 5 , 8 7 7 , 2 7 8 号 (N 置換オリゴマーの合成) ; 米国特許第 5 , 8 6 6 , 3 4 1 号 (組成物および薬物ライブラリーのスクリーニング法) ; 米国特許第 5 , 7 9 2 , 8 2 1 号 (重合可能なシクロデキストリン誘導体) ; 米国特

10

20

30

40

50

許第5,766,963号(ヒドロキシプロピルアミンライブラリー);および米国特許第5,698,685号(モルホリノサブユニットコンビナトリアルライブラリー)(その全てが引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に開示されている。

【0122】

オリゴヌクレオチドならびにペプチド核酸(PNA)、その類似体および誘導体などの他の化合物をスクリーニングして臨床的に有用な化合物を選択することもできる。オリゴ類の組み合わせライブラリーもまた、当分野で公知である。Goldら、J. Biol. Chem., 270, 13581~13584, 1995を参照のこと。

【0123】

4.2. インビボスクリーニングアッセイ

試験化合物をインビトロアッセイでスクリーニングして本発明のタンパク質複合体またはその相互作用タンパク質メンバーに結合することができる化合物を選択することができる。この目的のために、試験化合物と標的化合物との間に特定の相互作用が生じ、それにより化合物が複合体を形成する標的に結合する条件および十分な時間、試験化合物をタンパク質複合体またはその相互作用タンパク質メンバーに接触させる。その後、結合事象を検出する。

【0124】

当分野で公知の種々のスクリーニング技術を、本発明で使用することができる。タンパク質複合体およびその相互作用タンパク質メンバーを、任意の適切な方法(例えば、組換え発現および精製)によって調製することができる。タンパク質複合体および/またはその相互作用タンパク質メンバー(このセクションでは、以後、これらを共に「標的」という)は、溶液または細胞抽出物中に含まれない。試験化合物を標的と混合して液体混合物を形成することができる。化合物を、検出可能なマーカーで標識することができる。安定な条件下での混合の際、化合物および標的を含む結合複合体を免役共沈し、洗浄することができる。沈殿した複合体中の化合物を、化合物に対するマーカーに基づいて検出することができる。

【0125】

好ましい実施形態では、標的を固体支持体または細胞表面に固定する。好ましくは、セクション2.に記載の方法で、標的をタンパク質マイクロチップに整列させることができる。例えば、標的を、ガラススライドなどのマイクロチップ基質または非中和抗体(すなわち、標的に結合することができるが、生物活性に実質的に影響を与えない抗体)を使用したマルチウェルプレートに直接固定することができる。スクリーニングを実施するために、試験化合物を、固定化標的と接触させて標準的な結合アッセイ条件で複合体を形成するように結合させることができる。周知の標識技術を使用して、標的または試験化合物のいずれかを検出可能なマーカーで標識する。例えば、米国特許第5,741,713号は、NMR活性同位体で標識した生化学的化合物の組み合わせライブラリーを開示している。結合化合物を選択するために、標的-試験化合物複合体の形成またはその形成速度を測定することができる。有機非ペプチド非核酸化合物の組み合わせライブラリーをスクリーニングする場合、標識またはコード化(または「タグ化」)組み合わせライブラリーを使用して、リード構造を迅速に解読することができることが好ましい。生物学的ライブラリーと異なる、化学的ライブラリーで見出された各化合物を自己複製によって増幅することができないので、これは特に重要である。タグ化組み合わせライブラリーは、例えば、Borchardt and Still, J. Am. Chem. Soc., 116, 373~374, 1994およびMoranら, J. Am. Chem. Soc., 117, 10787~10788, 1995(共に引用することにより本明細書の一部をなすものとする)で得られる。

【0126】

あるいは、試験化合物を固体支持体上に固定して、例えば試験化合物のマイクロアレイを形成することができる。次いで、標的タンパク質またはタンパク質複合体を、試験化合物に接触させる。標的を、任意の適切な検出マーカーで標識することができる。例えば、結

10

20

30

40

50

合反応が起こる前に、標的を放射性同位体または蛍光マーカで標識することができる。あるいは、結合反応後、標的に免疫反応性を示し、放射性物質、蛍光マーカ、酵素、または標識二次抗Ig抗体で標識された抗体を使用して、任意の結合した標的を検出し、それにより結合化合物を選択することができる。この実施形態の1つの例は、タンパク質探索法である。すなわち、本発明によって得られた標的をプローブとして使用して、タンパク質または無作為ペプチドの発現ライブラリーをスクリーニングする。発現ライブラリーは、ファージディスプレイライブラリー、インビトロ翻訳ベースのライブラリー、または通常の発現cDNAライブラリーであり得る。ライブラリーを、ニトロセルロースフィルターなどの固体支持体上に固定することができる。例えば、Sikelia and Hahn、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84、3038~3042、1987を参照のこと。放射性同位体または蛍光マーカによってプローブを標識することができる。あるいは、プローブをビオチン化して、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ結合体で検出することができる。より好都合には、結合したプローブを、抗体で検出することができる。

10

20

30

40

50

【0127】

さらに別の実施形態では、標的に結合することができる既知のリガンドを、競合結合アッセイで使用することができる。既知のリガンドと標的との間の複合体を形成し、試験化合物と接触させることができる。試験化合物の標的と既知のリガンドとの間の相互作用を妨害する能力を測定する。リガンドの1つの例は、標的に特異的に結合することができる抗体である。特に、このような抗体は、標的複合体またはその相互作用タンパク質メンバーの1つまたは複数の抗原決定基を共有するペプチドの同定で特に有用である。

【0128】

特定の実施形態では、スクリーニングアッセイで使用されるタンパク質複合体には、2つの相互作用タンパク質メンバーまたはそのフラグメントもしくはドメインの融合によって形成される、セクション2に記載のハイブリッドタンパク質が含まれる。ハイブリッドタンパク質はまた、これに融合した検出可能なエピトープタグを含むように設計することもできる。このようなエピトープタグの適切な例には、例えば、インフルエンザウイルス血球凝集素(HA)、サルウイルス5(V5)、ポリヒスチジン(6xHis)、c-myc、lacZ、およびGSTなどに由来する配列が含まれる。

【0129】

試験化合物をインビトロアッセイでスクリーニングして本発明によって同定されたタンパク質複合体の相互作用アンタゴニストを選択することもできる。したがって、Tsg101-HIV GAGp6タンパク質複合体を試験化合物と接触させて、タンパク質複合体の破壊または不安定化を検出することができる。

【0130】

上記の結合アッセイと類似の様式でアッセイを行うことができる。例えば、特定のタンパク質複合体の有無を、タンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体によって検出することができる。したがって、タンパク質複合体の試験化合物とのインキュベーション後、抗体を使用して免役沈降アッセイを行うことができる。試験化合物がタンパク質複合体を破壊する場合、このアッセイにおける免役沈降タンパク質複合体の量は、同一のタンパク質複合体を試験化合物に接触させないコントロールアッセイにおける量よりも有意に少ない。本発明を開示された当業者に明らかであるように、種々の他の検出法が解離アッセイで有用であり得る。1つの実施形態では、融合する検出可能なマーカを含む相互作用パートナーの1つを、固体支持体に固定する。例えば、GST-GAGp6融合タンパク質を、固体支持体に結合させる。次いで、融合する検出可能なマーカを有する他の相互作用パートナー(例えば、UEVドメインを含むmycタグ化Tsg101フラグメント)を1つまたは複数の試験化合物の存在下で固定した第1の相互作用パートナーに接触させる。2つの相互作用パートナーが結合する場合、mycタグ化Tsg101フラグメントも固定され、反応混合物を洗浄して非結合mycタグ化Tsg101フラグメントを除去した後に抗myc抗体を使用して検出することができる。

【0131】

4.3. インビボスクリーニングアッセイ

任意のインビボアッセイで試験化合物を使用して、本発明のタンパク質複合体または相互作用タンパク質メンバーのモジュレーターを選択することもできる。例えば、本発明のタンパク質複合体の安定性を増強または妨害することができる化合物の選択に有用な当分野で公知の任意のインビボアッセイを使用することができる。

【0132】

4.3.1.2 ハイブリッドアッセイ

好ましい実施形態では、酵母2ハイブリッドシステムまたはその類似体もしくは派生系の1つを使用する。当分野で公知の適切な2ハイブリッドシステムの例には、米国特許第5,283,173号；米国特許第5,525,490号、米国特許第5,585,245号、米国特許第5,637,463号、米国特許第5,695,941号、米国特許第5,733,726号、米国特許第5,776,689号、米国特許第5,885,779号、米国特許第5,905,025号、米国特許第6,037,136号、米国特許第6,057,101号、米国特許第6,114,111号、および Bartel and Fields 編、「酵母2ハイブリッドシステム」、Oxford University Press、New York、NY、1997（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0133】

典型的には、古典的な転写ベースの2ハイブリッドシステムでは、2つの融合タンパク質（一方は本発明のタンパク質複合体の相互作用タンパク質メンバーまたは相互作用タンパク質メンバーの相互作用ドメインに融合した転写活性化ドメインを含み、他方の融合タンパク質はタンパク質複合体の別の相互作用タンパク質メンバーまたはその相互作用ドメインに融合したDNA結合ドメインを含む）をコードする2つのキメラ遺伝子を調製する。便宜上、2つの相互作用タンパク質メンバーまたはその相互作用ドメインをそれぞれ「ベイト（bait）融合タンパク質」および「プレイ（prey）融合タンパク質」と呼ぶ。融合タンパク質をコードするキメラ遺伝子を、それぞれ「ベイトキメラ遺伝子」および「プレイキメラ遺伝子」と呼ぶ。典型的には、それぞれベイトキメラ遺伝子およびプレイキメラ遺伝子の発現のために「ベイトベクター」および「プレイベクター」を得る。

20

【0134】

4.3.1.1. ベクター

転写ベースの2ハイブリッドアッセイでは多数のベクター型を使用することができる。ベイトベクターおよびプレイベクターの構築方法は、本発明を開示された当業者に明らかである。一般に、「現代の分子生物学プロトコール」、第2版、Ausubelら編、Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience、第13章、1988；Glover、「DNAクローニング」、第II巻、IRL Press、Wash., D.C., 第3章、1986；Bitterら、Methods in Enzymology、153、516～544、1987；「酵母サッカロミセスの分子生物学」、Strathernら編、Cold Spring Harbor Press、第I巻および第II巻、1982；およびRothstein、「DNAクローニング：実践アプローチ」、第11巻、DM Glover編、IRL Press、Wash., D.C., 1986を参照のこと。

30

40

【0135】

一般に、ベイトベクターおよびプレイベクターは、キメラ遺伝子の転写のためにキメラ遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを有する発現カセットを含む。ベクターはまた、宿主細胞中でのベクター複製のためのDNA複製起点、例えば、大腸菌でのベクター複製のための複製起点、およびベクターを保有する宿主細胞のみを選択および維持するための選択マーカーを含む。さらに、発現カセットは、好ましくは、キメラ遺伝子の発現を調節するように機能する誘導エレメントも含む。誘導性および調節可能なキメラ遺伝子発現の作製は、融合タンパク質またはその成分が宿主に対して有毒である事象で特に重要であ

50

る。転写エンハンサー配列および翻訳調節配列（例えば、シャイン・ダルカルノ配列）などの他の調節配列もまた、発現カセットに含むことができる。ウシ成長ホルモン、SV40、lacZ、およびAcMNPV多面体ポリアデニル化シグナルなどの終結配列を、発現カセット中のキメラ遺伝子に作動可能に連結させることもできる。融合タンパク質の検出および/または精製のためのエピトープタグコード配列を、発現カセット中のキメラ遺伝子に作動可能に連結させることもできる。有用なエピトープタグの例には、インフルエンザウイルス血球凝集素（HA）、サルウイルス5（V5）、ポリヒスチジン（6xHis）、c-myc、lacZ、およびGSTなどが含まれるが、これらに限定されない。ポリヒスチジntagを有するタンパク質を、Ni親和性カラムを使用して容易に検出および/または精製することができ、多数のエピトープタグに対する特異的抗体は、一般に市販されている。ベクターを、当分野で公知の任意の技術（例えば、直接的DNA形質転換、微量注入、電ポレーション、ウイルス感染、リポフェクション、および遺伝子銃など）によって宿主細胞に移入することができる。ベイトおよびプレイベクターを、染色体外状態（すなわち、自己複製プラスミドまたはウイルス）で宿主細胞中に維持することができる。あるいは、両ベクターのうちの1つを、安定な細胞株の選択または部位特異的組換えなどの従来技術によって宿主細胞の染色体に組み込むことができる。

10

【0136】

本発明のインピボアッセイを、多数の異なる宿主細胞（細菌、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞ならびに哺乳動物細胞が含まれるが、これらに限定されない）で行うことができる。当業者は、ベクター設計は、使用する宿主細胞によって変化し得ることを認識している。1つの実施形態では、大腸菌、サルモネラ菌、クレブシエラ菌、シュドモナス、カウロバクター、およびリゾビウムなどの原核細胞でアッセイを行う。本発明のこの実施形態で有用な発現ベクターの適切な複製起点には、例えば、ColE1、pSC101、およびM13複製起点が含まれる。適切なプロモーターの例には、例えば、T7プロモーターおよびlacZプロモーターなどが含まれる。さらに、キメラ遺伝子発現の調整に誘導性プロモーターも有用である。例えば、バクテリオファージplac5由来のlacオペロンは、当分野で周知であり、成長培地へのIPTGの添加によって誘導可能である。細菌発現系で有用な他の公知のプロモーターには、バクテリオファージのpL、trpプロモーター、およびtacプロモーターなどのハイブリッドプロモーターなどが含まれる。

20

【0137】

さらに、所望の融合タンパク質を発現する細胞のみを選択および維持するための選択マーカー配列も発現ベクターに組み込むべきである。栄養要求性マーカーおよび抗生物質耐性マーカーを含む多数の選択マーカーが当分野で公知であり、これら全てが本発明の目的で有用であり得る。例えば、アンピシリン耐性を付与するbla遺伝子は、原核生物発現ベクターで最も一般的に使用されている選択マーカーである。他の適切なマーカーには、宿主細胞にネオマイシン、カナマイシン、またはハイグロマイシン耐性を付与する遺伝子が含まれる。実際、多数のベクターが、Invitrogen Corp (San Diego, Calif.)、Clontech Corp. (Palo Alto, Calif.)、BRL (Bethesda, Maryland)、およびPromega Corp. (Madison, Wisconsin)などの業者から市販されている。これらの市販の全ベクター（例えばpBR322、pSPORT、pBluescriptISK、pcDNA1、およびpcDNA1I）は、従来の組換え技術を使用して本発明のキメラ遺伝子を都合よく挿入することができるマルチクローニング部位を有する。構築した発現ベクターを、当分野で一般に公知の種々の形質転換またはトランスフェクション技術によって宿主細胞に移入することができる。

30

40

【0138】

別の実施形態では、哺乳動物細胞を、融合タンパク質の発現およびタンパク質-タンパク質相互作用の検出用の宿主細胞として使用する。この目的のために、実質的に任意の哺乳動物細胞（正常な組織細胞、安定な細胞株、および形質転換腫瘍細胞が含まれる）を使用することができる。都合よく、CHO細胞、Jurkat T細胞、NIH 3T3細胞、

50

HEK-293細胞、CV-1細胞、COS-1細胞、HeLa細胞、VERO細胞、MDC細胞、およびWI38細胞などの哺乳動物細胞株を使用する。哺乳動物発現ベクターは当分野で周知であり、多数が市販されている。哺乳動物細胞中でのキメラ遺伝子の転写に適切なプロモーターの例には、アデノウイルス、サルウイルス40(SV40)(例えば、SV40の初期および後期プロモーター)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、およびサイトメガロウイルス(CMV:例えば、CMV最初期プロモーター)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)(例えば、長末端反復(LTR))、ワクシニアウイルス(例えば、7.5Kプロモーター)、および単純ヘルペスウイルス(HSV)(例えば、チミジンキナーゼプロモーター)由来のウイルス転写プロモーターが含まれる。誘導性プロモーターを使用することもできる。適切な誘導性プロモーターには、例えば、テトラサイクリン応答性エレメント(TRE)(Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、8、5547~5551、1992を参照のこと)、メタロチオネインIIAプロモーター、エクジソン応答性プロモーター、および熱ショックプロモーターが含まれる。哺乳動物細胞中での発現ベクターの複製および維持のために適切な複製起点には、例えば、エプスタイン-バー核抗原の存在下でのエプスタイン-バー複製起点(Sugdenら、Mole. Cell. Biol.、5、410~413、1985を参照のこと)、およびSV40 T抗原の存在下でのSV40複製起点(COS-1およびCOS-7細胞中に存在する)(Margolskeら、Mole. Cell. Biol.、8、2837、1988を参照のこと)が含まれる。適切な選択マーカーには、ネオマイシン、ハイグロマイシン、およびゼオシンなどへの耐性を付与する遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。多数の市販の哺乳動物発現ベクター(例えば、pCEP4、pcDNA、pIND、pSecTag2、pVAX1、pcDNA3.1、およびpBI-EGFP、およびpDisplay)が本発明で有用であり得る。リン酸カルシウム沈殿、リポフェクチン、およびエレクトロポレーションなどの任意の公知の技術を使用して、ベクターを哺乳動物細胞に移入することができる。ベイトベクターおよびプレイベクターを、同一の細胞に同時形質転換するか、あるいは2つの異なる細胞に移入してその後細胞融合または他の適切な技術によって融合することができる。

【0139】

ウイルス感染によって組換え遺伝子を細胞に移入することができるウイルス発現ベクターを、融合タンパク質の発現に使用することもできる。ウイルス発現ベクターは当分野で一般に公知であり、これには、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、マウス肝細胞ウイルス(MSCV)、MGFウイルス、およびレトロウイルスを基本としたウイルスベクターが含まれる。Sarverら、Mol. Cell. Biol.、1、486、1981; Logan & Shenk、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81、3655~3659、1984; Mackettら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、79、7415~7419、1982; Mackettら、J. Virol.、49、857~864、1984; Panicalliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、79、4927~4931、1982; Cone & Mulligan、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81、6349~6353、1984; Mannら、Cell、33、153~159、1993; Pearら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90、8392~8396、1993; Kitamuraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92、9146~9150、1995; Kinsellaら、Human Gene Therapy、7、1405~1413、1996; Hofmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93、5185~5190、1996; Choateら、Human Gene Therapy、7、2247、1996; WO94/19478; Hawleyら、Gene Therapy、1、136、1994; およびRivereraら、Genetics、92、6733、1995(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)を参照のこと。

【0140】

一般に、ウイルスベクターを構築するために、本発明のキメラ遺伝子を適切なプロモーターに作動可能に連結することができる。次いで、プロモーター・キメラ遺伝子構築物を、ウイルスベクターの非必須領域、典型的には修飾ウイルスゲノムに挿入する。これにより、感染宿主細胞中でキメラ遺伝子によってコードされた融合タンパク質を発現することができる生存可能な組換えウイルスが得られる。組換えウイルスは、一旦宿主細胞中で得られると、典型的には、宿主細胞ゲノムに組み込まれる。しかし、組換えウシ乳頭腫ウイルスは、典型的には、染色体外エレメントとして複製および維持される。

【0141】

別の実施形態では、植物細胞系で本発明の検出アッセイを行う。植物細胞中での外因性タンパク質の発現方法は、当分野で周知である。一般に、Weissbach & Weissbach、「植物分子生物学」、Academic Press、NY、1988；Grierson & Corey、「植物分子生物学」、第2版、Blackie、London、1988を参照のこと。例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)またはタバコモザイクウイルス(TMV)に基づいた組換えウイルス発現ベクターの全てを使用することができる。あるいは、TiプラスミドベクターおよびRiプラスミドベクターなどの組換えプラスミド発現ベクターも有用である。本発明の融合タンパク質をコードするキメラ遺伝子を、発現ベクターに都合よくクローン化し、CaMVの35S RNAおよび19S RNAプロモーターもしくはTMVの外殻タンパク質プロモーターなどのウイルスプロモーターまたは植物プロモーター(例えば、RUBISCOの小サブユニットのプロモーターおよび熱ショックプロモーター(例えば、ダイズhsp17.5-Eまたはhsp17.3-Bプロモーター))の調節下に置く。

【0142】

さらに、バキュロウイルス発現系を使用して昆虫細胞(例えば、Spodoptera frugiperda細)中で本発明のインビボアッセイも行うことができる。この系で有用な発現ベクターおよび宿主細胞は、当分野で周知であり、一般に種々の業者から市販されている。例えば、本発明のキメラ遺伝子を、Autographa californica核多面体ウイルス(AcNPV)ベクターの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)に都合よくクローン化して、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の調節下に置くことができる。このようにして作製された非閉塞組換えウイルスを使用して、キメラ遺伝子を発現するSpodoptera frugiperda細胞などの宿主細胞に感染させることができる。米国特許第4,215,051号を参照のこと。

【0143】

本発明の好ましい実施形態では、サッカロミセス・セレビジエ、Hansenula polymorpha、Pichia pastoris、およびSchizosaccharomyces pombeなどの酵母を宿主として使用して、融合タンパク質を酵母発現系中で発現させる。酵母中での組換えタンパク質の発現は、十分に発展した分野であり、これに関して有用な技術は、「酵母サッカロミセスの分子生物学」、Strathernら編、第I巻および第II巻、Cold Spring Harbor Press、1982；Ausubelら、「現代の分子生物学プロトコール」、New York、Wiley、1994；およびGuthrie and Fink、「酵母遺伝学および分子生物学ガイド」、Methods in Enzymology、第194巻、1991(これら全てが本明細書中で参考として組み込まれる)に詳細に開示されている。Sudbery、Curr. Opin. Biotech., 7、517~524、1996は、当分野での種々の酵母種中での組換えタンパク質発現の成功を概説している(全内容および論文中に引用された参考文献は引用することにより本明細書の一部をなすものとする)。さらに、Bartel and Fields編、「酵母2ハイブリッドシステム」、Oxford University Press、New York、NY、1997は、種々の酵母2ハイブリッド系の文脈中で酵母中での融合タンパク質の組換え発現を広範に考察し、多数の関連する参考文献を引用している。これらおよび当分野で公知の

他の方法の全てを、本発明の目的に使用することができる。このような方法の本発明への適用は、本発明を開示された当業者に明らかなはずである。

【0144】

一般に、2つのキメラ遺伝子はそれぞれ異なる発現ベクターに含まれる(ベイトベクターおよびプレイベクター)。両ベクターを、1つの酵母宿主細胞に同時形質転換することができる。当業者に明かなように、1つのベクターから両方のキメラ遺伝子を発現することが可能である。好ましい実施形態では、ベイトベクターおよびプレイベクターを、反対の交配型(例えば、それぞれa型および型)の2つの半数体酵母細胞に移入する。2つの半数体細胞を、所望の時間交配して、両方のキメラ遺伝子を発現する二倍体細胞を形成することができる。

10

【0145】

一般に、酵母中での組換え発現用のベイトおよびプレイベクターは、酵母細胞中でのベクターの複製および維持のための2 μ 起点またはARSH4配列などの酵母複製起点を含む。好ましくは、ベクターはまた、細菌の複製起点(例えば、ColE1)および細菌の選択マーカー(例えば、amp^Rマーカー、すなわちbla遺伝子)を有する。任意選択的に、酵母細胞中でのベクター複製の調節のためのCEN6セントロメア配列を含む。酵母細胞中で遺伝子転写を駆動することができる任意の構成性または誘導性プロモーターを使用して、キメラ遺伝子発現を調節することができる。このようなプロモーターを、キメラ遺伝子に作動可能に連結させる。適切な構成性プロモーターの例には、酵母ADH1、PGK1、TEF2、GPD1、HIS3、およびCYC1プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。適切な誘導性プロモーターの例には、酵母GAL1(ガラクトースによって誘導可能)、CUP1(Cu⁺⁺によって誘導可能)、およびFUS1(フェロモンによって誘導可能)プロモーター; H. polymorphaおよびP. pastoris由来のAOX/MOXプロモーター(グルコースまたはエタノールによって抑制され、メタノールによって誘導される); キメラプロモーター(Lexオペレーターを含むキメラプロモーターなど。LexA含有転写因子によって誘導可能)などが含まれるが、これらに限定されない。キメラ遺伝子によってコードされた融合タンパク質が宿主細胞に対して有毒である場合、誘導性プロモーターが好ましい。所望ならば、SPO13プロモーター由来の上流抑制配列(URS)などの一定の転写抑制配列を、プロモーター配列(例えば、プロモーター領域の5'末端)に作動可能に連結することができる。このような上流抑制配列は、キメラ遺伝子の発現レベルを微調整するように機能する。

20

30

【0146】

好ましくは、転写終結シグナルを、ベクター中のキメラ遺伝子に作動可能に連結させる。一般に、例えば、CYC1およびADH1遺伝子由来の転写終結シグナル配列を使用することができる。

【0147】

さらに、ベイトベクターおよびプレイベクターがキメラ遺伝子を保有する酵母細胞のみの選択および維持のために1つまたは複数の選択マーカーを含むことが好ましい。キメラ遺伝子を積極的に識別する(positively identified)か、消極的に選択する(negatively selected)ことができる限り、本発明の目的のために当分野で公知の任意の選択マーカーを使用することができる。積極的に識別することができるマーカーの例は、ガラクトシダーゼをコードするlacZ遺伝子、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、分泌性アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子、青色蛍光タンパク質(BFP)遺伝子、および緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を含む呈色アッセイを基本とするマーカーである(Cubittら、Trends Biochem. Sci., 20、448~455、1995を参照のこと)。他のマーカー(蛍光発光、下悪発光、UV吸収、および赤外線など)を使用することもできる。そのうちで選択することができるマーカーは、栄養要求性マーカー(URA3、HIS3、TRP1、LEU2、LYS2、およびADE2などが含まれるが、これらに限定されない)である。典型的には、栄養要求性選択の目的のために、ベイトベクターおよび/またはプレイベクターで形質転換した酵母宿主細胞を

40

50

、特定の栄養素を欠く培地中で培養する。他の選択マーカーは、栄養要求性ではなく、むしろ抗生物質または他の生体異物への耐性または感受性に基づく。このようなマーカーの例には、クロラムフェニコール耐性を付与するクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子；アルギニンパーミアゼをコードし、それにより細胞にカナバニン感受性が付与されるCAN1遺伝子 (Sikorskiら、Meth. Enzymol., 194、302~318、1991を参照のこと)；真核細胞にアミノグリコシドG418耐性を付与する細菌カナマイシン耐性遺伝子 (kan^R) (Wachら、Yeast、10、1793~1808、1994を参照のこと)；およびシクロヘキシミド耐性を付与するCYH2遺伝子 (Sikorskiら、Meth. Enzymol., 194、302~318、1991を参照のこと)が含まれるが、これらに限定されない。さらに、メタロチオネインをコードし、それにより銅耐性が付与されるCUP1遺伝子もまた、適切な選択マーカーである。上記各選択マーカーを、単独または組み合わせて使用することができる。1つまたは複数の選択マーカーを、特定のベイトまたはプレイベクターに含めることができる。ベイトベクターおよびプレイベクターは、同一または異なる選択マーカーを有することができる。さらに、半数体酵母細胞の交配前または交配後のいずれかで形質転換宿主細胞に選択圧をかけることができる。

10

【0148】

明らかなように、使用した選択マーカーは、ベイトおよび/またはプレイベクターが発現する宿主株を補足すべきである。言い換えれば、選択マーカー遺伝子として遺伝子を使用する場合、選択マーカー遺伝子を欠く(または対応する遺伝子に変異した)酵母株を、宿主細胞として使用すべきである。多数の選択マーカーに対応する多数の酵母株または誘導株が、当分野で公知である。これらの多数を、所定の酵母2ハイブリッドシステムのために特別に開発した。本発明に関するこのような株の適用および最適な修飾は、本発明を開示された当業者には明らかなはずである。遺伝子交差または組換え変異誘発を使用した酵母株の遺伝子操作方法は、当分野で周知である。例えば、Rothstein、Meth. Enzymol., 101、202~211、1983を参照のこと。例として、以下の酵母株が当分野で周知であり、修飾および調整が必要な際に本発明で使用することができる。

20

【0149】

遺伝子型 MATahis3 200trp1-901leu2-3, 112ade2LYS2:: (lexAop)4-HIS3 URA3:: (lexAop)8-lacZを有するL40；

30

遺伝子型 MATatrp1his3ura36ops-LEU2を有するEGY48株；および

遺伝子型 MATauras-52leu2-3, 112trp1-901his3 200ade2-101gal4 gal80 SPAL10::URA3 GAL1::HIS3::lys2を有するMaV103 (Kumarら、J. Biol. Chem., 272、13548~13554、1997；Vidalら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93、10315~10320、1996を参照のこと)。このような株は、一般に、研究団体に利用可能であり、簡単な酵母遺伝子操作によって得ることもできる。例えば、「酵母2ハイブリッドシステム」、Bartel and Fields編、173~182、Oxford University Press、New York、NY、1997を参照のこと。

40

【0150】

さらに、以下の酵母株が市販されている：

Clontech (Palo Alto, California) から利用可能であり、
遺伝子型 MATagal4gal80his3 200trp1-901ade2-101ura3-52leu2-3, 112URA3::GAL1-lacZLYS2::GAL1-HIS3cyh' を有するY190；および

Stratagene (La Jolla, California) から利用可能であり

50

、遺伝子型 M A T a u r a 3 - 5 2 h i s 3 - 2 0 0 a d e 2 - 1 0 1 l y s 2 - 8 0 1
t r p 1 - 9 0 1 l e u 2 - 3 , 1 1 2 g a l 4 - 5 4 2 g a l 8 0 - 5 3 8 L Y S 2 :
: G A L 1 - H I S 3 U R A 3 : : G A L 1 / C Y C 1 - l a c Z を有する Y R G - 2 。

【 0 1 5 1 】

実際、酵母 2 ハイブリッドシステム分析のために特に設計されたベクターおよび宿主細胞の異なる種類は、Clontech (Palo Alto, California) および Stratagene (La Jolla, California) などの業者から市販されているキットを利用することができ、これらは全て本発明用に改変することができる。

【 0 1 5 2 】

4 . 3 . 1 . 2 . レポーター

一般に、転写ベースの 2 ハイブリッドシステムでは、ベイト融合タンパク質とブレイ融合タンパク質との間の相互作用は、DNA 結合ドメインおよび転写活性化ドメインを接近させて、特定のプロモーターに対してレポータータンパク質発現を駆動するように作用する機能的転写因子を形成する。転写活性ドメインおよび DNA 結合ドメインを、種々の公知の転写アクチベーター (例えば、GAL4、GCN4、ARD1、ヒトエストロゲン受容体、大腸菌 LexA タンパク質、単純ヘルペスウイルス VP16 (Triezenberg ら、Genes Dev. , 2, 718 ~ 729, 1988)、大腸菌 B42 タンパク質 (酸のプロップ、Gyuris ら、Cell, 75, 791 から 803, 1993 を参照のこと)、NF-κB p65 など) から選択することができる。レポーター遺伝子およびその転写を駆動するプロモーターを、異なるレポーターベクターに組み込む。あるいは、宿主細胞を、このようなプロモーター・レポーター遺伝子配列がその染色体に含まれるように操作する。したがって、タンパク質複合体の 2 つの相互作用タンパク質メンバー間の相互作用または相互作用の欠失を、アッセイ系でのレポーターの変化の検出または測定によって決定することができる。レポーターおよび選択マーカーが類似の型であり、本発明で類似の様式で使用されるにもかかわらず、レポーターおよび選択マーカーを、互いに区別し互いの機能を妨害しないように特定の検出アッセイで慎重に選択しなければならない。

【 0 1 5 3 】

多数の異なるレポーター型がスクリーニングアッセイにおいて有用である。例えば、レポータータンパク質は、タンパク質に融合したエピトープタグを有する融合タンパク質であり得る。共通に使用され、且つ市販されているエピトープタグには、例えばインフルエンザウイルス血球凝集素 (HA)、サルウイルス 5 (V5)、ポリヒスチジン (6 x His)、c-myc、lacZ、および GST など由来の配列が含まれる。これらのエピトープタグに特異的な抗体は、一般に、市販されている。したがって、発現したレポーターを、免役アッセイでエピトープ特異的抗体を使用して検出することができる。

【 0 1 5 4 】

別の実施形態では、呈色ベースのアッセイで検出できるようにレポーターを選択する。このようなレポーターの例には、例えば、lacZ タンパク質 (ガラクトシダーゼ)、蛍光アッセイで検出し、フローセルソーター (FACS) で選別することができる緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Cubitt ら、Trends Biochem. Sci. , 20, 448 ~ 455, 1995 を参照のこと)、分泌性アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、青色蛍光タンパク質 (BFP)、エクオリン、オベリン、ムネミオプシン、およびペロピンなどのルシフェラーゼリンタンパク質 (米国特許第 6, 087, 476 号 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) を参照のこと) が含まれる。

【 0 1 5 5 】

あるいは、栄養要求性因子を、栄養要求性因子欠損宿主株のレポーターとして使用する。したがって、適切な栄養要求性レポーター遺伝子には、URA3、HIS3、TRP1、LEU2、LYS2、および ADE2 などが含まれるが、これらに限定されない。例えば

10

20

30

40

50

、変異URA3遺伝子を含む酵母細胞を、宿主細胞(Ura⁻表現型)として使用することができる。このような細胞は、URA3コード機能性オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ(ウラシルの生合成のために酵母細胞が必要とする酵素)を欠く。結果として、細胞は、ウラシルを欠く培地で成長できない。しかし、野生型オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼは、非毒性化合物5-フルオロオロチン酸(5-FOA)の有毒産物5-フルオロウラシルへの変換を触媒する。したがって、野生型URA3遺伝子を含む酵母細胞は、5-FOAに感受性を示し、5-FOA含有培地で成長できない。したがって、融合タンパク質中での相互作用タンパク質メンバー間の相互作用により、活性オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼが発現し、Ura⁻(Foa^R)酵母細胞は、ウラシル欠損培地(SC-Uraプレート)上で成長することができる。しかし、このような細胞は5-FOA含有培地では生存しない。したがって、タンパク質-タンパク質相互作用を、細胞成長に基づいて検出することができる。

10

【0156】

さらに、同様の様式で、抗生物質耐性レポーターを使用することもできる。これに関して、特定の抗生物質に感受性を示す宿主細胞を使用する。抗生物質耐性レポーターには、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子および真核細胞中でG418耐性を付与し、原核細胞中でカナマイシン耐性を付与するkan(登録商標)遺伝子が含まれる。

【0157】

4.3.1.3. 相互作用アンタゴニストのスクリーニングアッセイ

本発明のスクリーニングアッセイは、本発明のタンパク質複合体中のタンパク質-タンパク質相互作用(すなわち、Tsg101またはそのホモログもしくは誘導体とHIV GAG、HIV GAG p6、P(T/S)AP後期ドメインモチーフを含む他のレトロウイルスGAG、またはこれらのホモログもしくは誘導体との間の相互作用)を妨害、破壊、または解離することができる化合物の選択で有用である。例えば、Tsg101およびHIV GAGは、HIV増殖で役割を果たすので、HIV感染およびAIDSに関連する。Tsg101とHIV GAGとの間の正常な相互作用の妨害または解離によって患者の疾患または障害を改善または緩和することが可能である。あるいは、疾患または障害が本発明のTsg101および/またはHIV GAGの発現の増加に関連する場合、患者のTsg101とHIV GAGとの間の相互作用の低下または解離によって疾患を治療または予防することができる。さらに、疾患または障害がタンパク質-タンパク質相互作用を増強するTsg101および/またはHIV GAGの変異形態に関連する場合、Tsg101およびHIV GAGの変異形態の間の相互作用を低下または分離する化合物を使用して治療することができる。

20

30

【0158】

相互作用アンタゴニストのスクリーニングアッセイでは、例えば、Tsg101およびHIV GAGまたはGAG p6を、2ハイブリッドアッセイの目的のために上記の融合タンパク質の形態で発現する試験タンパク質として使用する。宿主細胞中に融合タンパク質が発現し、1つまたは複数の試験化合物の存在下で互いに相互作用する。

【0159】

好ましい実施形態では、試験化合物が2つの試験タンパク質の間の相互作用を妨害することができる場合のみに検出可能なシグナル(例えば、色素もしくは蛍光の外観または細胞生存)が存在するように対抗選択マーカーをレポーターとして使用する。これに関して、当分野で公知の種々の「逆2ハイブリッドシステム」で使用したレポーターを使用することができる。逆2ハイブリッドシステムは、例えば、米国特許第5,525,490号、米国特許第5,733,726号、米国特許第5,885,779号; Vidalら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93、10315~10320、1996; および Vidalら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93、10321~10326、1996(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)で開示されている。

40

50

【0160】

酵母系で有用な適切な対抗選択レポーターの例には、U R A 3 遺伝子（5 - フルオロオロチン酸（5 - F O A）を有毒な代謝産物5 - フルオロウラシルに変換するオロチジン - 5' - デカルボキシラーゼをコードする）、C A N 1 遺伝子（有毒なアルギニン類似体であるカナニン酵母細胞に輸送するアルギニンパーミアーゼをコードする）、G A L 1 遺伝子（2 - デオキシガラクトースの有毒な2 - デオキシガラクトース - 1 - リン酸への変換を触媒するガラクトキナーゼをコードする）、L Y S 2 遺伝子（唯一の窒素源としてアミノアジピン酸を含む培地で酵母細胞を成長できなくする - アミノアジピン酸レダクターゼをコードする）、M E T 1 5 遺伝子（酵母細胞にメチル水銀感受性を付与するO - アセチルホモセリンスルフィドラーゼをコードする）、およびC Y H 2 遺伝子（シクロヘキシミド感受性を付与するL 2 9 リボゾームタンパク質をコードする）が含まれる。さらに、ジフテリア毒素（D T A）触媒ドメインなどの細胞傷害性タンパク質を含む任意の公知の細胞障害剤を、対抗選択レポーターとして使用することもできる。米国特許第5, 733, 726号を参照のこと。D T Aは、伸長因子2のA D P リボシル化引き起こし、それによりタンパク質合成が阻害され、細胞が死滅する。細胞傷害剤の他の例には、リシン、シガ毒素、および緑膿菌のエンドトキシンAが含まれる。

10

【0161】

例えば、対抗選択レポーター遺伝子としてU R A 3 遺伝子を使用する場合、インビボアッセイでの宿主細胞（U r a⁻ F o a^R 表現型）として変異U R A 3 を含む酵母細胞を使用することができる。このような細胞は、U R A 3 コード機能的オロチジン - 5' - リン酸デカルボキシラーゼ（ウラシルの生合成に必要な酵素）を欠く。結果として、細胞はウラシルを欠く培地で成長することができない。しかし、野生型オロチジン - 5' - リン酸デカルボキシラーゼが存在しないので、酵母細胞は、非毒性5 - フルオロオロチン酸（5 - F O A）を有毒な産物5 - フルオロウラシルに変換することができない。したがって、このような酵母細胞は、5 - F O Aに耐性を示し、5 - F O A含有培地で成長することができる。したがって、例えば、T s g 1 0 1 とH I V G A G p 6 との間の相互作用を破壊することができる化合物をスクリーニングするために、T s g 1 0 1 を、適切な転写アクチベーターのD N A 結合ドメインとの融合タンパク質として発現することができる一方で、H I V G A G p 6 を適切な転写アクチベーターの転写活性化ドメインとの融合タンパク質として発現する。宿主株では、レポーターU R A 3 遺伝子を、転写活性化ドメインとD N A 結合ドメインとの会合に特異的に反応性を示すプロモーターに作動可能に連結させることができる。U r a⁻ F o a（登録商標）酵母細胞中で融合タンパク質を発現させた後、試験化合物の存在下でインビボスクリーニングアッセイを行い、酵母細胞をウラシルおよび5 - F O A含有培地で培養することができる。試験化合物がT s g 1 0 1 とH I V G A GまたはG A G p 6 との間の相互作用を破壊しない場合、活性U R A 3 遺伝子産物（すなわち、5 - F O Aを有毒な5 - フルオロウラシルに変換するオロチジン - 5' - デカルボキシラーゼ）を発現する。結果として、酵母細胞は成長できない。それに対して、試験化合物がT s g 1 0 1 とH I V G A GまたはG A G p 6 との間の相互作用を破壊する場合、宿主酵母細胞中に活性オロチジン - 5' - デカルボキシラーゼは産生されない。したがって、酵母細胞は生存し、5 - F O A含有培地で成長する。したがって、コロニー形成に基づいてT s g 1 0 1 とH I V G A GまたはG A G p 6 との間の相互作用を妨害または解離することができる化合物を同定することができる。

20

30

40

【0162】

明らかのように、本発明のスクリーニングアッセイを、大規模スクリーニングに適切な形式で適用することができる。例えば、組み合わせ技術を使用して、有機小分子または小ペプチドの組み合わせライブラリーを構築することができる。一般に、例えば、K e n a nら、T r e n d s B i o c h e m . S c . , 1 9 , 5 7 ~ 6 4 , 1 9 9 4 ; G a l l o pら、J . M e d . C h e m . , 3 7 , 1 2 3 3 ~ 1 2 5 1 , 1 9 9 4 ; G o r d o nら、J . M e d . C h e m . , 3 7 , 1 3 8 5 ~ 1 4 0 1 , 1 9 9 4 ; E c k e rら、B i o t e c h n o l o g y , 1 3 , 3 5 1 ~ 3 6 0 , 1 9 9 5 を参照のこと。化合物のこのよ

50

うな組み合わせライブラリーを、本発明のスクリーニングアッセイに適用して、特定のタンパク質 - タンパク質相互作用の特定のモジュレーターを単離することができる。無作為ペプチドライブラリーの場合、無作為ペプチドを宿主細胞中で本発明の融合タンパク質と同時に発現し、インビボでアッセイすることができる。例えば、Yangら、Nucleic Acids Res., 23, 1152 ~ 1156, 1995を参照のこと。あるいは、宿主細胞による取り込みのために無作為ペプチドを培養培地に添加することができる。

【0163】

都合よいことに、インビボスクリーニングアッセイで酵母交配を使用する。例えば、上記の1つの融合タンパク質を発現するa交配型の半数体細胞を、他の融合タンパク質を発現する交配型の半数体細胞と交配する。交配の際、二倍体細胞を適切な培地に塗布して菌叢を形成させる。試験化合物の液滴を異なる菌叢領域にのせる。菌叢を適切な期間培養した後、融合タンパク質中の特定の試験タンパク質間の相互作用を調整することができる化合物を、液滴近傍の成長の刺激または阻害によって検出することができる。

10

【0164】

タンパク質 - タンパク質相互作用を調整することができる化合物の選択のための本発明のスクリーニングアッセイを、正および負の選択の閾値または感度を調整するための種々の技術によって微調整することもできる。レポータータンパク質を変異して活性を調整することができる。宿主細胞による試験化合物の取り込むも調整することができる。例えば、erg6変異株などの酵母による高い変異体の取り込みにより、試験化合物の酵母取り込みを容易にすることができる。Gaberら、Mol. Cell. Biol., 9, 3447 ~ 3456, 1989を参照のこと。同様に、5-FOA、2-デオキシガラクトース、シクロヘキシミド、および - アミノアジピン酸などの選択化合物の取り込みを微調整することもできる。

20

【0165】

4.4. ウイルススクリーニングおよび化合物の最適化

本発明のタンパク質複合体の相互作用パートナー間のタンパク質 - タンパク質相互作用を調整することができる試験化合物が、一旦選択されると、試験化合物の同一性または特徴を定義するデータを含むデータセットを作成することができる。データセットは、選択された試験化合物の性質に関する情報（例えば、化学構造、キラリティー、分子量、および融点など）を含み得る。あるいは、データセットは、スクリーニングを行う研究者および/または特定の試験化合物を示すデータセットを受け取る研究者によって理解される、指定された識別番号を含み得る。他の研究者、特に異なる国の研究者に連絡または送信することができる送信可能な形態でデータまたは情報を与えることができる。このような送信可能な形態は変化することができ、有形でも無形でも良い。例えば、1つまたは複数の選択された試験化合物を定義したデータセットを、文字、表、図、分子構造、写真、チャート、画像、または任意の他の視覚可能な形態に具体化することができる。データまたは情報を、紙などの有形の媒体に記録するか、コンピュータ読取可能な形態（例えば、電子、電磁気、光学、または他のシグナル）に具体化することができる。コンピュータ読取可能な形態中のデータを、コンピュータ利用可能な記憶媒体（例えば、フロッピーディスク、磁気テープ、および光ディスクなど）に保存するか、通信基盤を介して直接送信することができる。特に、電子シグナルで具体化されたデータを、電子メールの形態で送信するか、インターネットまたはイントラネットのウェブサイトにもメールを送ることができる。さらに、選択された試験化合物に関する情報またはデータを、音声形態で記録して、任意の適切な媒体（例えば、アナログもしくはデジタルケーブルラインおよび光ファイバーケーブルなど）、電話、ファクシミリ、携帯電話、インターネット電話などによって送信することもできる。

30

40

【0166】

したがって、上記のスクリーニングアッセイまたは下記の仮想スクリーニングによって選択された試験化合物に関する情報およびデータを、世界中のどこでも作成し、異なる場所へ送信することができる。例えば、スクリーニングアッセイを海外で行った場合、選択

50

された試験化合物に関する情報およびデータを作成し、上記の送信可能な形態に記録することができる。したがって、送信可能な形態でのデータおよび情報を、米国に輸入し、任意の他の国に送信し、その国で試験化合物のさらなる試験および/または選択された試験化合物の調整および最適化においてデータおよび情報を使用して、臨床試験での試験用のリード化合物を開発することができる。

【0167】

例えば、仮想スクリーニングによる標的タンパク質またはタンパク質複合体および/または試験化合物の構造モデルに基づいて化合物を選択することもできる。さらに、一旦有効な化合物が同定されると、薬物の有効性および安定性の改良および副作用の低減を目的とする合理的な薬物設計に基づいて、その構造類似体または模倣物を作製することができる。ウイルススクリーニングおよび合理的な薬物設計のための当分野で公知の方法を、本発明で使用することができる。例えば、Hodgsonら、Bio/Technology、9、19~21、1990；米国特許第5,800,998号および米国特許第5,891,628号（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）を参照のこと。合理的な薬物設計の例は、HIVプロテアーゼインヒビターの開発である。Ericssonら、Science、249、527~533、1990を参照のこと。

10

【0168】

これに関して、標的タンパク質またはタンパク質複合体に関する構造の情報を得る。好ましくは、標的タンパク質またはタンパク質複合体の三次元構造を定義する原子座標を得る。例えば、各相互作用対を発現および精製することができる。次いで、精製相互作用タンパク質対を、適切な条件下で互いにインビボで相互作用させる。任意選択的に、相互作用タンパク質複合体を、架橋または他の技術によって安定化することができる。相互作用複合体を、種々の生物物理学的技術（例えば、X線結晶学、NMR、コンピュータモデリング、および質量分析などが含まれる）を使用して研究することができる。X線結晶学およびNMRなどによってこのような原子座標を得る方法は当分野で公知であり、本発明の標的タンパク質またはタンパク質複合体への適用は、構造生物学分野の当業者に明らかではなくである。Smyth and Martin、Mol. Pathol.、53、8~14、2000；Oakley and Wilce、Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.、27(3)、145~151、2000；Ferentz and Wagner、Q. Rev. Biophys.、33、29~65、2000；およびRobert、Curr. Opin. Biotechnol.、10、42~47、1999を参照のこと。

20

30

【0169】

さらに、モジュレーター化合物の存在下または非存在下での目的のタンパク質間の相互作用の理解は、酵母2ハイブリッドシステムを使用した変異誘発またはタンパク質-タンパク質相互作用の検出のための他の方法から導くこともできる。これに関して、相互作用タンパク質に種々の変異を導入し、タンパク質-タンパク質相互作用に対する変異の効果を、酵母2ハイブリッドシステムなどの適切な方法によって試験する。

【0170】

アミノ酸の置換、欠失、および挿入を含む種々の変異を、従来の組換えDNA技術を使用してタンパク質配列に導入することができる。一般に、結合部位を解読することが特に好ましい。したがって、導入された変異は、タンパク質-タンパク質相互作用またはタンパク質-化合物相互作用に影響を与え、構造の乱れが最小であることが重要である。好ましくは、相互作用タンパク質の三次元構造の知識に基づいて変異を設計する。好ましくは、イオン相互作用および疎水性相互作用はしばしばタンパク質-タンパク質相互作用に関連するので、タンパク質表面に曝露した荷電アミノ酸または疎水性アミノ酸を変化させるように変異を導入する。あるいは、「アラニンスキャニング変異誘発」技術を使用する。Wellsら、Methods Enzymol.、202、301~306、1991；Bassら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88、4498~4502、1991；Bennetら、J. Biol. Chem.、266、5191~520

40

50

1、1991; Diamondら、J. Virol., 68、863~876、1994を参照のこと。この技術を使用して、相互作用タンパク質の荷電または疎水性アミノ酸残基をアラニンに置換し、例えば、酵母2ハイブリッドシステムを使用して、タンパク質間の相互作用に及ぼす影響を分析する。例えば、5つのアミノ酸ウィンドウで全タンパク質配列をスキニングすることができる。2つまたはそれ以上の荷電または疎水性アミノ酸がウィンドウに出現した場合、標準的な組換えDNA技術を使用して荷電または疎水性アミノ酸をアラニンに置換する。したがって、変異タンパク質を上記の2ハイブリッドアッセイでの「試験タンパク質」として使用し、タンパク質-タンパク質相互作用に及ぼす変異の影響を試験する。好ましくは、同定したモジュレーター化合物の存在下または非存在下で変異誘発分析を行う。この様式では、タンパク質-タンパク質相互作用および/または分子化合物とタンパク質との間の相互作用に重要なタンパク質のドメインまたは残基を同定することができる。同様に、選択した化合物と標的タンパク質(例えば、Tsg101)との間の相互作用を、標的タンパク質の変異誘発によって研究することもできる。

10

【0171】

得られた構造情報に基づいて、相互作用タンパク質の間、選択された化合物と相互作用タンパク質との間、または選択された化合物と標的タンパク質との間の構造の関係を解明する。目的のタンパク質の相互作用または標的タンパク質に対する調整効果に重要な選択された化合物の一部および三次元構造を明らかにする。次いで、医薬品化学者は、類似の部分および構造を有する類似体化合物を設計することができる。

【0172】

さらに、特定のタンパク質-タンパク質相互作用または特定の標的タンパク質を調整することができる同定されたペプチド化合物を、アラニンスキニング技術および/またはスクリーニングアッセイによって分析して、特定のタンパク質-タンパク質相互作用または特定の標的タンパク質に対する調整効果に重要なペプチドのドメインまたは残基を決定することもできる。ペプチド化合物を、有機小分子またはペプチド模倣物の合理的な設計のためのリード分子として使用することができる。Huberら、Curr. Med. Chem., 1、13~34、1994を参照のこと。

20

【0173】

同定された化合物の調整効果に重要な残基またはドメインは、「ファーマコフォア」として公知の化合物のアッセイ領域を構成する。一旦ファーマコフォアが解明されると、NMR分析、X線回折データ、アラニンスキニング、分光学的技術由来のデータを組み込むことができるモデリングプロセスによって構造モデルを確立することができる。コンピュータ分析および類似性マッピングなどを含む全ての種々の技術を、このモデリングプロセスで使用することができる。例えば、Perryら、「OSAR: 薬物設計における定量的構造-活性関係」、p. 189~193、Alan R. Liss, Inc., 1989; Rotivinenら、Acta Pharmaceutica Fennica、97、159~166、1988; Lewisら、Proc. R. Soc. Lond., 236、125~140、1989; McKinalyら、Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 29、111~122、1989を参照のこと。Polygen Corporation、Waltham、MAから市販されている分子モデリングシステムはエネルギー最小化および分子の力学的関数を実行するCHARMmプログラム、および分子構造の構築、画像モデリング、および分析を実行するQUANTAプログラムを含む。このようなプログラムにより、分子の相互作用構造、視覚化、および修飾が得られる。他のコンピュータモデリングプログラムは、BioDesign, Inc. (Pasadena, CA)、Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario)、およびAllelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada)からも市販されている。

30

40

【0174】

確立されたモデルに基づいてテンプレートを形成することができる。次いで、テンプレートへの種々の化学官能基または一部の結合によって種々の化合物を設計することができる

50

。種々のテンプレート部分を置換することもできる。さらに、ペプチドリード化合物の場合、N末端およびC末端の結合によってペプチドまたはその模倣物を環状化して、安定性を増大させることができる。これらの合理的に設計された化合物を、さらに試験する。この様式では、有効性が改良され、副作用が低減した薬理的に許容可能且つ安定な化合物を開発することができる。本発明によって同定された化合物を、個体への投与に適切な薬学的処方物に組み込むことができる。

【0175】

さらに、標的タンパク質またはタンパク質複合体の三次元構造を定義する構造モデルまたは原子座標をウイルススクリーニングで使用して、標的タンパク質またはタンパク質複合体を調整することができる化合物を選択することもできる。原子座標を使用したコンピュータベースの種々のウイルススクリーニング法は、当分野で一般に公知である。例えば、米国特許第5,798,247号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)は、有機化合物と標的タンパク質内の結合空洞の結合部位との間の結合相互作用の決定による化合物(特に、インターロイキン変換酵素インヒビター)の同定方法を開示している。結合部位を、原子座標によって定義する。

10

【0176】

したがって、当業者に明らかなように、本発明の標的タンパク質またはタンパク質複合体の三次元構造を定義する原子座標を、当分野で公知の任意の方法によって得ることができる。次いで、原子座標に基づいて化合物を設計または選択することができる。

【0177】

20

5. 治療への適用

本発明の別の態様によれば、ヒト細胞中でのTsg101およびHIV GAGまたはGAGp6を含むタンパク質複合体の調整方法が得られる。ヒト細胞は、インビトロ細胞または組織培養物であり得る。本方法は、患者のヒト細胞に適用することもできる。

【0178】

1つの実施形態では、細胞中のHIV GAGまたはGAGp6と相互作用するTsg101を有するタンパク質複合体の濃度を減少させる。種々の方法を使用して、タンパク質複合体濃度を減少させることができる。タンパク質複合体濃度を、Tsg101とHIV GAGまたはGAGp6との間の相互作用の妨害によって減少させることができる。例えば、Tsg101とHIV GAGまたはGAGp6との間の相互作用を妨害することができる化合物を、インビトロで細胞に投与するか、インビボで患者に投与することができる。このような化合物は、Tsg101タンパク質(特に、Tsg101のUEVドメイン)またはHIV GAGもしくはGAGp6に結合することができる化合物であり得る。これらの化合物はまた、Tsg101タンパク質またはHIV GAGもしくはGAGp6に免疫反応性を示す抗体であり得る。好ましくは、Tsg101のUEVドメインに結合する抗体を使用する。また、化合物は、HIV GAGまたはGAGp6タンパク質もしくはTsg101に結合することができるその模倣物由来の小ペプチド、Tsg101タンパク質またはHIV GAGまたはGAGp6に結合することができるその模倣物由来の小ペプチドであり得る。

30

【0179】

40

別の実施形態では、タンパク質複合体の調整方法は、Tsg101タンパク質および/またはHIV GAGもしくはGAGp6タンパク質の発現を阻害するステップを含む。阻害は、転写、翻訳、または翻訳後レベルであり得る。例えば、アンチセンス化合物およびリボザイム化合物を、培養物中のヒト細胞またはヒトの身体に投与することができる。

【0180】

上記の種々の実施形態では、好ましくは、Tsg101タンパク質およびHIV GAGまたはGAGp6の濃度または活性を、減少させるか阻害する。

【0181】

さらに別の実施形態では、HIV GAGまたはGAGp6と相互作用するTsg101を有するタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を、インビトロで細胞に投与

50

するかヒトの身体に投与して、タンパク質複合体活性を阻害し、及び/または細胞または患者中のタンパク質複合体濃度を減少させる。

【0182】

本発明によって得られた T s g 1 0 1 および H I V G A G または G A G p 6 を含むタンパク質複合体の調整方法を使用して、感染宿主からの H I V ウイルスの出芽を阻害することができる。例えば、細胞培養物または患者の身体中に複数の細胞が存在する場合、ウイルス出芽の阻害により、感染宿主細胞からのウイルスの放出が防止され、それによりさらなるウイルス増殖が抑制される。したがって、本発明はまた、T s g 1 0 1 および H I V G A G または G A G p 6 を有するタンパク質複合体の濃度の現象もしくは活性の阻害または T s g 1 0 1 または H I V G A G もしくは G A G p 6 の濃度の現象もしくは活性の阻害によって患者の H I V 感染を治療し、A I D S を予防する方法を含む。

10

【0183】

さらに、T s g 1 0 1 および H I V G A G または G A G p 6 を含むタンパク質複合体の調整方法は、多数の他のウイルス（特に、感染宿主細胞空の出芽が後期ドメインモチーフ P (T / S) A P に依存するウイルス）の出芽の阻害に有用であり得る。上記のように、T s g 1 0 1 との H I V G A G p 6 の相互作用を担う P (T / S) A P モチーフは、全ての公知の霊長類レンチウイルスの G A G p 6 ドメインで保存されている。G A G p 6 ドメインを欠く非霊長類レンチウイルスでは、P (T / S) A P モチーフは、G A G ポリタンパク質の即時型 C 末端である。さらに、多数の他のレトロウイルスはまた、その G A G ポリペプチド中に、H I V G A G p 6 タンパク質と同一の様式で T s g 1 0 1 と相互作用すると考えられている P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを含む。

20

【0184】

したがって、本発明はまた、T s g 1 0 1 タンパク質およびヒトレンチウイルス（H I V 以外）G A G ポリペプチドまたは P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを含むそのフラグメントを含むタンパク質複合体の調整方法を提供する。このような調整方法は、感染宿主細胞からのこのようなウイルスの出芽の阻害および患者におけるこのようなウイルスによる感染の治療で使用することができる。

【0185】

さらに、本発明はまた、T s g 1 0 1 タンパク質オルソログおよび非ヒトレトロウイルス G A G ポリペプチドまたは P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを含むそのフラグメントを含むタンパク質複合体の調整方法を含む。このような調整方法を、感染動物宿主細胞からのこのような非ヒトレトロウイルスの阻害および動物中のこのようなウイルスによる感染の治療で使用することができる。

30

【0186】

このような非ヒトレトロウイルスの例には、H I V 以外の霊長類レンチウイルスおよび非霊長類レンチウイルス（E I A V 以外）が含まれるが、これらに限定されない。当分野で公知のように、レンチウイルスは、脊椎細胞の長期感染可能なレトロウイルス群である。活性化された場合のみ、宿主細胞中で複製される。レンチウイルスは、典型的には、外殻を有するビリオンを有する。非霊長類レンチウイルスには、ウシレンチウイルス（例えば、ウシ免疫不全ウイルス（B I V）、J e m b r a n a 病ウイルス）、ネコレンチウイルス（例えば、ネコの免疫不全、消耗性疾患、および脳炎を発症するネコ免疫不全ウイルス（F I V））、ヒツジ/ヤギレンチウイルス（例えば、ヤギの貧血および消耗性疾患を発症するヤギ関節炎 - 脳炎ウイルス（C A E V）、ヒツジレンチウイルス、肺炎、消耗性疾患、脳炎、および関節炎を発症するビスノウイルス）、およびウマレンチウイルス（例えば炎症および脳炎を引き起こすウマに感染するウマ伝染性貧血ウイルス（E I A V））が含まれる。非ヒト霊長類レンチウイルスの例には、チンパンジー、マンガベア、サバンナモンキー、マンドリル、L ' H o e s t、サイクスモンキー、または G u e r e z a C o l o b u s モンキーなどの宿主を感染させる種々のサル免疫不全が含まれる。

40

【0187】

T s g 1 0 1 タンパク質およびヒトレトロウイルス G A G ポリペプチドまたは P (T / S

50

) A P 後期ドメインモチーフを含むそのフラグメントを含むタンパク質複合体の調整方法および T s g 1 0 1 オルソログおよび非ヒトレトロウイルス G A G ポリペプチドまたは P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを含むそのフラグメントを含むタンパク質複合体の調整方法を、 T s g 1 0 1 および H I V G A G または G A G p 6 のタンパク質複合体の調整の文脈で上記と類似の様式行うべきである。同様に、このような他のヒトまたは非ヒトウイルスによる感染の治療方法は、 H I V 感染の治療方法と類似しているべきであり、本発明を開示された当業者に明らかである。

【 0 1 8 8 】

詳細には、種々の方法によって、細胞中のタンパク質複合体濃度を減少させることができる。例えば、タンパク質複合体濃度を、 T s g 1 0 1 タンパク質とヒトレトロウイルス G A G ポリペプチドまたは P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを含むそのフラグメントとの間の相互作用または T s g 1 0 1 タンパク質オルソログと非ヒトレトロウイルス G A G ポリペプチドまたは P (T / S) A P 後期ドメインモチーフを含むそのフラグメントとの間の相互作用の妨害によって減少させることができる。このような化合物は、 T s g 1 0 1 タンパク質または T s g 1 0 1 タンパク質オルソログ、特に T s g 1 0 1 タンパク質または T s g 1 0 1 タンパク質オルソログの U E V ドメインに結合することができる化合物であり得る。化合物はまた、 T s g 1 0 1 タンパク質または T s g 1 0 1 タンパク質オルソログに免疫反応性を示す抗体であり得る。好ましくは、 T s g 1 0 1 タンパク質または T s g 1 0 1 タンパク質オルソログの U E V ドメインに結合する抗体を使用する。また、化合物は、好ましくは P (T / S) A P 後期ドメインモチーフにわたるアミノ酸残基を含むレトロウイルス G A G ポリペプチド由来の小ペプチドであり得る。さらに、タンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を投与することができる。他の実施形態では、 T s g 1 0 1 タンパク質または T s g 1 0 1 オルソログの発現を阻害する。阻害は、転写、翻訳、または翻訳後レベルであり得る。例えば、アンチセンス化合物およびリボザイム化合物を、培養物中の細胞または治療すべき被験体に投与することができる。

【 0 1 8 9 】

タンパク質複合体またはタンパク質 - タンパク質相互作用の種々の調整方法およびウイルス感染の治療方法の詳細を以下に記載する。このような詳細は T s g 1 0 1 タンパク質と H I V G A G または G A G p 6 との間の相互作用ならびにヒト細胞の H I V 感染の文脈で記載されているが、他のウイルスによる感染に関する類似の方法は、本発明を開示された当業者に明らかなはずである。

【 0 1 9 0 】

5 . 1 . 抗体療法

1つの実施形態では、抗体を、インビトロで細胞または組織に投与するか、患者に投与することができる。投与した抗体は、 T s g 1 0 1 または H I V G A G もしくは G A G p 6 に免疫反応性を示し得る。適切な抗体は、任意の抗体クラス (例えば、 I g G、 I g M、 I g A など) に含まれるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。本発明に適切な抗体はまた、種々の抗体フラグメント形態をとることができ、 F a b、および F (a b ')₂、一本鎖フラグメント (s c F v) (「一本鎖抗体」) などが含まれるが、これらに限定されない。1つの実施形態では、本発明の T s g 1 0 1 および H I V G A G または G A G p 6 から形成されたタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を、インビトロで細胞もしくは組織に投与するか患者に投与する。別の実施形態では、 T s g 1 0 1 に特異的な抗体を、インビトロで細胞に投与するか患者に投与する。好ましくは、 T s g 1 0 1 の U E V ドメインに特異的な抗体を、インビトロで細胞もしくは組織に投与するか患者に投与する。本発明の抗体の産生方法は、特に、上記のセクション 3 . における考察の観点から当業者に明らかなはずである。抗体を、以下のセクション 6 . に記載の任意の適切な形態および経路で投与することができる。好ましくは、薬学的に許容可能なキャリアを含む医薬組成物中の抗体を投与する。

【 0 1 9 1 】

あるいは、遺伝子治療アプローチによって抗体を送達させることができる。すなわち、所

望の抗体がインビボでの核酸からの組換え発現によって産生することができるように、抗体、特に一本鎖フラグメント (s c F v) をコードする核酸を、インビトロで細胞もしくは組織に移入するか、患者に移入することができる。この目的のために、適切な転写および翻訳調節配列を含む核酸を、患者に直接投与することができる。あるいは、セクション 4 . およびセクション 5 . 5 に記載のように、核酸を適切なベクターに組み込んで、インビトロで細胞もしくは組織に送達させるベクターを使用して患者に送達させることができる。核酸を含む発現ベクターを、患者に直接投与することができる。発現ベクターを、細胞、好ましくは治療すべき患者由来の細胞に移入し、その後細胞移植によって患者に送達させることもできる。以下のセクション 5 . 5 を参照のこと。

【 0 1 9 2 】

10

5 . 2 . アンチセンス療法

別の実施形態では、本発明で同定されたタンパク質複合体の 1 つまたは複数の相互作用タンパク質メンバーをコードする核酸に特異的なアンチセンス化合物を、インビトロで細胞もしくは組織に投与するか、治療または予防すべき患者に投与する。アンチセンス化合物は、1 つまたは複数の相互作用タンパク質メンバーの発現を特異的に阻害するはずである。好ましい実施形態では、T s g 1 0 1 核酸と特異的にハイブリッド形成するアンチセンス化合物を投与する。当分野で公知のように、アンチセンス薬は、一般に、特定の標的核酸とのハイブリッド形成およびそれによる遺伝子発現の遮断によって作用する。アンチセンス化合物の設計方法および疾患治療におけるこのような化合物の使用方法は当分野で周知であり、十分に開発されている。例えば、アンチセンス薬 *Vit ravene* (登録商標) (*fomivirsen*) (21 塩基長のオリゴヌクレオチド) が首尾よく開発されており、サイトメガロウイルス (CMV) 誘導性網膜炎治療用として *Isis Pharmaceuticals, Inc.* から市販されている。

20

【 0 1 9 3 】

アンチセンス化合物の任意の設計および産生方法を、本発明の目的で使用することができる。一般に、S a n g h v i ら編、「アンチセンス研究と適用」、C R C P r e s s、B o c a R a t o n、1 9 9 3 を参照のこと。典型的には、アンチセンス化合物は、本発明の特定のタンパク質複合体の 1 つまたは複数の相互作用タンパク質メンバーの m R N A または遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドである。特に、アンチセンス化合物を、調整 (増加または減少)、複製、転写、または翻訳するための 1 つまたは複数の相互作用タンパク質メンバーの遺伝子配列または m R N A の特定の領域と特異的にハイブリッド形成するように設計することができる。本明細書中で使用される用語「特異的にハイブリッド形成する」またはその言い換えは、安定且つ特定の結合が得られるようにアンチセンスオリゴと標的 D N A または m R N A との間の十分な相補性または対合の程度を意味する。特に、1 0 0 % 相補性または対合は必要ない。所定の条件下 (例えばインビボ治療のため)、好ましくは生理学的条件下で非標的配列へのアンチセンス化合物の非特異的結合が実質的に存在しない時のアンチセンス化合物とその意図する標的核酸との間で十分にハイブリッド形成される場合に、特異的にハイブリッド形成する。好ましくは、特異的ハイブリッド形成により、標的 D N A または m R N A の正常な発現が妨害される。

30

40

【 0 1 9 4 】

例えば、アンチセンスオリゴを、標的遺伝子の複製もしくは転写調節領域、翻訳開始領域およびエクソン/イントロン連結点などの翻訳調節領域、または標的 m R N A のコード領域と特異的にハイブリッド形成するように設計することができる。好ましくは、T s g 1 0 1 遺伝子または T s g 1 0 1 m R N A を、標的として使用する。

【 0 1 9 5 】

当分野で一般的に公知のように、一般的に使用されるオリゴヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオチド塩基、糖、およびリン酸基を含むヌクレオチド塩基と糖との間の共有結合の組み合わせを有するリボ核酸またはデオキシリボ核酸のオリゴマーまたはポリマーである。しかし、用語「オリゴヌクレオチド」はまた、下記の天然に存在するオリゴヌクレ

50

オチドの種々の天然に存在しない模倣物および誘導体（すなわち、修飾形態）を含むことに留意すべきである。典型的には、本発明のアンチセンス化合物は、約6～約200、好ましくは約8～約30ヌクレオシド塩基を有するオリゴヌクレオチドである。

【0196】

アンチセンス化合物は、好ましくは、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間結合（モルホリノ骨格、シロキサソ、スルフィド、スルホキシド、スルホン、スルホナート、スルホンアミド、およびスルファマート骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；アミド骨格などの修飾リン含有骨格および非リン骨格が含まれるが、これらに限定されない）を含む。

【0197】

修飾リン酸含有骨格の例には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、アルキルリン酸、チオノアルキルホスホネート、ホスフィネート、ホスホロアミデート、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホトリエステル、およびボラノホスフェート、ならびにその種々の塩形態が含まれるが、これらに限定されない。例えば、米国特許第3,687,808号、米国特許第4,469,863号、米国特許第4,476,301号、米国特許第5,023,243号、米国特許第5,177,196号、米国特許第5,188,897号、米国特許第5,264,423号、米国特許第5,276,019号、米国特許第5,278,302号、米国特許第5,286,717号、米国特許第5,321,131号、米国特許第5,399,676号、米国特許第5,405,939号、米国特許第5,453,496号、米国特許第5,455,233号、米国特許第5,466,677号、米国特許第5,476,925号、米国特許第5,519,126号、米国特許第5,536,821号、米国特許第5,541,306号、米国特許第5,550,111号、米国特許第5,563,253号、米国特許第5,571,799号、米国特許第5,587,361号、および米国特許第5,625,050号（それぞれ、引用することにより本明細書の一部をなすものとする）を参照のこと。

【0198】

上記の非リン含有骨格の例は、米国特許第5,034,506号、米国特許第5,185,444号、米国特許第5,214,134号、米国特許第5,216,141号、米国特許第5,235,033号、米国特許第5,264,562号、米国特許第5,264,564号、米国特許第5,405,938号、米国特許第5,434,257号、米国特許第5,470,967号、米国特許第5,489,677号、米国特許第5,541,307号、米国特許第5,561,225号、米国特許第5,596,086号、米国特許第5,610,289号、米国特許第5,602,240号、米国特許第5,608,046号、米国特許第5,610,289号、米国特許第5,618,704号、米国特許第5,623,070号、米国特許第5,663,312号、米国特許第5,677,437号、および米国特許第5,677,439号（それぞれ、引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に記載されている。

【0199】

別の有用な修飾オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの糖骨格がアミノ含有骨格（例えば、アミノエチルグリシン骨格）に置換されたペプチド核酸（PNA）である。米国特許第5,539,082号、米国特許第5,714,331号、および Nielsenら、Science、254、1497～1500、1991（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）を参照のこと。PNAアンチセンス化合物は、RNアーゼH消化物に耐性を示し、それにより半減期が長い。さらに、より良好な安定性、薬物取り込みの増加、標的核酸に対するより高い親和性などの所望の薬物プロファイルを付与するために、PNA骨格を様々に修飾することができる。

【0200】

あるいは、アンチセンス化合物は、修飾ヌクレオチド（すなわち、修飾プリンまたはピリミジン塩基（例えば5置換ピリミジン、6-アザピリミジン、およびN-2、N-6、お

10

20

30

40

50

よびO置換プリン)など)を含むオリゴヌクレオチドである。例えば、米国特許第3,687,808号、米国特許第4,845,205号、米国特許第5,130,302号、米国特許第5,175,273号、米国特許第5,367,066号、米国特許第5,432,272号、米国特許第5,459,255号、米国特許第5,484,908号、米国特許第5,502,177号、米国特許第5,525,711号、米国特許第5,587,469号、米国特許第5,594,121号、米国特許第5,596,091号、米国特許第5,681,941号、および米国特許第5,750,692号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)を参照のこと。

【0201】

さらに、置換または修飾糖部分を有するオリゴヌクレオチドも使用することができる。例えば、アンチセンス化合物は、1つまたは複数の2'-O-メトキシエチル糖部分を有し得る。例えば、米国特許第4,981,957号、米国特許第5,118,800号、米国特許第5,319,080号、米国特許第5,393,878号、米国特許第5,446,137号、米国特許第5,466,786号、米国特許第5,514,785号、米国特許第5,567,811号、米国特許第5,576,427号、米国特許第5,591,722号、米国特許第5,610,300号、米国特許第5,627,0531号、米国特許第5,639,873号、米国特許第5,646,265号、米国特許第5,658,873号、米国特許第5,670,633号、および米国特許第5,700,920号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)を参照のこと。

【0202】

脂質、リン脂質、またはコレステロール部分、コール酸、チオエーテル、脂肪族の鎖、ポリアミン、ポリエチレングリコール(PEG)、またはタンパク質もしくはペプチドにオリゴヌクレオチドが結合した他のオリゴヌクレオチド修飾型もまた有用である。修飾オリゴヌクレオチドにより、細胞への取り込みが増加し、安定性を改良することができる(すなわち、ヌクレアーゼ消化および他の生分解への耐性)。例えば、米国特許第4,522,811号、Burnham, Am. J. Hosp. Pharm., 15, 210~218, 1994を参照のこと。

【0203】

アンチセンス化合物を、当分野で公知の任意の適切な方法を使用して合成することができる。実際は、アンチセンス化合物は、業者による特注品であり得る。あるいは、アンチセンス化合物を、種々の業者(例えば、Applied Biosystems Group, New York, CT)から市販されているDNA合成機を使用して調製することができる。

【0204】

アンチセンス化合物を適切なキャリアを含む医薬組成物に処方し、任意の適切な投与経路を使用してインビトロで細胞または組織に投与するか患者に投与することができる。あるいは、「遺伝子治療」アプローチでアンチセンス化合物を使用することもできる。すなわち、オリゴヌクレオチドを適切なベクターにサブクローン化し、ヒト細胞に形質転換する。次いで、アンチセンスオリゴヌクレオチドを転写によってインビボで産生させる。遺伝子治療法は、以下のセクション6.3.2に開示している。

【0205】

5.3. リボザイム療法

別の実施形態では、酵素RNAまたはリボザイムを、本発明のタンパク質複合体の1つまたは複数の相互作用タンパク質メンバーをコードする核酸を標識するように設計する。好ましい実施形態では、Tsg101核酸を標的とする。リボザイムは、酵素活性を有し、ヌクレオチド塩基配列に特異的な様式で他の異なるRNA分子を繰り返し切断することができるRNA分子である。Kimら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 8788, 1987; Haseloff and Gerlach, Nature, 334, 585, 1988; およびJefferiesら、Nucleic Acid Res., 17, 1371, 1989を参照のこと。リボザイムは、典型的には、

以下の2つの部分を有する：相補的塩基対合による標的RNAへのリボザイムの結合をガイドする触媒部分および結合配列。一旦リボザイムが標的RNAに結合すると、リボザイムは標的RNAを酵素切断し、典型的には、コードタンパク質の翻訳を指示する能力破壊する。リボザイムがそのRNA標的を切断した後、標的RNAから遊離し、その後別の標的と結合および切断することができる。すなわち、1つのリボザイム分子は新規の標的に対して繰り返し結合および切断することができる。したがって、リボザイム治療の1つの利点は、従来のアンチセンス療法と比較して少量の外因性RNAしか必要でないことである。さらに、リボザイムは、DNAベースのアンチセンスオリゴよりもmRNA標的への親和性が低いので、間違った標的に結合する傾向が低い。

【0206】

本発明によれば、リボザイムは、Ts g 101およびHIV GAGを含む1つまたは複数の相互作用タンパク質メンバーの任意のmRNA部分を標的することができる。リボザイム標的配列の選択方法ならびにリボザイムの設計および産生方法は、一般に、当分野で公知である。例えば、米国特許第4,987,071号、米国特許第5,496,698号、米国特許第5,525,468号、米国特許第5,631,359号、米国特許第5,646,020号、米国特許第5,672,511号、および米国特許第6,140,491号（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）を参照のこと。例えば、適切なリボザイムを、ハンマーモチーフ、ヘアピンモチーフ、肝炎ウイルスモチーフ、第I群イントロンモチーフ、またはRNAアーゼ PDNAモチーフなどの種々の構成で設計することができる。米国特許第4,987,071号、米国特許第5,496,698号、米国特許第5,525,468号、米国特許第5,631,359号、米国特許第5,646,020号、米国特許第5,672,511号、および米国特許第6,140,491号；Rossiら、AIDS Res. Human Retroviruses、8、183、1992；Hampel and Tritz、Biochemistry、28、4929、1989；Hampelら、Nucleic Acids Res.、18、299、1990；Perrotta and Been、Biochemistry、31、16、1992；およびGurrler-Takadaら、Cell、35、849、1983を参照のこと。

【0207】

リボザイムを、通常のRNA合成で使用する同一の方法によって合成することができる。例えば、このような方法は、Usmanら、J. Am. Chem. Soc.、109、7845～7854、1987およびScarlingeら、Nucleic Acids Res.、18、5433～5441、1990に開示されている。修飾リボザイムを、米国特許第5,652,094号；国際出願番号WO91/03162；WO92/07065、およびWO93/15187；欧州特許出願番号92110298.4；Perraultら、Nature、344、565、1990；Piekenら、Science、253、314、1991；およびUsman and Cedergren、Trends in Biochem. Sci.、17、334、1992に開示の方法によって合成することができる。

【0208】

本発明のリボザイムを、例えば、国際公開番号WO94/02595に開示の、任意の公知の方法によって細胞に投与することができる。例えば、リボザイムをインビトロで細胞もしくは組織に直接投与するか、任意の適切な経路（例えば、静脈内注射）で患者に投与することができる。あるいは、リボザイムを、イオン導入によるか、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセル、および生体接着マイクロスフェアなどの他の小胞への組み込みによってリボソーム中にカプセル化して送達することができる。さらに、リボザイムを、リボザイムRNAを直接転写することができるDNAベクターを使用した遺伝子治療アプローチによって送達することもできる。遺伝子治療は、セクション6.3.2で詳細に開示されている。

【0209】

10

20

30

40

50

5.4. 競合阻害

本発明によって同定された特定のタンパク質複合体およびその相互作用タンパク質メンバーの濃度および活性を、種々の他の方法によって阻害することもできる。例えば、タンパク質複合体の相互作用タンパク質メンバーの間のタンパク質-タンパク質相互作用を妨害または解離することができるセクション4.に記載の本発明によって同定された化合物を、インビトロで細胞もしくは組織に投与するか患者に投与することができる。T s g 1 0 1含有タンパク質複合体またはその相互作用メンバーに結合するセクション4.に記載のインビトロ結合アッセイで同定された化合物を、治療で使用することもできる。

【0210】

さらに、有用な作用因子は、不完全なタンパク質（すなわち、タンパク質複合体中の各結合パートナーに結合することができるがその細胞機能が欠損している相互作用タンパク質メンバーのフラグメント）を含む。例えば、タンパク質複合体の相互作用メンバータンパク質の結合ドメインを、タンパク質複合体活性の競合インヒビターとして使用することができる。当業者に明らかであるように、結合ドメインの誘導体またはホモログを使用することもできる。結合ドメインを、分子生物学的技術（例えば、酵母2ハイブリッドアッセイと組み合わせた変異誘発）を使用して容易に同定することができる。好ましくは、使用したタンパク質フラグメントは、全長タンパク質メンバーの90%、80%未満、より好ましくは75%、65%、50%未満または40%未満の長さの相互作用タンパク質メンバーのフラグメントである。1つの実施形態では、T s g 1 0 1に結合することができるH I V G A G p 6タンパク質フラグメントを投与する。例えば、適切なタンパク質フラグメントは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、20、または25、好ましくは4~30、40、または50個のアミノ酸またはそれ以上H I V G A G p 6配列の連続スパンを有し、T s g 1 0 1と相互作用することができるポリペプチドを含むことができる。また、適切なタンパク質フラグメントはまた、T s g 1 0 1に結合することができ、同一の長さのH I V G A GまたはG A G p 6のアミノ酸の連続スパンと少なくとも75%、80%、82%、85%、87%、90%、95%、またはそれ以上同一の4~30個のアミノ酸のアミノ酸配列を有するペプチドを含む。あるいは、H I V G A G p 6と相互作用することができ、T s g 1 0 1のアミノ酸配列の4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、20、または25個、好ましくは4~30、40、または50またはそれ以上のアミノ酸の連続スパンを有するポリペプチドを、投与することができる。また、適切な化合物の他の例には、H I V G A G p 6に結合することができ、同一の長さのT s g 1 0 1アミノ酸配列の連続スパンに少なくとも75%、80%、82%、85%、87%、90%、95%、またはそれ以上同一の4~30、40、50個のアミノ酸のアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。さらに、投与した化合物はまた、本発明のT s g 1 0 1、またはH I V G A G p 6、またはタンパク質複合体に免疫反応性を示す抗体または抗体フラグメント、好ましくは一本鎖抗体であり得る。

【0211】

競合インヒビターとして適切なタンパク質フラグメントを、直接的細胞内在化、受容体媒介エンドサイトーシス、または「輸送体」を介して細胞に送達させることができる。調整すべき標的タンパク質またはタンパク質複合体が細胞内に存在する場合、本発明の方法においてインビトロまたはインビボで細胞に投与した化合物は、最適な結果を得るために細胞に送達されることが好ましいことに留意すべきである。したがって、好ましくは、送達されるべき化合物を、標的タンパク質またはタンパク質複合体を有する細胞によって化合物の取り込みを増加させることができる輸送体と会合する。本明細書中で使用される、用語「輸送体」は、動物細胞、特にヒト細胞によって本発明の化合物の取り込みを促進することができる単位（例えば、化合物、化合物もしくは多数の異なる化合物の複数のコピーから形成された組成物または物理的構築物）をいう。典型的には、「輸送体」の存在下での本発明の化合物の細胞取り込みは、「輸送体」の非存在下での化合物の細胞取り込みの少なくとも20%以上、好ましくは少なくとも40%、50%、75%、より好ましくは少

なくとも100%高い。

【0212】

当分野で公知の多数の分子および構造を、「輸送体」として使用することができる。

【0213】

1つの実施形態では、輸送体としてペネトラチンを使用する。例えば、アンテナペディアのホメオドメイン(ショウジョウバエ転写因子)を、本発明の化合物を送達させるための輸送体として使用することができる。実際に、ペプチドのペネトラチンクラスの任意の適切なメンバーを使用して、本発明の化合物を細胞に輸送することができる。ペネトラチン類は、例えば、Derossiら、Trends Cell Biol., 8, 84~87, 1998(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に開示されている。ペネトラチンは、受容体依存性、エネルギー依存性、および細胞型依存性様式において有効に原形質膜または核膜を有効を通過して結合する分子を輸送する。オリゴヌクレオチドおよびポリペプチドを輸送するためのキャリアとしてのペネトラチンの使用方法もまた、米国特許第6,080,724号;Poogaら、Nat. Biotech., 16, 857, 1998;およびSchutzeら、J. Immunol., 157, 650, 1996(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に開示されている。米国特許第6,080,724号は、ペネトラチンの最低要件を、16個のアミノ酸からなり、そのうちの6~10個が疎水性であるペプチドと定義している。N末端またはC末端のいずれかから計算して第6位のアミノ酸はトリプトファンであり、N末端またはC末端のいずれかから計算して第3位および第5位のアミノ酸は、共にバリンである。好ましくは、ショウジョウバエアンテナペディアのホメオドメインのヘリックス3を、輸送体として使用する。より好ましくは、ホメオドメインアンテナペディアのアミノ酸43~58の配列を有するペプチドを、輸送体として使用する。さらに、ショウジョウバエアンテナペディアのホメオドメインのヘリックス3の他の天然に存在するホモログを使用することもできる。例えば、Fushi-tarazu and Engrailedのホメオドメインは、細胞内にペプチドを輸送することができることと示されている。Hanら、Mol. Cells, 10, 728~32, 2000を参照のこと。本明細書中で使用される、用語「ペネトラチン」はまた、ペネトラチンペプチドのペプトイド類似体を含む。典型的には、ペネトラチンペプチドおよびそのペプトイド類似体を、細胞に送達されるべき化合物と共有結合して、化合物の細胞取り込みを増大させる。

10

20

30

【0214】

別の実施形態では、HIV-1 tatタンパク質およびその誘導体を、本発明の化合物と共有結合した「輸送体」として使用する。高分子を細胞に送達させるためのHIV-1 tatタンパク質およびその誘導体の使用は、当分野で公知である。Green and Loewenstein、Cell, 55, 1179, 1988;Frankel and Pabo、Cell, 55, 1189, 1988;Vivesら、J. Biol. Chem., 272, 16010~16017, 1997;Schwarzeら、Science, 285, 1569~1572, 1999を参照のこと。細胞取り込みを担う配列は、高度に塩基性の領域(アミノ酸残基49~57)からなることが公知である。例えば、Vivesら、J. Biol. Chem., 272, 16010~16017, 1997;Wenderら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 13003~13008, 2000を参照のこと。塩基性ドメインにより、細胞膜の脂質二重層成分を標的化すると考えられる。このドメインにより、細胞型依存性様式で迅速に細胞膜を通過するためにタンパク質または核酸に共有結合する。この技術を使用して、インビトロおよびインビボの両方で種々の細胞型に15~120kDの範囲のタンパク質を送達させた。Schwarzeら、Science, 285, 1569~1572, 1999を参照のこと。ペプチドなどの高分子を輸送することができる任意のHIV tat由来のペプチドまたはそのペプトイド類似体を、本発明の目的に使用することができる。例えば、高度に塩基性の領域(アミノ酸残基49~57)を有する任意の天然のtatペプチドを、送達すべき化合物への共有結合による輸送体として使用することができる。さらに、

40

50

アミノ酸残基49～57のtatペプチドの種々の類似体もまた、本発明の目的のための有用な輸送体であり得る。このような種々の類似体の例は、Wenderら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97、13003～13008、2000（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）で開示されており、例えば、d-Tat_{49～57}、l-またはd-Tat_{49～57}のレトロインベルソ型（すなわち、l-Tat_{57～49}およびd-Tat_{57～49}）、L-アルギニンオリゴマー、D-アルギニンオリゴマー、L-リジンオリゴマー、D-リジンオリゴマー、L-ヒスチジンオリゴマー、D-ヒスチジンオリゴマー、L-オルニチンオリゴマー、D-オルニチンオリゴマー、ならびのその種々のホモログ、誘導體（例えば、小ペプチドと結合した結合体を含む修飾形態）、およびペプトイド類似体が含まれる。

10

【0215】

当分野で公知の他の有用な輸送体には、線維芽細胞成長因子由来の短ペプチド配列（Linら、J. Biol. Chem.、270、14255～14258、1998を参照のこと）、ガルパン（Poogaら、FASEB J.、12、67～77、1998を参照のこと）、およびHSV-1構造タンパク質VP22（Elliot and O'Hare、Cell、88、223～233、1997を参照のこと）が含まれるが、これらに限定されない。

【0216】

上記の種々の輸送体は、一般にペプチドであるので、競合タンパク質フラグメントに結合するペプチドに共有結合する輸送体ペプチドを含むような組換え発現によって都合よく融合タンパク質を作製することができる。あるいは、従来の方法を使用して、輸送体ペプチドまたは本発明のペプチドの両方を化学合成することができる。

20

【0217】

セクション5.に記載のように、ハイブリッドペプチドを含む適切な医薬組成物をインビトロで細胞に投与するか患者に投与することができる。

【0218】

ペプチドベースの輸送体に加えて、種々の他の輸送体型（カチオン性リポソーム（Ruiraら、J. Am. Chem. Soc.、120、11213～11218、1998）、デンドリマー（Konoら、Bioconjugate Chem.、10、1115～1121、1999）、シデロフフォア（Ghoshら、Chem. Biol.、3、1011～1019、1996）などが含まれるが、これらに限定されない）を使用することもできる。特定の実施形態では、本発明の化合物を、細胞送達用のリポソームにカプセル化する。

30

【0219】

あるいは、本発明の化合物がペプチドである場合、これを遺伝子治療法によって細胞に投与することができる。すなわち、ペプチドをコードする核酸を、インビトロで細胞に投与するか、インビボでヒトもしくは動物の身体に投与することができる。任意の適切な遺伝子治療法を、本発明の目的に使用することができる。種々の遺伝子治療法が当分野で周知であり、以下のセクション6.3.2.に記載している。最近、遺伝子治療の成功が報告された。例えば、Kayら、Nature Genet.、24、257～61、2000；Cavazzana-Calvoら、Science、288、669、2000；およびBlaeseら、Science、270、475、1995；Kantoffら、J. Exp. Med.、166、219、1987を参照のこと。

40

【0220】

5.5. 遺伝子治療

さらに別の実施形態では、遺伝子治療アプローチは、Tsg101をコードする遺伝子を「ノックアウト」するため、または遺伝子発現を減少するために使用する。例えば、遺伝子を、相同組換えによって異なる遺伝子配列または非機能性配列に置換するか、単純に欠失させることができる。別の遺伝子治療実施形態では、米国特許第5,641,670号（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に開示の方法を使用して、Ts

50

g 1 0 1 遺伝子発現を減少させることができる。本質的には、DNA構築物が外因性遺伝子に作動可能に連結されるように、少なくとも調節配列、エクソン、およびスプライドナー部位を有する外因性DNAを相同組換えによってT s g 1 0 1をコードする内因性遺伝子に移入することができる。結果として、内因性遺伝子の発現は、新規に移入した外因性調節配列によって調節される。したがって、外因性調節配列が強力な遺伝子発現リプレッサーである場合、相互作用タンパク質メンバーをコードする内因性遺伝子の発現が減少または遮断される。米国特許第5,641,670号、を参照のこと。

【0221】

種々の遺伝子治療法が、当分野で周知である。最近、遺伝子治療の成功が報告された。例えば、Kayら、Nature Genet., 24, 257~61, 2000; Cavazzana-Calvoら、Science, 288, 669, 2000; およびBlaeseら、Science, 270, 475, 1995; Kantoffら、J. Exp. Med., 166, 219, 1987を参照のこと。

10

【0222】

任意の適切な遺伝子治療法を、本発明の目的に使用することができる。一般に、遺伝子治療ベクターを使用して、内因性T s g 1 0 1 遺伝子の修飾に有用な核酸(外因性核酸)を輸送する。典型的には、ベクターは、部位特異的相同組換えを指示することができる核酸配列を含む。例えば、欠損T s g 1 0 1 タンパク質(例えば、HIV GAGp6に結合できない)をコードする外因性核酸を、遺伝子治療ベクター内に輸送することが好ましい。あるいは、ベクターは、相同組換えを行って内因性T s g 1 0 1 遺伝子を「ロックアウト」することができる内因性T s g 1 0 1 遺伝子の2つの末端に対応する配列を含み得る。

20

【0223】

1つの実施形態では、外因性核酸(遺伝子)を、プラスミドDNAベクターに組み込む。本発明で多数の市販の発現ベクターが有用であり得る(例えば、pCEP4、pcDNAI、pIND、pSecTag2、pVAX1、pcDNA3.1、およびpBI-E GFP、およびpDisplayを含む)。

【0224】

種々のウイルスベクターも使用することができる。典型的には、ウイルスベクターでは、ウイルスゲノムは、疾患を発症させる能力(例えば、宿主細胞中で複製する能力)を排除するように操作されている。患者に移入されるべき外因性核酸を、例えば、ウイルス感染性に不可欠でないウイルス遺伝子への挿入によって操作したウイルスゲノムに組み込むことができる。感染によって組織細胞に容易に移入することができるので、ウイルスベクターは扱いやすい。一旦宿主細胞に移入されると、組み合わせウイルスは、典型的には、宿主細胞のゲノムに組み込まれる。珍しいことであるが、組換えウイルスは複製して染色体外エレメントとして保持される場合がある。

30

【0225】

遺伝子治療用の多数のレトロウイルスベクターが開発されている。これらには、オンコレトロウイルス(例えば、MLV)、レンチウイルス(例えば、HIVおよびSIV)、および他のレトロウイルスが含まれる。例えば、遺伝子治療ベクターは、マウス白血病ウイルス(Cepkoら、Cell, 37, 1053~1062, 1984; Cone and Mulligan、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6349~6353, 1984を参照のこと)、マウス乳癌ウイルス(Salmonsら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 159, 1191~1198, 1984を参照のこと)、テナガザル白血病ウイルス(Millerら、J. Virology, 65, 2220~2224, 1991を参照のこと)に、HIV(Shimadaら、J. Clin. Invest., 88, 1043~1047, 1991を参照のこと)、トリレトロウイルス(Cossetら、J. Virology, 64, 1070~1078, 1990を参照のこと)に基づいて開発された。さらに、種々のレトロウイルスベクターは、米国特許第6,168,916号、米国特許第6,140,111号、米

40

50

国特許第6,096,534号、米国特許第5,985,655号、米国特許第5,911,983号、米国特許第4,980,286号、および米国特許第4,868,116号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)にも記載されている。

【0226】

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが、臨床試験で首尾よく試験されている。例えば、Kayら、Nature Genet., 24, 257~61、2000を参照のこと。AAVは、ヘルパーウイルスとしてアデノウイルスまたはヘルペスウイルスなどの他のウイルスを必要とする天然に存在する欠損ウイルスである。Muzyczka、Curr. Top. Microbiol. Immun., 158, 97、1992を参照のこと。遺伝子治療ベクターとして有用な組換えAAVウイルスは、米国特許第6,153,436号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)で開示されている。 10

【0227】

アデノウイルスベクターはまた、本発明の遺伝子治療の目的に有用であり得る。例えば、米国特許第6,001,816号は、肥満治療のために哺乳動物に静脈内からレプチン遺伝子を送達させるために使用するアデノウイルスベクターを開示している。他の組換えアデノウイルスベクターを使用することもできる(米国特許第6,171,855号、米国特許第6,140,087号、米国特許第6,063,622号、米国特許第6,033,908号、および米国特許第5,932,210号、およびRosenfeldら、Science, 252, 431、434、1991;およびRosenfeldら、Cell, 68, 143~155、1992に開示のベクターを含む)。 20

【0228】

他の有用なウイルスベクターには、組換えヘルペスウイルスベクター(例えば、米国特許第5,981,274号を参照のこと)および組換えエントモポックスウイルス(例えば、米国特許第5,721,352号および米国特許第5,753,258号を参照のこと)が含まれる。非伝統的ベクターを、本発明の目的で使用することもできる。例えば、国際公開番号WO94/18834は、送達すべきDNAの多価電解質との結合による複合体形成により哺乳動物細胞にDNAを送達する方法を開示している。複合体を、細胞に微量注入するか、細胞に取り込ませることができる。

【0229】

外因性核酸を、受容体媒介エンドサイトーシスによって細胞に移入することもできる。例えば、米国特許第6,090,619号;Wu and Wu、J. Biol. Chem., 263, 14621、1988;Curieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850、1991を参照のこと。例えば、米国特許第6,083,741号は、インテグリン受容体結合部分(例えば、配列RGDを有する環状ペプチド)に結合するポリカチオン部分(例えば、3~100個のリジン残基を有するポリL-リジン)への核酸の会合による哺乳動物細胞への外因性核酸の移入を開示している。 30

【0230】

あるいは、外因性核酸またはこれを含むベクターを、両親媒性物質を介して細胞に送達させることもできる。例えば、米国特許第6,071,890号を参照のこと。典型的には、外因性核酸または核酸を含むベクターは、カチオン性両親媒性物質と複合体を形成する。複合体に接触した哺乳動物細胞は、容易に複合体を取り込むことができる。 40

【0231】

外因性核酸を、当分野で公知の種々の方法によって遺伝子治療目的の患者に移入することができる。例えば、外因性遺伝子配列のみ、上記の複合体形態と組み合わせたもの、またはウイルスまたはDNAベクターに組み込んだものを、患者の適切な組織または器官への注射によって直接投与することができる。あるいは、カテーテルまたは類似のデバイスを、標的器官または組織への送達に使用することができる。適切なカテーテルは、米国特許第4,186,475号;米国特許第5,397,307号;米国特許第5,547,472号;米国特許第5,674,192号;および米国特許第6,129,705号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)で開示されている。 50

【0232】

さらに、外因性核酸または核酸を含むベクターを、リン酸カルシウム沈殿、微量注入、リポフェクション、エレクトロポレーション、遺伝子銃、受容体媒介エンドサイトーシスなどの公知の任意の技術を使用して単離細胞に移入することができる。外因性核酸を発現する細胞を選択し、例えば、注射または細胞移植によって患者に戻すことができる。患者に送達させる適量の細胞は、患者の条件、所望の効果によって変化し、これは当業者が決定することができる。例えば、米国特許第6,054,288号；米国特許第6,048,524号；および米国特許第6,048,729号を参照のこと。好ましくは、使用細胞は、自系である（すなわち、治療を受けた患者から得た細胞）。

【0233】

10

6. 医薬組成物および処方物

本発明の別の態様では、本発明のセクション6.に記載のように得た1つまたは複数の治療薬を含む医薬組成物も得られる。例えば、このような治療薬には、(1) Tsg101とHIV GAGもしくはGAGp6またはP(T/S)AP後期ドメインモチーフを含む別のレトロウイルスGAGとの間の相互作用を妨害することができる本発明のスクリーニング法に基づいて選択した有機小化合物、(2) Tsg101核酸（遺伝子またはmRNA）と特異的にハイブリッド形成するアンチセンス化合物、(3) Tsg101核酸（遺伝子またはmRNA）に特異的なリボザイム化合物、(4) Tsg101またはHIV GAGもしくはGAGp6またはP(T/S)AP後期ドメインモチーフを含む別のレトロウイルスGAGに免疫反応性を示す抗体、(5) 本発明のタンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体、(6) 本発明のタンパク質複合体に結合することができる小有機化合物、(7) Tsg101またはレトロウイルスGAGポリペプチドと相互作用することができる上記の（輸送体と作動可能に連結された）小ペプチド化合物、(8) 抗体またはペプチドをコードする核酸が含まれるが、これらに限定されない。患者への投与に適切な薬学的処方物として組成物を調製する。したがって、本発明はまた、1つまたは複数の本発明の治療薬を含む医薬組成物、医薬品、薬物、または他の組成物にまで及ぶ。

20

【0234】

医薬組成物では、本発明によって同定された活性化合物は、薬学的に許容可能な塩形態であり得る。本明細書中で使用される、用語「薬学的に許容可能な塩」は、化合物の無機または有機酸付加塩を含む本発明の化合物の比較的無毒の有機または無機塩をいう。このような塩には、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、硝酸塩、酢酸塩、リン酸塩、ホスホプロミド塩、ラウリル硫酸塩、グルコヘプトネート塩、シュウ酸塩、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、ステアリン酸塩、パルミチン酸塩、吉草酸塩、安息香酸塩、ナフチレート塩、メシル酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Bergereら、J. Pharm. Sci., 66, 1~19, 1977を参照のこと。

30

【0235】

経口送達のために、活性化合物を、薬学的に許容可能なキャリア（結合剤（例えば、ゼラチン、セルロース、トラガカントゴム）、賦形剤（例えば、デンプン、ラクトース）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、二酸化ケイ素）、崩壊剤（例えば、アルギニン酸塩、Primogel、およびコーンスターチ）、および甘味料または香料（例えば、グルコース、スクロース、サッカリン、サリチル酸メチル、およびペパーミント）など）を含む処方物に組み込むことができる。処方物を、封入したゼラチンカプセルまたは錠剤の形態で経口投与することができる。任意の従来技術でカプセルおよび錠剤を調製することができる。カプセルおよび錠剤を、風味、味、色、ならびにカプセルおよび錠剤の形態を変更するための当分野で公知の種々のコーティングでコートすることができる。さらに、脂肪油などの液体キャリアを、カプセルに封入することもできる。

40

【0236】

適切な経口処方物はまた、懸濁液、シロップ、チューインガム、ウエハー、およびエリキシルなどの形態であり得る。所望ならば、風味、味、色、ならびに特別な形態に変更する

50

ための従来の薬剤も含めることができる。さらに、嚥下が不可能な患者における経腸栄養チューブによる従来の投与のために、活性化合物を、オリーブ油、トウモロコシ油、およびヒマワリ油などの許容可能な新油性植物油賦形剤中に溶解することができる。

【0237】

活性化合物を、溶液もしくは懸濁液の形態、または使用前に溶液または懸濁液に変換することができる凍結乾燥形態で腹腔内投与することもできる。このような処方物では、滅菌水および生理食塩水緩衝液などの希釈剤または薬学的に許容可能なキャリアを使用することができる。他の従来の溶剤、pH緩衝液、安定剤、抗菌薬、界面活性剤、および抗酸化剤も全て含めることができる。例えば、有用な成分には、塩化ナトリウム、酢酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、リン酸緩衝液、グリセリン、デキストロース、不揮発油、メチルパラベン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、重硫酸ナトリウム、ベンジルアルコール、およびアスコルビン酸などが含まれる。非経口処方物を、バイアルおよびアンブルなどの従来の容器で保存することができる。

10

【0238】

局所投与経路には、鼻腔、口腔内、粘膜、直腸、または膺投与が含まれる。局所投与のために、活性化合物を、ローション、クリーム、軟膏、ゲル、粉末、ペースト、スプレー、懸濁液、ドロップ、およびエアロゾルに処方することができる。したがって、処方物に1つまたは複数の増粘剤、保湿剤、および安定剤を含めることができる。このような薬剤の例には、ポリエチレングリコール、ソルビトール、キサントガム、ペトロラタム、蜜蝋、または鉱物油、ラノリン、およびスクアレンなどが含まれるが、これらに限定されない。局所投与の特異的形態は、経皮パッチによる送達である。経皮パッチの調製方法は、例えば、Brownら、*Annual Review of Medicine*, 39, 221~229, 1988 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に開示されている。

20

【0239】

活性化合物の徐放のための皮下移植は、適切な投与経路であり得る。これは、皮下空間(例えば腹部前壁の真下)に活性化合物を含む任意の適切な処方物を移植するために手術を要する。例えば、Wilsonら、*J. Clin. Psych.*, 45, 242~247, 1984を参照のこと。活性化合物徐放のためのキャリアとしてヒドロゲルを使用することができる。ヒドロゲルは、一般に当分野で公知である。典型的には、高分子量の生体適合性ポリマーのネットワークへの架橋および水への浸漬によるゲル様材料の形成によってヒドロゲルを作製する。好ましくは、ヒドロゲルは、生体分解性または生体吸収性である。本発明の目的のために、ポリエチレングリコール、コラーゲン、またはポリ(グリコール酸-コ-L-乳酸)で作製したヒドロゲルが有用であり得る。例えば、Phillipsら、*J. Pharmaceut. Sci.*, 73, 1718~1720, 1984を参照のこと。

30

【0240】

活性化合物を、水溶性非免疫原性非ペプチド高分子量ポリマーと結合させて、ポリマー結合体を形成することもできる。例えば、活性化合物を、ポリエチレングリコールと共有結合させて結合体を形成する。典型的には、このような結合体は、溶解性および安定性が向上し、毒性および免疫原性が減少する。したがって、患者に投与した場合、結合体中の活性化合物の体内半減期は延長され、より良好な有効性を示す。一般に、Burnham、*Am. J. Hosp. Pharm.*, 15, 210~218, 1994を参照のこと。現在、タンパク質置換治療および他の治療のためにPEG化タンパク質が使用されている。例えば、PEG化インターフェロン(PEGk-INTRON(登録商標))は、B型肝炎治療に臨床的に使用されている。PEG化アデノシンデアミナーゼ(ADAGEN(登録商標))は、重症複合型免疫不全症(SCIDS)の治療で使用されている。PEG化L-アスパラギナーゼ(ONCAPSPAR(登録商標))は、急性リンパ性白血病(ALL)の治療で使用されている。ポリマーと活性化合物および/またはポリマー自体との共有結合は、生理学的条件下で加水分解することが好ましい。「プロドラッグ」としても

40

50

公知のこのような化合物は、体内で活性化化合物を容易に放出することができる。活性化化合物の徐放を、活性成分の当分野で一般に公知のマクロカプセル、ナノカプセル、またはヒドロゲルへの組み込みによって行うことができる。

【0241】

本発明の活性化化合物のキャリアとしてリポソームを使用することもできる。リポソームは、コレステロール、リン脂質、脂肪酸、およびその誘導体などの種々の脂質から作製されたミセルである。種々の修飾脂質も使用することができる。リポソームは、活性化化合物の毒性を軽減し、安定性を増大させることができる。有効成分を含むリポソーム懸濁液の調製方法は、当分野で一般に公知である。例えば、米国特許第4,522,811号; Prescott編、Methods in Cell Biology、第XIV巻、Academic Press, New York, N.Y., 1976を参照のこと。

10

【0242】

他の有効成分が本発明の活性化化合物の効果を妨害するか悪影響を与えない限り、活性化化合物を、同一の症状を相乗的に治療または予防し、治療を受ける患者の別の疾患または症状に有効な別の有効成分と組み合わせて投与することができる。このような他の有効成分には、抗炎症薬、抗ウイルス薬、抗菌薬、抗真菌薬、抗凝固薬、心血管薬、コレステロール低下薬、抗癌薬、および高血圧薬などが含まれるが、これらに限定されない。

【0243】

一般に、治療薬の毒性プロフィールおよび治療有効性を、細胞モデルまたは動物モデルにおける標準的な薬学的手順(例えば、セクション7に記載の手順)によって決定することができる。当分野で公知のように、LD₅₀は、試験集団の約50%が死亡する用量を示し、ED₅₀は、試験集団の約50%で治療が有効な用量を示すパラメータである。LD₅₀およびED₅₀を、細胞モデルおよび動物モデルで決定することができる。さらに、疾患または障害の症状の最大阻害の約50%を達成する有効性を示す循環血漿濃度を示すIC₅₀を細胞モデルおよび動物モデルで得ることもできる。ヒト臨床試験用の投薬量範囲の設計でこのようなデータを使用することができる。典型的には、当業者に明らかであるように、ヒトの投薬量範囲を、投薬範囲の中央値をおおよそED₅₀および/またはIC₅₀とするが、LD₅₀は細胞または動物モデルから得られた値より有意に低くなるように設計すべきである。本発明の医薬組成物に含められる各活性化化合物の治療有効量は、要因(使用化合物の活性、患者の体内での活性化化合物の安定性、緩和すべき病態の重症度、患者の総体重、投与経路、吸収しやすさ、活性化化合物の体内での分布および排泄、年齢、および患者の治療感受性などが含まれるが、これらに限定されない)によって変化し得ることが当業者に明らかである。長期間で種々の要因が変化するにつれて、投与量を調整することもできる。

20

30

【実施例1】

【0244】

[1. 酵母2ハイブリッドシステム]

酵母2ハイブリッドシステムの原理および方法は、「酵母2ハイブリッドシステム」、Bartel and Fields編、p.138~196、Oxford University Press、New York、NY、1997に詳述されている。したがって、以下は、本発明者らは使用した特定の手順の記載である。

40

【0245】

ベイトタンパク質HIV GAG p6をコードするcDNAは、HIV-1 NY5/BRU単離物に由来していた。次いで、cDNA産物を、組換えによって酵母発現ベクターpGBT-Q(ポリリンカー部位をM13配列決定部位を含むように改変したpGBT-C(Barterら、Nat. Genet., 12, 72~77, 1996を参照のこと)の密接な誘導体である)に移入した。新規の構築物を、トリプトファン合成を駆動する能力について酵母PNY200株(この株の遺伝子型; MAT trp1-9011e u2-3, 112ura3-52his3-200ade2gal4 gal80)で直接選択した。これらの酵母細胞では、転写因子Gal4(アミノ酸1~147)のDNA

50

結合ドメインを含むC末端融合タンパク質としてベイトを産生した。

【0246】

プレライブラリー（例えば、ヒト脾臓cDNAライブラリー）を、酵母BK100株（この株の遺伝子型：MATatrp1-901leu2-3, 112ura3-52his3-200gal4 gal80LYS2::GAL-HIS3GAL2-ADE2met2::GAL7-lacZ）に形質転換し、ロイシン合成を駆動する能力について選択した。これらの酵母細胞では、転写因子Gal4（アミノ酸768～881）の転写活性化ドメインおよび9アミノ酸血球凝集素エプタグを含む融合タンパク質として各cDNAを発現した。ベイトを発現するPNY200細胞（MAT交配型）を、プレライブラリーからプレタンパク質を発現するBK100細胞（MATa交配型）交配させた。ベイトタンパク質と相互作用するタンパク質を発現する得られた二倍体酵母細胞を、トリプトファン、ロイシン、ヒスチジン、およびアデニンを合成する能力について選択した。各クローンからDNAを調製し、エレクトロポレーションによって大腸菌KC8株（Clontech KC8エレクトロコンピテント細胞、カタログ番号C2023-1）に形質転換し、トリプトファン（ベイトプラスミド選択用）またはロイシン（ライブラリープラスミド選択用）のいずれかが存在しないアンピシリン含有プレートで細胞を選択した。両プラスミドのDNAを調製し、ジデオキシヌクレオチド鎖末端法によって配列決定した。ベイトcDNAインサートの同一性を確認し、プレライブラリープラスミド由来のcDNAインサートを、公的なヌクレオチドおよびタンパク質データベースの検索用のBLASTプログラムを使用して同定した。次いで、プレライブラリー由来のプラスミドを、ラミンおよびGal4 DNA結合ドメインにそれぞれ融合した5つの他の試験タンパク質の合成を駆動するプラスミドと共にそれぞれ酵母細胞に形質転換した。 - ガラクトシダーゼアッセイで正のシグナルを発したクローンを、偽陽性とみなし、破棄した。残りのクローンのプラスミドを、元のベイトプラスミドと共に酵母細胞に形質転換した。 - ガラクトシダーゼアッセイで正のシグナルを発したクローンを真の陽性とみなした。

10

20

【0247】

表1に示したHIV GAGp6配列を、上記の酵母2ハイブリッドシステムで使用した。単離したTsg101プレ配列を、表1にまとめる。ベイトおよびプレタンパク質のGenBank寄託番号も表1に示し、その際にベイト配列とプレ配列を並べた。

30

【実施例2】

【0248】

[2. タンパク質複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体の産生]
HIV GAGp6およびTsg101のUEVドメインを、ヒト宿主細胞中で組換えによって発現させ、単離および精製する。2つの精製された相互作用タンパク質（フラグメント）の混合によってタンパク質複合体を形成する。組換え発現したインタクトな完全Tsg101とHIV GAGp6との混合によって、タンパク質複合体も形成する。2つのタンパク質複合体を、免疫マウスにおける抗原として使用する。免疫マウス脾臓細胞からmRNAを単離し、第1のcDNA鎖をmRNAに基づいて合成する。適切なプライマーを使用したPCRによって合成したcDNAからV_HおよびV_K遺伝子を増幅させる。

40

【0249】

増幅V_HおよびV_K遺伝子を互いにライゲートし、ファージディスプレイライブラリーの構築のためにファージミドベクターにサブクローン化する。大腸菌細胞をライゲーション混合物で形質転換し、ファージディスプレイライブラリーを確立する。あるいは、ライゲートしたV_HおよびV_K遺伝子を、V_HおよびV_K配列がT7プロモーターの調節下におかれるリポゾームディスプレイに適切なベクターにサブクローン化する。Schaffitzelら、J. Immun. Meth., 231, 119～135, 1999を参照のこと。

【0250】

Tsg101-HIV GAGp6複合体ならびに各Tsg101およびHIV GAG

50

p 6でライブラリーをスクリーニングする。数ラウンドのスクリーニングを行うことが好ましい。T s g 1 0 1 - H I V G A G p 6複合体に結合するが、各T s g 1 0 1およびH I V G A G p 6に結合しないs c F vフラグメントに対応するクローンを選択および精製する。1つの精製クローンを使用して、T s g 1 0 1 - H I V G A G p 6複合体に選択的に免疫反応性を示す抗体を調製する。次いで、抗体を、R I AおよびE L I S Aなどの免疫化学的方法によって評価する。

【0251】

さらに、T s g 1 0 1 - H I V G A G p 6複合体に結合し、T s g 1 0 1および/またはH I V G A G p 6にも結合するs c F vフラグメントに対応するクローンを選択することができる。クローン中のs c F v遺伝子を、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発、変異性PCR (Lin - Goerkeら、B i o t e c h n i q u e s、23、409、1997を参照のこと)、d N T P類似体 (Z a c c o l oら、J . M o l . B i o l .、255、589、1996を参照のこと) などの変異誘発、および他の方法によって変異させる。変化クローンを、ファージディスプレイまたはリボゾームディスプレイライブラリーでさらにスクリーニングする。この様式では、T s g 1 0 1 - H I V G A G p 6複合体に選択的に免疫反応性を示すs c F vフラグメントを得ることができる。

10

【実施例3】

【0252】

[3. T s g 1 0 1 - H I V G A G p 6相互作用とH I V出芽との相関関係]
酵母2ハイブリッドシステムを使用して、T s g 1 0 1とH I V G A G p 6との間の相互作用に及ぼすH I V G A G p 6のP T A Pモチーフ中でのアミノ酸置換変異の影響を決定した。酵母2ハイブリッド活性化ドメイン (T s g 1 0 1構築物) を調製するために、ヒト胎児脳c D N AライブラリーからPCRによってG e n B a n k 寄託番号U 8 2 1 3 0によるT s g 1 0 1の全長コード配列を含むDNAフラグメントを獲得し、活性化ドメイン親プラスミドG A D p N 2のE c o R I / P s t I部位 (L E U 2、C E N 4、A R S 1、A D H 1 p - S V 4 0 N L S - G A L 4 (768 - 881) - M C S (多クローニング部位) - P G K 1 t、A m p R、C o l E 1 _ o r i) にクローン化する。

20

【0253】

酵母2ハイブリッドDNA結合ドメイン (H I V 1 G A G p 6構築物) を調製するために、H I V 1 . N L 4 3株G A Gタンパク質由来のH I V 1 G A G p 6ペプチドに対応するDNAフラグメントを、N L 4 3含有プラスミドR 9 a p aからPCRによって獲得し、結合ドメイン親プラスミドp G B T . QのE c o R I / S a l I部位にクローン化した。

30

【0254】

以下のアミノ酸置換変異を、PCRによって上記の酵母2ハイブリッド結合ドメイン (H I V 1 G A G p 6構築物) 中のH I V 1 G A G p 6配列に移入した。変異体を、DNA配列分析によって評価した。このような変異を、以下の表2にまとめる。

【0255】

【表2】

試験したG A G p 6タンパク質の変異

40

変異構築物	PTAPモチーフ周辺のGAGp6ペプチド配列														
P6/wt	S	R	P	E	P	T	A	P	P	E	E	S	F	R	F
P6/E6G				G											
P6/P7L					L										
P6/A9R							R								
P6/P10L								L							

【0256】

50

変異の効果を試験するために、Clontechから購入した酵母Y189株細胞(ur a 3 - 5 2 h i s 3⁺ 2 0 0 a d e 2 - 1 0 1 t r p 1 - 9 0 1 l e u 2 - 3 , 1 1 2 m e t g a l 4 g a l 8 0 U R A 3 : : G A L 1 p - l a c Z) を、活性化ドメインTsg101構築物および結合ドメイン(変異GAGp6構築物)または結合ドメイン(野生型GAGp6構築物)のいずれか1つと同時形質転換した。フィルターを使用した形質転換酵母コロニーのリフティングによって - Gal 活性についてのフィルターリフトアッセイを行い、凍結融解によって酵母細胞を溶解し、溶解細胞をX-Galに接触させた。陽性 - Gal 活性は、GAGp6野生型または変異タンパク質がTsg101と相互作用することを示す。全結合ドメイン構築物も - Gal 活性の自己活性化について試験した。結果を、以下の表3に示す。

10

【0257】

【表3】

Tsg101とGAGp6との間の相互作用

	P6/wt	P6/E6G	P6/P7L	P6/A9R	P6/P10L
Tsg101	+	+	-	-	-
P6/wt	-				
P6/E6G		-			
P6/P7L			-		
P6/A9R				-	
P6/P10L					-

20

【0258】

したがって、表3で明らかなように、HIV GAGp6のPTAPモチーフの変異により、Tsg101とHIV GAGp6との間の相互作用が破壊される一方で、PTAPモチーフの外側のP6/E6G変異によりTsg101-GAGp6相互作用は排除されなかった。

【0259】

Tsg101とHIV野生型GAGp6(WT)またはGAGp6PTAP変異体との間の相互作用を、液体培養 - ガラクトシダーゼアッセイによってさらに定量した。培養物を96ウェルプレートの合成培地(-Leu、-Trp、+グルコース)中で一晩成長させ、光学密度を標準化し、6x溶解/基質溶液を含む6xZ緩衝液(60mMのKCl、6mMのMgSO₄、360mMのNa₂HPO₄、240mMおNaH₂PO₄、6mg/mlのCPRG、0.12U/mlのリガーゼ、0.075%のNP-40)の添加によって溶解した。培養物を、37で2時間インキュベートし、遠心分離によって清澄化し、各上清の光学密度を測定した(575nm)。2ハイブリッド液体培養アッセイでの全長Tsg101結合野生型p6により、高レベルの - ガラクトシダーゼ活性(バックグラウンドの300倍超)が得られた。3つの異なるp6点変異を使用して、Tsg101結合相互作用がHIV-1p6内のPTAP後期ドメインモチーフを必要とするかどうか、および3つ全て(P6L、A9R、およびP10L)が、バックグラウンドレベルまで - ガラクトシダーゼ活性を減少させるかどうかを試験した。これらの各点変異により、後期のHIV-1出芽を停止させる(Huangら、1995)。これらの結果は、HIV GAGp6とヒト細胞タンパク質Tsg101との間の相互作用がウイルス出芽に不可欠であるという仮説と一致する。

30

40

【実施例4】

【0260】

[4.インビトロ結合アッセイ]

HIV-1 GAGp6ドメインに融合したGSTタグを含む融合タンパク質を、組換えによって発現し、クロマトグラフィーによって精製した。さらに、第1の14アミノ酸残基を含むGAGp6ペプチド(「p6(1-14)」)を、標準的なペプチド合成法によ

50

って化学合成した。ペプチドを、従来のタンパク質精製技術（例えば、クロマトグラフィ）によって精製した。

【0261】

Nunc / Nalgene Maxisorp プレートを、精製 GST - p6 および 50 mM の炭酸塩 (pH = 9.6) を含む 100 μ l のタンパク質結合溶液 4 で一晩または室温で 1 ~ 2 時間インキュベートした。これにより、GST - p6 融合タンパク質がプレートに付着する。プレート中の液体を空にし、ウェルの 400 μ l / ウェルのブロッキング緩衝液 (SuperBlock; Pierce - Endogen, Rockford, IL) で満たした。室温で 1 時間のインキュベーション後、シヨウジョウバエ S2 細胞溶解物 myc タグ化 Tsg101 (残基 1 ~ 207) および所定量の p6 (1 ~ 14) ペプチドを含む 100 μ l の混合物を、プレートのウェルに適用した。この混合物を室温で 2 時間反応させて、p6 : Tsg101 タンパク質 - タンパク質複合体を形成させた。次いで、プレートを、100 μ l の 1x PBST 溶液 (Invitrogen; Carlsbad, CA) で 4 回洗浄した。洗浄後、1 μ g / ml の抗 myc - モノクローナル抗体 (Clone 9E10; Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN) を含む 1x PBST 溶液を 100 μ l プレートのウェルに添加して、Tsg101 タンパク質に対して myc - エピトープタグを検出した。次いで、プレートを、100 μ l の 1x PBST 溶液で 4 回洗浄し、100 μ l の 1 μ l / ml 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗マウス IgG (Jackson Immunoresearch Labs; West Grove, Pennsylvania) の 1x PBST 溶液を、プレートのウェルに添加して、結合したマウス抗 myc - 抗体を検出した。次いで、プレートを、100 μ l の 1x PBST 溶液で 4 回洗浄し、100 μ l の蛍光基質 (QuantaBlue; Pierce - Endogen, Rockford, IL) を、全ウェルに添加した。30 分後、100 μ l の停止溶液を各ウェルに添加して、HRP 機能を阻害した。次いで、Packard Fusion 装置にて励起波長 325 nm および発光波長 420 nm でプレートを測定した。蛍光シグナルが存在することは、固定した GST - p6 と Tsg101 の結合を示す。対照的に、蛍光シグナルが存在しないことは、PX₁PX₂P 含有短ペプチドが Tsg101 と HIV p6 との間の相互作用を破壊することができることを示す。

【0262】

異なる濃度の p6 (1 ~ 14) ペプチドを試験し、異なる濃度のこれらから得られた蛍光シグナルの強度を、ペプチド濃度に対してプロットした。競合阻害曲線を、図 2 に示す。2 つの Dixon プロットを、それぞれ図 3 および図 4 に示す。

【実施例 5】

【0263】

[5. HIV GAG p6 と Tsg101 との間の相互作用の小分子インヒビターを同定するための酵母スクリーニング]

- ガラクトシダーゼを、サッカロミセス・セレビジエにおけるプラスミドから発現した酵母 2 ハイブリッドタンパク質対の間の相互作用を示すためのレポーター酵素として使用する。プラスミド Mp364 (LEU2CEN4ARS1ADH1p - SV40NLS - GAL4 (768 - 881) - Tsg101 (1 - 390) - PGK1tAmpRCole1__ori) および Mp206 (TRP1CEN4ARSADH1p - GAL4 (1 - 147) - HIV1__gag (448 - 500) - ADH1tAmpRCole1__ori) を保有する酵母 MY209 株 (ade2his3leu2trp1cyh2ura3 :: GAL1p - lacZgal4gal80lys2 :: GAL1p - HIS3) を、ロイシンおよびトリプトファンを欠く合成完全培地 (SC - Leu - Trp) 中、30 で一晩培養する。この培養物を、SC - Leu - Trp 培地を使用して OD₆₃₀ が 0.01 になるまで希釈する。希釈された MY209 培養物を、96 ウェルマイクロプレートに分注する。小分子ライブラリー由来の化合物をマイクロプレートに添加し、試験化合物の最終濃度は、約 60 μ M である。アッセイプレートを 30 で一晩インキュベートする。

翌日、濃縮基質 / 溶解緩衝液のアリコートを、各ウェルに添加し、37℃で1～2時間インキュベートする。適当な時間で、停止溶液のアリコートを各ウェルに添加して、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させる。全マイクロプレートについて吸光度を測定して、酵素基質由来の産物の産生をアッセイする。HIV p6およびTsg101との間の相互作用の推定インヒビターの存在により、MY209によって産生された β -ガラクトシダーゼシグナルが阻害された。さらなる試験により、酵母細胞成長への影響により β -ガラクトシダーゼ発現を減少させた化合物および無関係なタンパク質対の相互作用によって発生した β -グルコシダーゼシグナルに影響を与えた非特異的インヒビターを排除する。

【0264】

ヒット（すなわち、ウイルスと細胞タンパク質との間の相互作用を阻害する化合物）が一旦得られると、化合物を同定し、化合物をいくつかの濃度でアッセイして、 IC_{50} 値（これは、本実施例に記載の2ハイブリッドアッセイで認められたシグナルがインヒビターの非存在下で認められるシグナルの50%である化合物の濃度である）を決定する。

10

【0265】

本明細書中に記載の全ての刊行物および特許出願は、本発明に属する当業者の水準を示す。全ての刊行物および特許出願が、各刊行物または特許出願が明確に且つ個別に参考として組み込まれるのと同程度に、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0266】

上記の発現は、理解を明白にするための例示および実施例によって幾らか詳細に記載されているが、添付の特許請求の範囲の範囲内で一定の変更および修正を行うことができることが明らかである。

20

【図面の簡単な説明】

【0267】

【図1】異なる後期ドメインモチーフを使用したウイルスによる出芽についての提案された経路をまとめた図である。

【図2】HIV Gag p6の最初の14アミノ酸残基を有するp6(1～14)ペプチドがGST-p6とmyc-Tsg101(1～207)との間のタンパク質-タンパク質相互作用を阻害することができることを示す競合阻害曲線を示す図である。

【図3】GST-p6とmyc-Tsg101(1～207)との間の相互作用のp6(1～14)阻害を示すDixonプロットを示す図である。

30

【図4】GST-p6とmyc-Tsg101(1～207)との間の相互作用のp6(1～14)阻害を示す別のDixonプロットを示す図である。

【 図 1 】

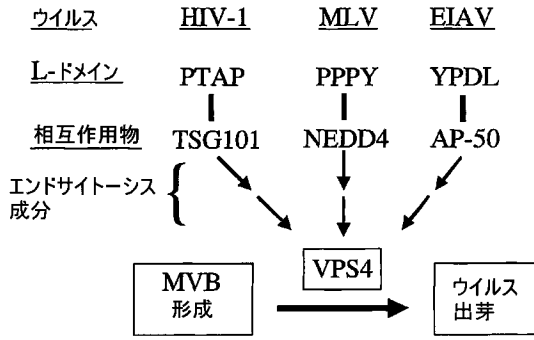


Figure 1

【 図 2 】

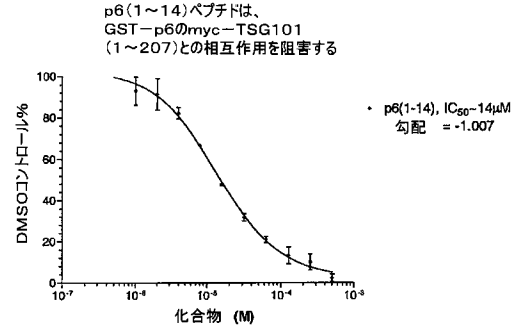


Figure 2

【 図 3 】

p6/TSG101(1~207)に対するp6(1~14)のDixonプロット

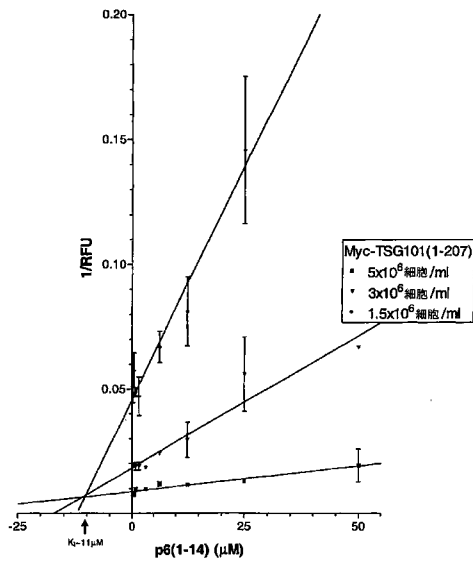
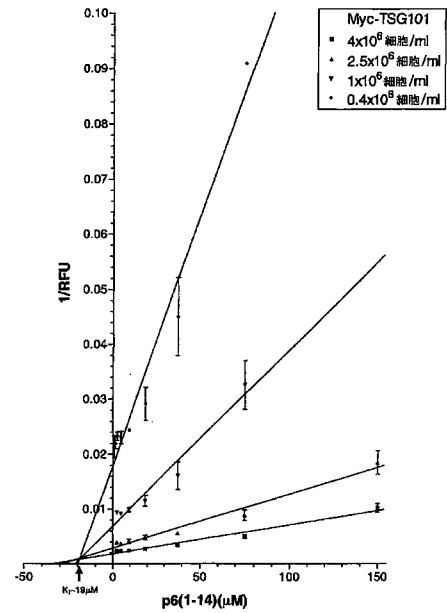


Figure 3

【 図 4 】

GST-p6/Myc-TSG101相互作用に対するp6(1~14)のDixonプロット



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

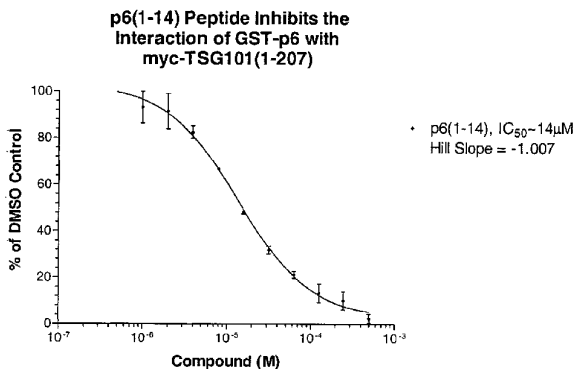
(10) International Publication Number
WO 02/072790 A2

(51) International Patent Classification: C12N
 (21) International Application Number: PCT/US02/08146
 (22) International Filing Date: 14 March 2002 (14.03.2002)
 (25) Filing Language: English
 (26) Publication Language: English
 (30) Priority Data:
 60/276,259 14 March 2001 (14.03.2001) US
 09/972,035 4 October 2001 (04.10.2001) US
 09/971,549 4 October 2001 (04.10.2001) US
 (71) Applicant (for all designated States except US): MYRIAD GENETICS, INC [US/US]; 320 Wakara Way, Salt Lake City, UT 84108 (US).
 (72) Inventors; and
 (75) Inventors/Applicants (for US only): WETTSTEIN, Daniel, Albert [US/US]; 1208 East 900 South, Salt Lake City, UT 84105 (US). MORHAM, Scott [US/US]; 1337
 Roosevelt Avenue, Salt Lake City, UT 84105 (US). ZAVITZ, Kenton [US/US]; 321 North "I" Street, Salt Lake City, UT 84103 (US).
 (74) Agents: ZHANG, Jay, Z. et al.; Myriad Genetics, Inc., 320 Wakara Way, Salt Lake City, UT 84108 (US).
 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LI, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NB, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: TSG101-GAG INTERACTION AND USE THEREOF

WO 02/072790 A2



(57) Abstract: Isolated protein complexes are provided comprising Tsg101 and HIV GAG or GAGp6. The protein complexes are useful in screening assays for selecting compounds effective in modulating the Tsg101-HIV GAG or GAGp6 interaction within the protein complexes.

WO 02/072790 A2 

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations: AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
— of inventorship (Rule 4.17(iii)) for US only

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

TSG101-GAG INTERACTION AND USE THEREOF

Technical Field

The present invention generally relates to protein-protein interactions, and use
5 thereof in drug screen and disease treatment.

Background of the Invention

In contrast with the traditional view of protein function, which focuses on the
action of a single protein molecule, a modern expanded view of protein function defines a
10 protein as an element in an interaction network. *See Eisenberg et al., Nature, 405:823-
826 (2000).* That is, a full understanding of the functions of a protein will require
knowledge of not only the characteristics of the protein itself, but also its interactions or
connections with other proteins in the same interacting network. In essence, protein-
protein interactions form the basis of almost all biological processes, and each biological
15 process is composed of a network of interacting proteins. For example, cellular
structures such as cytoskeletons, nuclear pores, centrosomes, and kinetochores are
formed by complex interactions among a multitude of proteins. Many enzymatic
reactions are associated with large protein complexes formed by interactions among
enzymes, protein substrates, and protein modulators. In addition, protein-protein
20 interactions are also part of the mechanisms for signal transduction and other basic
cellular functions such as DNA replication, transcription, and translation. For example,
the complex transcription initiation process generally requires protein-protein interactions

WO 02/072790

PCT/US02/08146

among numerous transcription factors, RNA polymerase, and other proteins. *See e.g.*, Tjian and Maniatis, *Cell*, 77:5-8 (1994).

Because most proteins function through their interactions with other proteins, if a test protein interacts with a known protein, one can reasonably predict that the test
5 protein is associated with the functions of the known protein, e.g., in the same cellular structure or same cellular process as the known protein. Thus, interaction partners can provide an immediate and reliable understanding towards the functions of the interacting proteins. By identifying interacting proteins, a better understanding of disease pathways and the cellular processes that result in diseases may be achieved, and important
10 regulators and potential drug targets in disease pathways can be identified.

There has been much interest in protein-protein interactions in the field of proteomics. A number of biochemical approaches have been used to identify interacting proteins. These approaches generally employ the affinities between interacting proteins to isolate proteins in a bound state. Examples of such methods include
15 coimmunoprecipitation and copurification, optionally combined with cross-linking to stabilize the binding. Identities of the isolated protein interacting partners can be characterized by, e.g., mass spectrometry. *See e.g.*, Rout *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 148:635-651 (2000); Houry *et al.*, *Nature*, 402:147-154 (1999); Winter *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:517-529 (1997). A popular approach useful in large-scale screening is the phage display
20 method, in which filamentous bacteriophage particles are made by recombinant DNA technologies to express a peptide or protein of interest fused to a capsid or coat protein of the bacteriophage. A whole library of peptides or proteins of interest can be expressed and a bait protein can be used to screen the library to identify peptides or proteins capable of binding to the bait protein. *See e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484;
25 5,571,698; and 5,837,500. Notably, the phage display method only identifies those proteins capable of interacting in an *in vitro* environment, while the coimmunoprecipitation and copurification methods are not amenable to high throughput screening.

The yeast two-hybrid system is a genetic method that overcomes certain
30 shortcomings of the above approaches. The yeast two-hybrid system has proven to be a powerful method for the discovery of specific protein interactions *in vivo*. *See generally*,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Bartel and Fields, eds., *The Yeast Two-Hybrid System*, Oxford University Press, New York, NY, 1997. The yeast two-hybrid technique is based on the fact that the DNA-binding domain and the transcriptional activation domain of a transcriptional activator contained in different fusion proteins can still activate gene transcription when they are
5 brought into proximity to each other. In a yeast two-hybrid system, two fusion proteins are expressed in yeast cells. One has a DNA-binding domain of a transcriptional activator fused to a test protein. The other, on the other hand, includes a transcriptional activating domain of the transcriptional activator fused to another test protein. If the two test proteins interact with each other *in vivo*, the two domains of the transcriptional
10 activator are brought together reconstituting the transcriptional activator and activating a reporter gene controlled by the transcriptional activator. See, e.g., U.S. Patent No. 5,283,173.

Because of its simplicity, efficiency and reliability, the yeast two-hybrid system has gained tremendous popularity in many areas of research. In addition, yeast cells are
15 eukaryotic cells. The interactions between mammalian proteins detected in the yeast two-hybrid system typically are bona fide interactions that occur in mammalian cells under physiological conditions. As a matter of fact, numerous mammalian protein-protein interactions have been identified using the yeast two-hybrid system. The identified proteins have contributed significantly to the understanding of many signal
20 transduction pathways and other biological processes. For example, the yeast two-hybrid system has been successfully employed in identifying a large number of novel mammalian cell cycle regulators that are important in complex cell cycle regulations. Using known proteins that are important in cell cycle regulation as baits, other proteins involved in cell cycle control were identified by virtue of their ability to interact with the
25 baits. See generally, Hannon *et al.*, in *The Yeast Two-Hybrid System*, Bartel and Fields, eds., pages 183-196, Oxford University Press, New York, NY, 1997. Examples of mammalian cell cycle regulators identified by the yeast two-hybrid system include CDK4/CDK6 inhibitors (e.g., p16, p15, p18 and p19), Rb family members (e.g., p130), Rb phosphatase (e.g., PP1- α 2), Rb-binding transcription factors (e.g., E2F-4 and E2F-5),
30 General CDK inhibitors (e.g., p21 and p27), CAK cyclin (e.g., cyclin H), and CDK Thr161 phosphatase (e.g., KAP and CDI1). See *id* at page 192. "[T]he two-hybrid

WO 02/072790

PCT/US02/08146

approach promises to be a useful tool in our ongoing quest for new pieces of the cell cycle puzzle." *See id* at page 193.

The yeast two-hybrid system can be employed to identify proteins that interact with a specific known protein involved in a disease pathway, and thus provide valuable
5 understandings of the disease mechanism. The identified proteins and the protein-protein interactions they participate are potential drug targets for use in selecting new drugs for treating the disease.

Human immunodeficiency virus (HIV) infection causes the acquired immunodeficiency syndrome (commonly known as AIDS). HIV is a retrovirus that
10 primarily infects T cells expressing the CD4 glycoprotein, i.e., CD4⁺ T-cells, which are also known as helper T-cells. HIV virus multiplies in helper T-cells and quickly destroys the host helper T-cells, resulting in cellular immunity depression and leaving the infected patient susceptible to opportunistic infections, malignancies and various other pathological conditions. Ultimately, HIV infection can cause depletion of helper T-cells
15 and collapse of a patient's immune defenses. Not surprisingly, HIV-infected individuals and AIDS patients typically develop AIDS-related conditions such as AIDS-related complex (ARC), progressive generalized lymphadenopathy (PGL), dementia, tropical paraparesis, Kaposi's sarcoma, thrombocytopenia purpura, herpes infection, cytomegalovirus infection, Epstein-Barr virus related lymphomas among others. In any
20 case, the HIV viruses in an infected individual are infectious and can be transmitted to other people through blood transfusion or sexual contacts.

There has been a great deal of effort in the past fifteen years or so in developing methods and pharmaceutical compounds for treating HIV infection and AIDS. The therapeutic approaches have been mostly focused on a limited number of drug targets,
25 namely HIV reverse transcriptase, HIV protease, and HIV integrase. A number of reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors have been developed or marketed. Examples of nucleoside reverse transcriptase inhibitors include Zidovudine, Stavudine, Lamivudine, and ddI. Examples of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors include Efavirenz, Delavirdine, and Abacavir. In addition, a number of HIV protease
30 inhibitors are commercially available including Ritonavir, Nelfinavir, Indinavir and Saquinavir.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

However, HIV typically undergoes active mutations as it multiplies. In addition, there are extensive genetic variations in HIV partly due to high mutation rate. Therefore, mutations in HIV reverse transcriptase and protease arise frequently in infected individuals and render the virus resistant to the inhibitor administered to patients.

5 Combination therapy, generally referred to as HAART (highly active anti-retroviral therapy), has been developed in which a combination of different anti-HIV inhibitors is administered to a patient. However, viral resistance to combination therapies still frequently develops.

In addition, many of the anti-HIV compounds known in the art have other serious
10 drawbacks. For example, the reverse transcriptase inhibitors such as AZT and ddI are fairly toxic and cause serious side effects in patients treated with such compounds. Therefore, although limited success for controlling HIV infection and AIDS has been achieved with previously developed anti-HIV compounds, there is a need for alternative therapeutic approaches that overcome the shortcomings of currently available drugs.

15

Summary of the Invention

It has been discovered that human tumor susceptibility gene 101 ("Tsg101") interacts with HIV GAGp6. Particularly, the interaction between Tsg101 and HIV GAG is essential for HIV budding from host cells. Thus, the protein complexes formed by
20 Tsg101 and HIV GAG or GAGp6, as well as Tsg101 alone, can be used in screening assays to select compounds capable of modulating the functions and activities of Tsg101 and the protein complexes containing Tsg101 and HIV GAG or GAGp6. The identified compounds can be useful in inhibiting lentivirus propagation, particularly HIV propagation, and in treating HIV infection and AIDS.

25 Accordingly, in accordance with a first aspect of the present invention, an isolated protein complex is provided having a first protein which is Tsg101 or a homologue or derivative or fragment thereof interacting with a second protein which is HIV GAG polypeptide or a homologue or derivative or fragment thereof. In a preferred embodiment, the first protein is a fusion protein containing (a) Tsg101 or (b) a Tsg101
30 homologue or (c) a Tsg101 fragment. In another preferred embodiment, the second

WO 02/072790

PCT/US02/08146

protein can be a fusion protein containing (a) HIV GAG polypeptide or (b) an HIV GAG homologue or (c) an HIV GAG fragment.

In another aspect of the invention, an isolated protein complex is provided having a first protein which is Tsg101 or a homologue or derivative or fragment thereof
5 interacting with a second protein which is HIV GAGp6 or a homologue or derivative or fragment thereof. In a preferred embodiment, the first protein is a fusion protein containing (a) Tsg101 or (b) a Tsg101 homologue or (c) a Tsg101 fragment. In another preferred embodiment, the second protein is a fusion protein containing (a) HIV GAGp6 polypeptide or (b) an HIV GAGp6 homologue or (c) an HIV GAGp6 fragment.

10 The present invention also provides an isolated protein complex comprising: (a) a first protein which is selected from group consisting of (i) Tsg101 protein, (ii) a Tsg101 protein homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of Tsg101 and capable of interacting with HIV GAGp6, (iii) a Tsg101 protein fragment containing the Tsg101 UEV domain, and (iv) a fusion protein containing said Tsg101
15 protein, said Tsg101 protein homologue or said Tsg101 protein fragment; and (b) a second protein selected from the group consisting of (1) HIV GAG polypeptide, (2) an HIV GAG polypeptide homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of HIV GAG polypeptide and capable of interacting with Tsg101, (3) HIV GAGp6, (4) an HIV GAGp6 homologue having an amino acid sequence at least 90%
20 identical to that of HIV GAGp6 polypeptide and capable of interacting with Tsg101, (5) an HIV GAGp6 fragment capable of interacting with Tsg101, and (6) a fusion protein containing said HIV GAG polypeptide, said HIV GAG polypeptide homologue, said HIV GAGp6 protein, said HIV GAGp6 homologue or said HIV GAGp6 fragment. In specific embodiments, the HIV GAGp6 fragment has a contiguous span of at least 10 amino acid
25 residues of a naturally occurring HIV GAGp6, said contiguous span containing a P(T/S)AP late domain motif. Preferably, the HIV GAGp6 fragment contains an amino acid sequence selected from the group of SEQ ID NOs:25-32.

The present invention further provides an isolated protein complex comprising a first protein which is Tsg101 or a homologue or derivative or fragment thereof interacting
30 with a second protein which is a retrovirus GAG polypeptide containing a P(T/S)AP late domain motif or a homologue or derivative or fragment of said retrovirus GAG

WO 02/072790

PCT/US02/08146

polypeptide. Preferably, the retrovirus is a lentivirus. More preferably, the retrovirus is a primate lentivirus such as a virus selected from the group consisting of HIV-1, HIV-2, HIV-3, and simian immunodeficiency viruses. The lentivirus can also be a non-primate lentivirus selected from the group consisting of bovine lentiviruses, feline lentiviruses, and ovine/caprine lentiviruses. Thus, an isolated protein complex can include:

- 5 (a) a first protein which is selected from group consisting of
- (i) Tsg101 protein,
 - (ii) a Tsg101 protein homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of Tsg101 and capable of interacting with HIV GAGp6,
 - 10 (iii) a Tsg101 protein fragment containing the Tsg101 UEV domain, and
 - (iv) a fusion protein containing said Tsg101 protein, said Tsg101 protein homologue or said Tsg101 protein fragment; and

- (b) a second protein selected from the group consisting of
- 15 (1) a retrovirus GAG polypeptide having the P(T/S)AP late domain motif,
 - (2) a homologue of said retrovirus GAG polypeptide, said homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of said retrovirus GAG polypeptide and capable of interacting with Tsg101,
 - (3) a fragment of said retrovirus GAG polypeptide, said fragment being 20 capable of interacting with Tsg101, and
 - (4) a fusion protein containing said retrovirus GAG polypeptide, said retrovirus GAG polypeptide homologue or said retrovirus GAG polypeptide fragment.

In another specific embodiment, an isolated protein complex can include:

- (a) a first protein which is selected from group consisting of
- 25 (i) Tsg101 protein,
 - (ii) a Tsg101 protein homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of Tsg101 and capable of interacting with HIV GAGp6,
 - (iii) a Tsg101 protein fragment containing the Tsg101 UEV domain, and
 - (iv) a fusion protein containing said Tsg101 protein, said Tsg101 protein 30 homologue or said Tsg101 protein fragment; and
- (b) a second protein selected from the group consisting of

WO 02/072790

PCT/US02/08146

- (1) a primate lentivirus GAG polypeptide,
(2) a primate lentivirus GAG polypeptide homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of said primate lentivirus GAG polypeptide and capable of interacting with Tsg101,
5 (3) a primate lentivirus GAGp6 protein,
(4) a primate lentivirus GAGp6 homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of HIV GAGp6 polypeptide and capable of interacting with Tsg101,
10 (5) a primate lentivirus GAGp6 fragment capable of interacting with Tsg101, and
(6) a fusion protein containing said primate lentivirus GAG polypeptide, said primate lentivirus GAG polypeptide homologue, said primate lentivirus GAGp6 protein, said primate lentivirus GAGp6 homologue or said primate lentivirus GAGp6 fragment.

15 In yet another aspect, the present invention also provides a method for making the protein complexes of the present invention. The method includes the steps of providing the first protein and the second protein in the protein complexes of the present invention and contacting said first protein with said second protein. In addition, the protein complexes can be prepared by isolation or purification from tissues and cells or produced
20 by recombinant expression of their protein members.

The present invention further relates to a fusion protein having a first polypeptide covalently linked to a second polypeptide, wherein said first polypeptide is Tsg101 or a homologue or fragment thereof, and wherein said second polypeptide is HIV GAG or a homologue or fragment thereof. Isolated nucleic acids encoding the fusion protein are
25 also provided.

In yet another aspect of the present invention, antibodies immunoreactive with the protein complexes of the present invention are provided. In one embodiment, an antibody is selectively immunoreactive with a protein complex of the present invention. In another embodiment, a bifunctional antibody is provided which has two different
30 antigen binding sites, each being specific to a different interacting protein member in a protein complex of the present invention. The antibodies of the present invention can

WO 02/072790

PCT/US02/08146

take various forms including polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies, antibody fragments such as Fv fragments, single-chain Fv fragments (scFv), Fab' fragments, and F(ab')₂ fragments. Preferably, the antibodies are partially or fully humanized antibodies. The antibodies of the present invention can be readily prepared
5 using procedures generally known in the art. For example, recombinant libraries such as phage display libraries and ribosome display libraries may be used to screen for antibodies with desirable specificities. In addition, various mutagenesis techniques such as site-directed mutagenesis and PCR diversification may be used in combination with the screening assays.

10 The present invention further relates to protein microchips comprising one or more of the protein complexes of the present invention and/or one or more antibodies according to the present invention. Such protein microchips can be useful in large-scale high throughput screening assays involving the protein complexes.

In yet another aspect of the present invention, screening methods are provided for
15 selecting modulators of a protein complex formed between Tsg101 or a homologue, derivative or fragment thereof and HIV GAG or a homologue, derivative or fragment thereof. Screening methods are also provided for selecting modulators of Tsg101. The compounds identified in the screening methods of the present invention can be used in studying the interaction between Tsg101 and HIV GAG and understanding the
20 mechanism of HIV viral propagation. The selected compounds may also be useful in preventing or ameliorating diseases or disorders such as viral infection, particularly HIV infection and AIDS.

Thus, test compounds may be screened in an *in vitro* binding assay to select
compounds capable of binding a protein complex of the present invention or Tsg101. In
25 addition, *in vitro* dissociation assays may also be employed to select compounds capable of dissociating the protein complexes identified in accordance with the present invention. An *in vitro* screening assay may also be used to select compounds that trigger or initiate the formation of, or stabilize, a protein complex of the present invention. In preferred
embodiments, *in vivo* assays such as yeast two-hybrid assays and various derivatives
30 thereof, preferably reverse two-hybrid assays, are utilized in selecting compounds that interfere with or disrupt protein-protein interactions between Tsg101 or a homologue,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

derivative or fragment thereof and HIV GAGp6 or a homologue, derivative or fragment thereof. In addition, systems such as yeast two-hybrid assays are also useful in selecting compounds capable of triggering or initiating, enhancing or stabilizing protein-protein interactions between Tsg101 or a homologue, derivative or fragment thereof and HIV GAGp6 or a homologue, derivative or fragment thereof.

Thus, in one embodiment, the screening method includes the steps of contacting the first and second proteins of the protein complexes of the present invention in the presence of one or more test compounds, and detecting the interaction between said first protein and said second protein. Preferably, the first and second proteins are fusion proteins having a detectable tag. The methods can be conducted in a substantially cell free environment or in a host cell, preferably in yeast cells.

In a preferred embodiment, the screening method includes: (a) providing in a host cell a first fusion protein having Tsg101 or a homologue or derivative or fragment thereof, and a second fusion protein having a retroviral GAG (e.g. HIV GAG) or homologue or derivative or fragment thereof, wherein a DNA binding domain is fused to one of the first and second proteins while a transcription-activating domain is fused to the other of said first and second proteins; (b) providing in said host cell a reporter gene, wherein the transcription of the reporter gene is determined by the interaction between the first protein and the second protein; (c) allowing said first and second fusion proteins to interact with each other within said host cell in the presence of a test compound; and (d) determining the presence or absence of expression of said reporter gene.

In accordance with another aspect of the present invention, a host cell is provided comprising:

(a) a first expression cassette having a promoter operably linked to a nucleic acid encoding a first protein, said first protein being selected from group consisting of

- (i) Tsg101 protein,
- (ii) a Tsg101 protein homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of Tsg101 and capable of interacting with HIV GAGp6,
- (iii) a Tsg101 protein fragment containing the Tsg101 UEV domain, and
- (iv) a fusion protein containing said Tsg101 protein, said Tsg101 protein homologue or said Tsg101 protein fragment; and

WO 02/072790

PCT/US02/08146

(b) a second expression cassette having a promoter operably linked to a nucleic acid encoding a second protein selected from the group consisting of

(1) a retrovirus GAG polypeptide having the P(T/S)AP late domain motif,

5 (2) a homologue of said retrovirus GAG polypeptide, said homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of said retrovirus GAG polypeptide and capable of interacting with Tsg101,

(3) a fragment of said retrovirus GAG polypeptide, said fragment being capable of interacting with Tsg101, and

10 (4) a fusion protein containing said retrovirus GAG polypeptide, said retrovirus GAG polypeptide homologue or said retrovirus GAG polypeptide fragment.

In a preferred embodiment, the second protein is selected from the group consisting of

15 (1) HIV GAG polypeptide,

(2) a HIV GAG polypeptide homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of HIV GAG polypeptide and capable of interacting with Tsg101,

(3) HIV GAGp6 protein,

20 (4) a HIV GAGp6 homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of HIV GAGp6 polypeptide and capable of interacting with Tsg101,

(5) a HIV GAGp6 fragment capable of interacting with Tsg101, and

(6) a fusion protein containing said HIV GAG polypeptide, said HIV GAG polypeptide homologue, said HIV GAGp6 protein, said HIV GAGp6 homologue or said
25 HIV GAGp6 fragment.

In another preferred embodiment of the host cell of the present invention, one of said first and second nucleic acids is linked to a nucleic acid encoding a DNA binding domain, and the other of said first and second nucleic acids is linked to a nucleic acid encoding a transcription-activation domain, whereby two fusion proteins can be produced
30 in said host cell. Preferably, the host cell further comprises a reporter gene, wherein the

WO 02/072790

PCT/US02/08146

expression of the reporter gene is determined by the interaction between the first protein and the second protein.

The present invention further relates to a method for providing a compound capable of interfering with an interaction between the first and second proteins in the protein complexes of the present invention, which comprises the steps of providing
5 atomic coordinates defining a three-dimensional structure of a protein complex, and designing or selecting compounds capable of interfering with the interaction between said first protein and said second protein based on said atomic coordinates.

In addition, the present invention also provides a method for selecting a
10 compound capable of inhibiting a protein-protein interaction between Tsg101 and HIV GAGp6, which comprises:

contacting a test compound with a protein selected from group consisting of

- (i) Tsg101 protein,
- (ii) a Tsg101 protein homologue having an amino acid sequence at least
15 90% identical to that of Tsg101 and capable of interacting with HIV GAGp6,
- (iii) a Tsg101 protein fragment containing the Tsg101 UEV domain, and
- (iv) a fusion protein containing said Tsg101 protein, said Tsg101 protein homologue or said Tsg101 protein fragment; and

determining whether said test compound is capable of binding said protein. In a
20 preferred embodiment, the method further includes testing a selected test compound capable of binding said protein for its ability to interfere with a protein-protein interaction between Tsg101 and HIV GAGp6, and optionally further testing a selected test compound capable of binding said protein for its ability to inhibit HIV viral budding from an HIV-infected host cell.

The present invention further provides a method for selecting a compound
25 capable of inhibiting a protein-protein interaction between Tsg101 and a retroviral GAG containing a P(T/S)AP motif. The method comprises (a) providing atomic coordinates defining a three-dimensional structure of a protein selected from group consisting of (i) Tsg101 protein, (ii) a Tsg101 protein homologue having an amino acid sequence at least
30 90% identical to that of Tsg101 and capable of interacting with HIV GAGp6, (iii) a Tsg101 protein fragment containing the Tsg101 UEV domain, and (iv) a fusion protein

WO 02/072790

PCT/US02/08146

containing said Tsg101 protein, said Tsg101 protein homologue or said Tsg101 protein fragment; and (b) designing or selecting compounds capable of interacting with said protein based on said atomic coordinates. In a preferred embodiment, the method further includes a step of testing a selected compound capable of interacting with said protein for its ability to interfere with a protein-protein interaction between Tsg101 and the retroviral GAG, particularly HIV GAGp6, and optionally a step of testing a selected test compound capable of interacting with said protein for its ability to inhibit viral budding, particularly HIV viral budding from an HIV-infected host cell.

The present invention also provides methods for modulating, in mammalian cells, a protein complex comprising Tsg101 and a retroviral GAG containing a P(T/S)AP late domain motif. In a specific embodiment, the retroviral GAG is HIV GAG. The methods can be used to inhibit viral budding, particularly HIV viral budding from infected host cells. Inhibition of viral budding prevents the viruses from being released from the infected host cells thereby suppressing further viral propagation. Accordingly, the present invention also encompasses methods of treating viral infection, particularly HIV infection, and methods of treating and preventing AIDS in patients.

In one embodiment, the concentration of a protein complex having Tsg101 interacting with the retroviral GAG is reduced in cells. Various methods can be employed to reduce the concentration of the protein complex. The protein complex concentration can be reduced by interfering with the interaction between Tsg101 and the retroviral GAG (e.g., HIV GAG). For example, compounds capable of interfering with interactions between Tsg101 and HIV GAG can be administered to cells *in vitro* or *in vivo* in a patient. Such compounds can be small organic molecules capable of binding Tsg101 protein, particularly the UEV domain of Tsg101 protein, or HIV GAGp6. They can also be antibodies immunoreactive with the Tsg101 protein or HIV GAGp6. Preferably, antibodies that bind to the UEV domain of the Tsg101 protein are used. Also, the compounds can be small peptides derived from the HIV GAGp6 protein or mimetics thereof capable of binding Tsg101, or small peptides derived from the Tsg101 protein or mimetics thereof capable of binding HIV GAGp6.

In another embodiment, the methods include inhibiting the expression of the Tsg101 protein and/or HIV GAG protein. The inhibition can be at the transcriptional,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

translational, or post-translational level. For example, antisense compounds and ribozyme compounds can be administered to human cells *in vitro* or in human bodies.

In yet another embodiment, an antibody selectively immunoreactive with a protein complex having Tsg101 interacting with the retroviral GAG (e.g. HIV GAG) is administered to cells *in vitro* or in human bodies to inhibit the protein complex activities and/or reduce the concentration of the protein complex in the cells or patient.

The present invention provides a method for treating HIV infection and AIDS that is distinct from the therapeutic approaches heretofore known in the art. The method is targeted at a cellular protein of the host cells as well as its interaction with a viral protein. The interaction is required for HIV budding from the infected host cells. Accordingly, it is less likely that HIV will develop viral resistance to the treatment according to the present invention.

The foregoing and other advantages and features of the invention, and the manner in which the same are accomplished, will become more readily apparent upon consideration of the following detailed description of the invention taken in conjunction with the accompanying examples, which illustrate preferred and exemplary embodiments.

Brief Description of The Drawings

Figure 1 is a diagram summarizing the proposed pathways for the budding by viruses using different late domain motifs;

Figure 2 is a competitive inhibition curve showing that the p6(1-14) peptide having the first 14 amino acid residues of HIV GAGp6 is capable of inhibiting protein-protein interaction between GST-p6 and myc-Tsg101(1-207);

Figure 3 is a Dixon plot showing p6(1-14) inhibition of the interaction between GST-p6 and myc-Tsg101(1-207);

Figure 4 is another Dixon plot showing p6(1-14) inhibition of the interaction between GST-p6 and myc-Tsg101(1-207).

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Detailed Description of the Invention**1. Definitions**

The terms "polypeptide," "protein," and "peptide" are used herein interchangeably to refer to amino acid chains in which the amino acid residues are linked by peptide bonds or modified peptide bonds. The amino acid chains can be of any length of greater than two amino acids. Unless otherwise specified, the terms "polypeptide," "protein," and "peptide" also encompass various modified forms thereof. Such modified forms may be naturally occurring modified forms or chemically modified forms. Examples of modified forms include, but are not limited to, glycosylated forms, phosphorylated forms, myristoylated forms, palmitoylated forms, ribosylated forms, acetylated forms, ubiquitinated forms, etc. Modifications also include intra-molecular crosslinking and covalent attachment to various moieties such as lipids, flavin, biotin, polyethylene glycol or derivatives thereof, etc. In addition, modifications may also include cyclization, branching and cross-linking. Further, amino acids other than the conventional twenty amino acids encoded by genes may also be included in a polypeptide.

The term "protein fragment" as used herein means a polypeptide that represents a portion of a protein. When a protein fragment exhibits interactions with another protein or protein fragment, the two entities are said to interact through interaction domains that are contained within the entities.

As used herein, the term "interacting" or "interaction" means that two protein domains, fragments or complete proteins exhibit sufficient physical affinity to each other so as to bring the two "interacting" protein domains or proteins physically close to each other. An extreme case of interaction is the formation of a chemical bond that results in continual and stable proximity of the two domains. Interactions that are based solely on physical affinities, although usually more dynamic than chemically bonded interactions, can be equally effective in co-localizing two proteins. Examples of physical affinities and chemical bonds include but are not limited to, forces caused by electrical charge differences, hydrophobicity, hydrogen bonds, van der Waals force, ionic force, covalent linkages, and combinations thereof. The state of proximity between the interacting domains or entities may be transient or permanent, reversible or irreversible. In any

WO 02/072790

PCT/US02/08146

event, it is in contrast to and distinguishable from contact caused by natural random movement of two entities. Typically although not necessarily, an "interaction" is exhibited by the binding between the interacting domains or entities. Examples of interactions include specific interactions between antigen and antibody, ligand and
5 receptor, enzyme and substrate, and the like.

An "interaction" between two protein domains, fragments or complete proteins can be determined by a number of methods. For example, an interaction can be determined by functional assays such as the two-hybrid systems. Protein-protein interactions can also be determined by various biochemical approaches based on the
10 affinity binding between the two interacting partners. Such biochemical methods generally known in the art include, but are not limited to, protein affinity chromatography, affinity blotting, immunoprecipitation, and the like. The binding constant for two interacting proteins, which reflects the strength or quality of the interaction, can also be determined using methods known in the art. *See* Phizicky and
15 Fields, *Microbiol. Rev.*, 59:94-123 (1995).

As used herein, the term "domain" means a functional portion, segment or region of a protein, or polypeptide. "Interaction domain" refers specifically to a portion, segment or region of a protein, polypeptide or protein fragment that is responsible for the physical affinity of that protein, protein fragment or isolated domain for another protein,
20 protein fragment or isolated domain.

As used herein, the term "protein complex" means a composite unit that is a combination of two or more proteins formed by interaction between the proteins. Typically but not necessarily, a "protein complex" is formed by the binding of two or more proteins together through specific non-covalent binding affinities. However,
25 covalent bonds may also be present between the interacting partners. For instance, the two interacting partners can be covalently crosslinked so that the protein complex becomes more stable.

The term "isolated protein complex" means a protein complex present in a composition or environment that is different from that found in nature in its native or
30 original cellular or body environment. Preferably, an "isolated protein complex" is separated from at least 50%, more preferably at least 75%, most preferably at least 90%

WO 02/072790

PCT/US02/08146

of other naturally co-existing cellular or tissue components. Thus, an "isolated protein complex" may also be a naturally existing protein complex in an artificial preparation or a non-native host cell. An "isolated protein complex" may also be a "purified protein complex", that is, a substantially purified form in a substantially homogenous preparation
5 substantially free of other cellular components, other polypeptides, viral materials, or culture medium, or when the protein components in the protein complex are chemically synthesized, chemical precursors or by-products associated with the chemical synthesis. A "purified protein complex" typically means a preparation containing preferably at least 75%, more preferably at least 85%, and most preferably at least 95% a particular protein
10 complex. A "purified protein complex" may be obtained from natural or recombinant host cells or other body samples by standard purification techniques, or by chemical synthesis.

The terms "hybrid protein," "hybrid polypeptide," "hybrid peptide," "fusion protein," "fusion polypeptide," and "fusion peptide" are used herein interchangeably to
15 mean a non-naturally occurring protein having a specified polypeptide molecule covalently linked to one or more polypeptide molecules which do not naturally link to the specified polypeptide. Thus, a "hybrid protein" may be two naturally occurring proteins or fragments thereof linked together by a covalent linkage. A "hybrid protein" may also be a protein formed by covalently linking two artificial polypeptides together. Typically
20 but not necessarily, the two or more polypeptide molecules are linked or "fused" together by a peptide bond forming a single non-branched polypeptide chain.

As used herein, the term "homologue," when used in connection with a first native protein or fragment thereof that is discovered, according to the present invention, to interact with a second native protein or fragment thereof, means a polypeptide that
25 exhibits an amino acid sequence homology and/or structural resemblance to the first native interacting protein, or to one of the interacting domains of the first native protein such that it is capable of interacting with the second native protein. Typically, a protein homologue of a native protein may have an amino acid sequence that is at least 50%, preferably at least 75%, more preferably at least 80%, 85%, 86%, 87%, 88% or 89%,
30 even more preferably at least 90%, 91%, 92%, 93% or 94%, and most preferably 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the native protein. Examples of homologues may be

WO 02/072790

PCT/US02/08146

the ortholog proteins of other species including animals, plants, yeast, bacteria, and the like. Homologues may also be selected by, e.g., mutagenesis in a native protein. For example, homologues may be identified by site-specific mutagenesis in combination with assays for detecting protein-protein interactions, e.g., the yeast two-hybrid system
5 described below, as will be apparent to skilled artisans apprised of the present invention.

For purposes of comparing two different nucleic acid or polypeptide sequences, one sequence (test sequence) may be described to be a specific "percent identical to" another sequence (reference sequence) in the present disclosure. In this respect, when the length of the test sequence is less than 90% of the length of the reference sequence, the
10 percentage identity is determined by the algorithm of Myers and Miller, *Bull. Math. Biol.*, 51:5-37 (1989) and Myers and Miller, *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):11-7 (1988). Specifically, the identity is determined by the ALIGN program, which is available at <http://www2.igh.cnrs.fr> maintained by IGH, Montpellier, FRANCE. Typically the default parameters should be used. A modified form of the ALIGN program may also be
15 used.

Where the length of the test sequence is at least 90% of the length of the reference sequence, the percentage identity is determined by the algorithm of Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-77 (1993), which is incorporated into the various BLAST programs. Specifically, the percentage identity is determined by the "BLAST 2
20 Sequences" tool, which is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>. See Tatusova and Madden, *FEMS Microbiol. Lett.*, 174(2):247-50 (1999). For pairwise DNA-DNA comparison, the BLASTN 2.1.2 program is used with default parameters (Match: 1; Mismatch: -2; Open gap: 5 penalties; extension gap: 2 penalties; gap x_dropoff: 50; expect: 10; and word size: 11, with filter). For pairwise protein-protein
25 sequence comparison, the BLASTP 2.1.2 program is employed using default parameters (Matrix: BLOSUM62; gap open: 11; gap extension: 1; x_dropoff: 15; expect: 10.0; and wordsize: 3, with filter).

The term "derivative," when used in connection with a first native protein (or fragment thereof) that is discovered, according to the present invention, to interact with a
30 second native protein (or fragment thereof), means a modified form of the first native protein prepared by modifying the side chain groups of the first native protein without

WO 02/072790

PCT/US02/08146

changing the amino acid sequence of the first native protein. The modified form, i.e., the derivative should be capable of interacting with the second native protein. Examples of modified forms include glycosylated forms, phosphorylated forms, myristylated forms, ribosylated forms, ubiquitinated forms, and the like. Derivatives also include hybrid or
5 fusion proteins containing a native protein or a fragment thereof. Derivatives can be prepared using any known techniques and tested for their interaction with the second native protein.

The term "antibody" as used herein encompasses both monoclonal and polyclonal antibodies that fall within any antibody classes, e.g., IgG, IgM, IgA, or derivatives
10 thereof. The term "antibody" also includes antibody fragments including, but not limited to, Fab, F(ab')₂, and conjugates of such fragments, and single-chain antibodies comprising an antigen recognition epitope. In addition, the term "antibody" also means humanized antibodies, including partially or fully humanized antibodies. An antibody may be obtained from an animal, or from a hybridoma cell line producing a monoclonal
15 antibody, or obtained from cells or libraries recombinantly expressing a gene encoding a particular antibody.

The term "selectively immunoreactive" as used herein means that an antibody is reactive thus binds to a specific protein or protein complex, but not other similar proteins or fragments or components thereof.

20 The term "compound" as used herein encompasses all types of organic or inorganic molecules, including but not limited proteins, peptides, polysaccharides, lipids, nucleic acids, small organic molecules, inorganic compounds, and derivatives thereof.

Unless otherwise specified, the term "Tsg101" as used herein means human Tsg101 protein. Unless otherwise specified, the term "HIV GAG" as used herein means
25 HIV GAG protein. Unless otherwise specified, the term "HIV GAGp6" as used herein means HIV GAGp6 protein.

As used herein, the term "HIV infection" generally encompasses infection of a host animal, particularly a human host, by the human immunodeficiency virus (HIV) family of retroviruses including, but not limited to, HIV I, HIV II, HIV III, and the like.
30 Thus, treating HIV infection will encompass the treatment of a person who is a carrier of any of the HIV family of retroviruses or a person who is diagnosed of active AIDS, as

WO 02/072790

PCT/US02/08146

well as the treatment or prophylaxis of the AIDS-related conditions in such persons. A carrier of HIV may be identified by any methods known in the art. For example, a person can be identified as a HIV carrier on the basis that the person is anti-HIV antibody positive, or is HIV-positive, or has symptoms of AIDS. That is, "treating HIV infection" should be understood as treating a patient who is at any one of the several stages of HIV infection progression, which, for example, include acute primary infection syndrome (which can be asymptomatic or associated with an influenza-like illness with fevers, malaise, diarrhea and neurologic symptoms such as headache), asymptomatic infection (which is the long latent period with a gradual decline in the number of circulating CD4⁺ T cells), and AIDS (which is defined by more serious AIDS-defining illnesses and/or a decline in the circulating CD4 cell count to below a level that is compatible with effective immune function). In addition, "treating or preventing HIV infection" will also encompass treating suspected infection by HIV after suspected past exposure to HIV by e.g., blood transfusion, exchange of body fluids, bites, accidental needle stick, or exposure to patient blood during surgery.

The term "treating AIDS" means treating a patient who exhibits more serious AIDS-defining illnesses and/or a decline in the circulating CD4 cell count to below a level that is compatible with effective immune function. The term "treating AIDS" also encompasses treating AIDS-related conditions, which means disorders and diseases incidental to or associated with AIDS or HIV infection such as AIDS-related complex (ARC), progressive generalized lymphadenopathy (PGL), anti-HIV antibody positive conditions, and HIV-positive conditions, AIDS-related neurological conditions (such as dementia or tropical paraparesis), Kaposi's sarcoma, thrombocytopenia purpura and associated opportunistic infections such as *Pneumocystis carinii* pneumonia, *Mycobacterial tuberculosis*, esophageal candidiasis, toxoplasmosis of the brain, CMV retinitis, HIV-related encephalopathy, HIV-related wasting syndrome, etc.

Thus, the term "preventing AIDS" as used herein means preventing in a patient who has HIV infection or is suspected to have HIV infection or is at risk of HIV infection from developing AIDS (which is characterized by more serious AIDS-defining illnesses and/or a decline in the circulating CD4 cell count to below a level that is compatible with effective immune function) and/or AIDS-related conditions.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

2. Protein Complexes

Novel protein-protein interactions have been discovered and confirmed using yeast two-hybrid systems. In particular, it has been discovered that Tsg101 interacts with HIV GAGp6. Binding regions of Tsg101 and HIV GAGp6 discovered in yeast two-hybrid systems are summarized in Table 1. The GenBank accession numbers for the gene sequences and amino acid sequences of Tsg101 and HIV GAGp6 are noted in Table 1 below.

Table 1: Binding Regions of HIV Gag and Tsg101

Bait Protein	Bait		Prey Protein	Prey	
	AA Coordinates			AA Coordinates	
	Start	End		Start	End
HIV Gag (GenBank Accession No. AF324493)	449	500	Tumor Suppressor Gene 101 (Tsg101) (GenBank Accession No. U82130)	7	390

10

2.1. Tsg101 Is Involved in HIV Viral Budding

Tumor susceptibility gene 101 (Tsg101) was originally identified as a 381 amino acid polypeptide involved in tumorigenesis. Tsg101 can be localized in the nucleus and in the cytoplasm depending on the stage of cell cycle. Tsg101 interacts with stathmin, a cytosolic phosphoprotein implicated in tumorigenesis, and overexpression of a Tsg101 anti-sense transcript in NIH-3T3 cells results in transformation of the cells. *See Li and Cohen, Cell, 85(3):319-29 (1996).* Furthermore, it has been suggested that defects in Tsg101 may occur during breast cancer tumorigenesis and/or progression. *Li et al., Cell, 88(1):143-54 (1997).* Tsg101 contains a ubiquitin-conjugating enzyme E2 catalytic domain. Recently, interest has focused on Tsg101 as a possible component of the ubiquitin/proteasome degradation pathway. By database search and comparison, it has been found that that N-terminal Tsg101 contains a domain related to E2 ubiquitin-

15

20

WO 02/072790

PCT/US02/08146

conjugating (Ubc) enzymes although lacking the active site cysteine. *See* Koonin and Abagyan, *Nat. Genet.*, 16(4):330-1 (1997). Thus, Tsg101 may belong to a group of apparently inactive homologs of Ubc enzymes. *See id.* The domain related to E2 ubiquitin-conjugating (Ubc) enzymes is referred to ubiquitin E2 variant (UEV) domain.

5 In accordance with the present invention, a search of a human spleen library with GAG polyprotein (aa 449-500, p6 domain, or "GAGp6") of HIV-1 isolated the tumor susceptibility TSG 101 protein (Tsg101; aa 7-390) as an interactor. The GAGp6 bait used here contains a late domain motif (-PTAP-). The GAG polyprotein of retroviruses gives rise to a set of mature proteins (matrix, capsid, and nucleocapsid) that produce the
10 inner virion core. In addition, GAG also contains a C-terminal portion called p6. In the case of HIV1, GAGp6 contains a sequence called the late domain, so-called because it is required for a late stage of HIV viral budding from the host cell surface. The late domain has a functional relationship with ubiquitin, in that the late domain is required in viral budding, and depletion of the intracellular pool of free ubiquitin produces a similar late
15 phenotype. Patnaik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(24):13069-74 (2000); Schubert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(24):13057-62 (2000); Strack *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(24):13063-8 (2000). The late domain is thought to represent a docking site for the ubiquitination machinery.

As is known in the art, the P(T/S)AP motif is conserved among the GAGp6
20 domains of all known primate lentiviruses. In nonprimate lentiviruses, which lack a GAGp6 domain, the P(T/S)AP motif is at the immediate C terminus of the GAG polyprotein. It has been shown that the P(T/S)AP motif is required for a late stage of viral budding from the host cell surface. It is critical for lentivirus' and particularly HIV's particle production. *See* Huang *et al.*, *J. Virol.*, 69:6810-6818 (1995). Specifically,
25 deletion of the PTAP motif results in drastic reduction of viral particle production. In addition, the PTAP-deficient viruses proceeded through the typical stages of morphogenesis but failed to complete the process. Rather, they remain tethered to the plasma membrane and are thus rendered non-infectious. That is, the viral budding process is stalled. *See* Huang *et al.*, *J. Virol.*, 69:6810-6818 (1995).

30 In accordance with the present invention, different GAGp6 point mutants (E6G, P7L, A9R, or P10L) were generated and tested for their ability to bind Tsg101 protein.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

See Example 2 below. While the wild-type GAGp6 peptide and the E6G GAGp6 mutant were capable of binding Tsg101 protein, each of the P7L, A9R, and P10L point mutations abolishes the GAGp6 binding affinity to Tsg101. The P7L, A9R, and P10L point mutations alter the PTAP motif in GAGp6 peptide. The same mutations in the PTAP motif of the HIV GAGp6 gag protein prevent HIV particles from budding from the host cells. See Huang *et al.*, *J. Virol.*, 69:6810-6818 (1995). Further, as shown in Example 3 below, the inventors of the present invention discovered that the first 14 amino acid residues of HIV GAGp6 (which includes the PTAP late domain motif) are sufficient in binding to the N-terminal portion of Tsg101 (amino acid residues 1-207, which includes the Tsg101 UEV domain).

Tsg101 is intimately involved in endocytosis, intracellular vesicle trafficking, and vacuolar protein sorting (VPS). The VPS pathway sorts membrane-bound proteins for eventual degradation in the lysosome (vacuole in yeast). See Lemmon and Traub, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 12:457-66 (2000). Two alternative entries into the VPS pathway are via vesicular trafficking from the Golgi (e.g., in degrading misfolded membrane proteins) or via endocytosis from the plasma membrane (e.g., in downregulating surface proteins like epidermal growth factor receptor (EGFR)). Vesicles carrying proteins from either source can enter the VPS pathway by fusing with endosomes. As these endosomes mature, their cargos are sorted for lysosomal degradation via the formation of structures called multivesicular bodies (MVB). MVB are created when surface patches on late endosomes bud into the compartment, forming small (~50-100 nm) vesicles. A maturing MVB can contain tens or even hundreds of these vesicles. The MVB then fuses with the lysosome, releasing the vesicles for degradation in this hydrolytic organelle.

The Tsg101 prey fragment isolated in yeast two-hybrid assay contains the ubiquitin E2 variant (UEV) domain indicating that the UEV domain is involved in the binding to the P(T/S)AP domain. The involvement of the Tsg101 UEV domain is consistent with the fact that ubiquitin is required for retrovirus budding and that proteasome inhibition reduces the level of free ubiquitin in HIV-1-infected cells and interferes with the release and maturation of HIV-1 and HIV-2. See Patnaik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(24):13069-74 (2000); Schubert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

WO 02/072790

PCT/US02/08146

USA, 97(24):13057-62 (2000); Strack *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(24):13063-8 (2000).

It is known that short chains of Ub (1-3 molecules) can "mark" surface receptors for endocytosis and degradation in the lysosome. Hicke, *Trends Cell Biol.*, 9:107-112 (1999); Rotin *et al.*, *J. Membr. Biol.*, 176:1-17 (2000). Several classes of proteins that carry the P(T/S)AP motif are surface receptors known to be degraded via the VPS pathway or function in the VPS pathway. See Farr *et al.*, *Biochem. J.*, 345(3):503-509 (2000); Staub and Rotin., *Structure*, 4:495-499 (1996). Although it is not known whether Tsg101 lacks ubiquitin ligase activity, it is believed, based on the large number of Tsg101 interactors discovered in accordance with the present invention, that a plausible role for Tsg101 in the VPS pathway is to recognize ubiquitinated proteins that carry P(T/S)AP motifs and help coordinate their incorporation into vesicles that bud into the MVB.

This is especially intriguing because the formation of MVB is the only known cellular process in which cell buds a vesicle *out* of the cytoplasm into another compartment. This budding is topologically equivalent to viral budding in which viruses bud *out* of the cytoplasm at the plasma membrane into extracellular space. Accordingly, while not wishing to be bound by any theory, it is believed that the binding of the P(T/S)AP motif in lentivirus GAG polyproteins to the cellular protein Tsg101 enables lentiviruses having the P(T/S)AP motif to usurp cellular machinery normally used for MVB formation to allow viral budding from the plasma membrane. It is also believed that depletion of Tsg101 or interfering with the interaction between Tsg101 and the P(T/S)AP motif in lentivirus-infected cells will prevent lentiviral budding from the cells.

In addition, the recruitment of cellular machinery to facilitate virus budding appears to be a general phenomenon, and distinct late domains have been identified in the structural proteins of several other enveloped viruses. See Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:12945-12947 (2000). Two well characterized late domains are the "PY" motif (consensus sequence: PPXY; X= any amino acid) found in membrane-associated proteins from certain enveloped viruses. See Craven *et al.*, *J. Virol.*, 73:3359-3365 (1999); Harty *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:13871-13876 (2000); Harty *et al.*, *J. Virol.*, 73:2921-2929 (1999); and Jayakar *et al.*, *J. Virol.*, 74:9818-9827 (2000). The cellular target for the PY motif is Nedd4 which also contains a Hect ubiquitin E3 ligase domain.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

The "YL" motif (YXXL) was found in the GAG protein of equine infectious anemia virus (EIAV). Puffer *et al.*, *J. Virol.*, 71:6541-6546 (1997); Puffer *et al.*, *J. Virol.*, 72:10218-10221 (1998). The cellular receptor for the "YL" motif appears to be the AP-50 subunit of AP-2. Puffer *et al.*, *J. Virol.*, 72:10218-10221 (1998). Interestingly, the late domains such as the P(T/S)AP motif, PY motif and the YL motif can still function when moved to different positions within retroviral GAG proteins, which suggests that they are docking sites for cellular factors rather than structural elements. Parent *et al.*, *J. Virol.*, 69:5455-5460 (1995); Yuan *et al.*, *EMBO J.*, 18:4700-4710 (2000). Moreover, the late domains such as the P(T/S)AP motif, PY motif and the YL motif can function interchangeably. That is one late domain motif can be used in place of another late domain motif without affecting viral budding. Parent *et al.*, *J. Virol.*, 69:5455-5460 (1995); Yuan *et al.*, *EMBO J.*, 18:4700-4710 (2000); Strack *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:13063-13068 (2000).

Accordingly, while not wishing to be bound by any theory, it is believed that as shown in Figure 1, although the three late domain motifs bind to different cellular targets, they utilize common cellular pathways to effect viral budding. In particular, it is believed that the different cellular receptors for viral late domain motifs feed into common downstream steps of the vacuolar protein sorting (VPS) and MVB pathway. As discussed above, Tsg101 functions in the VPS pathway. Another protein, Vps4 functions in Tsg101 cycling and endosomal trafficking. Particularly, Vps4 mutants prevent normal Tsg101 trafficking and induce formation of aberrant, highly vacuolated endosomes that are defective in the sorting and recycling of endocytosed substrates. See Babst *et al.*, *Traffic*, 1:248-258 (2000).

Interestingly, a search of a spleen library with the tumor susceptibility protein Tsg101 also identified an interaction with the growth arrest-specific protein GAS7b. In addition, as disclosed in the commonly assigned U.S. Provisional Application Serial No. 60/311,528, GAS7b is an interactor of the capsid region of the HIV GAG polyprotein. GAS7b is expressed preferentially in cells that are entering the quiescent state. Inhibition of GAS7b expression in terminally differentiating cultures of embryonic murine cerebellum impedes neurite outgrowth, while overexpression in undifferentiated neuroblastoma cell cultures dramatically promotes neurite-like outgrowth. Ju *et al.*, *Proc*

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Natl Acad Sci 95(19):11423-8 (1998); Lazakovitch *et al.*, *Genomics* 61(3):298-306 (1999). These findings suggest a role for GAS7b in controlling terminal cellular differentiation, and the domain structure of GAS7b suggests it may do this by regulating the cytoskeleton. In addition, GAS7b also interacts with two different regulators of small GTPases that control the actin cytoskeleton. The interactions of GAS7b with the HIV capsid and with Tsg101 (which in turn interacts with the HIV GAGp6 protein) strongly suggest these proteins form a multimolecular complex involved in the late stages of viral assembly and budding.

10

2.2. Protein Complexes

As discussed above, the UEV domain of the Tsg101 protein and the PTAP motif of the HIV GAGp6 are responsible for the interactions. In addition, an examination of HIV-1 amino acid sequence variants in GenBank by the inventors using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) identified a number of HIV strains with the standard PTAP motif being replaced with variations of the motif, indicating that such variations can also enable viral budding and that peptides with such variations may also bind Tsg101. Such identified variations include the PSAP motif, the PIAP motif (*see Zhang et al.*, *J. Virol.*, 71:6662-6670 (1997); Farrar *et al.*, *J. Med. Virol.*, 34:104-113 (1991)), and the PPTP motif (*see Zhang et al.*, *J. Virol.*, 71:6662-6670 (1997)).

15

20

Accordingly, the present invention provides protein complexes formed by interactions between Tsg101 and HIV GAG polypeptide. The present invention also provides a protein complex having a homologue, derivative or fragment of Tsg101 interacting with HIV GAG polypeptide. In addition, the present invention further encompasses a protein complex having Tsg101 interacting with a homologue, derivative or fragment of HIV GAG polypeptide. In yet another embodiment, a protein complex is provided having a homologue, derivative or fragment of Tsg101 and a homologue, derivative or fragment of HIV GAG polypeptide. In other words, one or more of the interacting protein members of a protein complex of the present invention may be a native protein or a homologue, derivative or fragment of a native protein. As defined in Section 1 above, the homologues and derivatives of Tsg101 should be capable of interacting with HIV GAG (through the GAGp6 region). The HIV GAG homologues

25

30

WO 02/072790

PCT/US02/08146

and derivatives are those capable of interacting with Tsg101. Preferably, the amino acid sequence of a homologue is at least 85%, 90%, or 95% identical to that of its corresponding native protein.

Thus, for example, one interacting partner in the protein complexes can be a complete native Tsg101, a Tsg101 homologue capable of interacting with the HIV GAGp6, a Tsg101 derivative, a derivative of the Tsg101 homologue, a Tsg101 fragment capable of interacting with HIV GAGp6 (e.g., a fragment containing the UEV domain of the Tsg101 protein, specifically the amino acid residues 1-207, the amino acid residues 1-147, etc.), a derivative of the Tsg101 fragment, or a fusion protein containing (1) complete native Tsg101, (2) a Tsg101 homologue capable of interacting with the HIV GAGp6 or (3) a Tsg101 fragment capable of interacting with HIV GAGp6.

The other partner can be (1) an HIV GAG polypeptide, (2) an HIV GAG polypeptide homologue having an amino acid sequence at least 85%, 90% or 95% identical to that of HIV GAG polypeptide and capable of interacting with Tsg101, (3) HIV GAGp6 protein, (4) an HIV GAGp6 homologue having an amino acid sequence at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to that of HIV GAGp6 and capable of interacting with Tsg101, (5) an HIV GAGp6 fragment capable of interacting with Tsg101, or (6) a fusion protein containing an HIV GAG polypeptide, an HIV GAG polypeptide homologue, HIV GAGp6, an HIV GAGp6 homologue or an HIV GAGp6 fragment.

The protein complexes of the present invention contains a HIV GAG polypeptide as an interacting partner. In addition, GAG polypeptides and fragments thereof from other retroviruses containing the P(T/S/I)(A/T)P (SEQ ID NOs:1-6) late domain motif are believed to also interact with Tsg101 in the same manner as the HIV GAG polypeptide. Thus, they can be used in forming protein complexes with Tsg101 or a homologue or derivative or fragment thereof. Preferably, GAG polypeptides or fragments thereof of lentiviruses containing the P(T/S)AP late domain are used to form protein complexes. Such GAG polypeptides or fragments thereof may be from a non-primate lentiviruses including bovine lentiviruses (e.g. bovine immunodeficiency virus (BIV), Jembrana disease virus), feline lentiviruses (e.g. feline immunodeficiency virus (FIV) which causes immunodeficiency, wasting, and encephalitis in cats), and ovine/caprine lentivirus (e.g. caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) which causes anemia and wasting in goats,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

ovine lentivirus, Visna virus which causes pneumonia, wasting, encephalitis and arthritis). Preferably, the GAG polypeptides or fragments thereof are from primate lentiviruses including, but not limited to, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2), human immunodeficiency virus type 3 (HIV-3) (all of which cause AIDS), and various simian immunodeficiency viruses that infect hosts such as chimpanzee, mangabey, African Green monkey, mandrill, L'Hoest, Sykes' monkey, or Guereza Colobus monkey.

Besides the native retroviral GAG polypeptides, useful interacting partners for Tsg101 or a homologue or derivative or fragment thereof also include homologues of the native retroviral GAG polypeptides capable of interacting with Tsg101, derivatives of the native or homologue GAG polypeptides capable of interacting with Tsg101, fragments of the GAG polypeptides capable of interacting with Tsg101 (e.g., a fragment containing the P(T/S)AP motif), derivatives of the GAG polypeptide fragments, or fusion proteins containing (1) a complete GAG polypeptide, (2) a GAG polypeptide homologue capable of interacting with Tsg101 or (3) a GAG polypeptide fragment capable of interacting with Tsg101.

Tsg101 fragments capable of interacting with HIV GAGp6 can be the combination of molecular engineering of a Tsg101-encoding nucleic acid and a method for testing protein-protein interaction. For example, the coordinates in Table 1 can be used as starting points and various Tsg101 fragments falling within the coordinates can be generated by deletions from either or both ends of the coordinates. The resulting fragments can be tested for their ability to interact with HIV GAGp6 using any methods known in the art for detecting protein-protein interactions (e.g., yeast two-hybrid method). Likewise, HIV GAG fragments, HIV GAGp6 fragments and other retroviral GAG polypeptide fragments capable of interacting with Tsg101 can also be identified in a similar manner.

In specific embodiments, the protein complex of the present invention contains a polypeptide that contains a contiguous span of at least 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 or more amino acid residues of a naturally occurring HIV GAG sequence. Preferably, the polypeptide contains a contiguous span of between 10 and 20 amino acid residues of a naturally occurring HIV GAG sequence. The contiguous span

WO 02/072790

PCT/US02/08146

should span the HIV late domain motif which can be the P(T/S)AP motif or a variation thereof (e.g., the PIAP motif and the PTTP motif). Preferably, the late domain motif in the contiguous span is the P(T/S)AP motif. In other specific embodiments, the protein complex contains a polypeptide that contains a contiguous span of at least 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 or more amino acid residues of a naturally occurring GAG polypeptide sequence from other retroviruses containing a P(T/S)AP late domain motif. The contiguous span should span the retrovirus late domain motif. In preferred embodiments, such other retroviruses are primate lentiviruses or non-primate lentiviruses (except for ELAV). In specific embodiments, the protein complex of the present invention includes a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group of EPTAP (SEQ ID NO:7), EPSAP (SEQ ID NO:8), PTAPP (SEQ ID NO:9), PSAPP (SEQ ID NO:10), EPTAPP (SEQ ID NO:11), EPSAPP (SEQ ID NO:12), PEPTAP (SEQ ID NO:13), PEPSAP (SEQ ID NO:14), RPEPTAP (SEQ ID NO:15), RPEPSAP (SEQ ID NO:16), PEPTAPP (SEQ ID NO:17), PEPSAPP (SEQ ID NO:18), EPTAPPEE (SEQ ID NO:19), EPSAPPEE (SEQ ID NO:20), EPTAPPPEE (SEQ ID NO:21), PEPTAPPEE (SEQ ID NO:22), PEPTAPPPEE (SEQ ID NO:23), PEPSAPPEE (SEQ ID NO:24), RPEPTAPPEE (SEQ ID NO:25), RPEPSAPPEE (SEQ ID NO:26), RPEPTAPPPEE (SEQ ID NO:27), RPEPSAPPPEE (SEQ ID NO:28), LQSRPEPTAPPEE (SEQ ID NO:29), LQSRPEPSAPPEE (SEQ ID NO:30), LQSRPEPTAPPEES (SEQ ID NO:31), and LQSRPEPSAPPEES (SEQ ID NO:32).

Furthermore, it is believed that the P(T/S)AP or PIAP or PTTP motif itself may be sufficient for Tsg101 binding. Accordingly, a protein complex is also provided containing Tsg101 protein or a homologue or derivative or fragment thereof interacting with a polypeptide consisting essentially the P(T/S)AP or PIAP or PTTP motif, i.e., a polypeptide having the P(T/S)AP or PIAP or PTTP motif and a few flanking amino acids.

In a specific embodiment of the protein complex of the present invention, two or more interacting partners (Tsg101 and HIV GAGp6, or homologues, derivatives or fragments thereof) are directly fused together, or covalently linked together through a peptide linker, forming a hybrid protein having a single unbranched polypeptide chain. Thus, the protein complex may be formed by "intramolecular" interactions between two portions of the hybrid protein. Again, one or both of the fused or linked interacting

WO 02/072790

PCT/US02/08146

partners in this protein complex may be a native protein or a homologue, derivative or fragment of a native protein.

The protein complexes of the present invention can also be in a modified form. For example, an antibody selectively immunoreactive with the protein complex can be bound to the protein complex. In another example, a non-antibody modulator capable of enhancing the interaction between the interacting partners in the protein complex may be included. Alternatively, the protein members in the protein complex may be cross-linked for purposes of stabilization. Various crosslinking methods may be used. For example, a bifunctional reagent in the form of R-S-S-R' may be used in which the R and R' groups can react with certain amino acid side chains in the protein complex forming covalent linkages. See e.g., Traut *et al.*, in Creighton ed., *Protein Function: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989; Baird *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 251:6953-6962 (1976). Other useful crosslinking agents include, e.g., Denny-Jaffee reagent, a heterobifunctional photoactivable moiety cleavable through an azo linkage (See Denny *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5286-5290 (1984)), and ¹²⁵I-[S-[N-(3-iodo-4-azidosalicyl)cysteaminy]-2-thiopyridine], a cysteine-specific photocrosslinking reagent (see Chen *et al.*, *Science*, 265:90-92 (1994)).

The above-described protein complexes may further include any additional components e.g., other proteins, nucleic acids, lipid molecules, monosaccharides or polysaccharides, ions or other molecules.

2.3. Methods of Preparing Protein Complexes

The protein complex of the present invention can be prepared by a variety of methods. Specifically, a protein complex can be isolated directly from an animal tissue sample, preferably a human tissue sample containing the protein complex. Alternatively, a protein complex can be purified from host cells that recombinantly express the members of the protein complex. As will be apparent to a skilled artisan, a protein complex can be prepared from a tissue sample or recombinant host cell by coimmunoprecipitation using an antibody immunoreactive with an interacting protein partner, or preferably an antibody selectively immunoreactive with the protein complex as will be discussed in detail below. The antibodies can be monoclonal or polyclonal.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Coimmunoprecipitation is a commonly used method in the art for isolating or detecting bound proteins. In this procedure, generally a serum sample or tissue or cell lysate is admixed with a suitable antibody. The protein complex bound to the antibody is precipitated and washed. The bound protein complexes are then eluted.

5 Alternatively, immunoaffinity chromatography and immunoblotting techniques may also be used in isolating the protein complexes from native tissue samples or recombinant host cells using an antibody immunoreactive with an interacting protein partner, or preferably an antibody selectively immunoreactive with the protein complex. For example, in protein immunoaffinity chromatography, the antibody may be covalently
10 or non-covalently coupled to a matrix such as Sepharose in, e.g., a column. The tissue sample or cell lysate from the recombinant cells can then be contacted with the antibody on the matrix. The column is then washed with a low-salt solution to wash off the unbound components. The protein complexes that are retained in the column can be then eluted from the column using a high-salt solution, a competitive antigen of the antibody,
15 a chaotropic solvent, or sodium dodecyl sulfate (SDS), or the like. In immunoblotting, crude proteins samples from a tissue sample or recombinant host cell lysate can be fractionated on a polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and then transferred to, e.g., a nitrocellulose membrane. The location of the protein complex on the membrane may be identified using a specific antibody, and the protein complex is subsequently isolated.

20 In another embodiment, individual interacting protein partners may be isolated or purified independently from tissue samples or recombinant host cells using similar methods as described above. The individual interacting protein partners are then contacted with each other under conditions conducive to the interaction therebetween thus forming a protein complex of the present invention. It is noted that different protein-
25 protein interactions may require different conditions. As a starting point, for example, a buffer having 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 and 500 mM NaCl may be used. Several different parameters may be varied, including temperature, pH, salt concentration, reducing agent, and the like. Some minor degree of experimentation may be required to determine the optimum incubation condition, this being well within the capability of one
30 skilled in the art once apprised of the present disclosure.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

In yet another embodiment, the protein complex of the present invention may be prepared from tissue samples or recombinant host cells or other suitable sources by protein affinity chromatography or affinity blotting. That is, one of the interacting protein partners is used to isolate the other interacting protein partner(s) by binding affinity thus forming protein complexes. Thus, an interacting protein partner prepared by purification from tissue samples or by recombinant expression or chemical synthesis may be bound covalently or non-covalently to a matrix such as Sepharose in, e.g., a chromatography column. The tissue sample or cell lysate from the recombinant cells can then be contacted with the bound protein on the matrix. A low-salt solution is used to wash off the unbound components, and a high-salt solution is then employed to elute the bound protein complexes in the column. In affinity blotting, crude protein samples from a tissue sample or recombinant host cell lysate can be fractionated on a polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and then transferred to, e.g., a nitrocellulose membrane. The purified interacting protein member is then bound to its interacting protein partner(s) on the membrane forming protein complexes, which are then isolated from the membrane.

It will be apparent to skilled artisans that any recombinant expression methods may be used in the present invention for purposes of recombinantly expressing the protein complexes or individual interacting proteins. Generally, a nucleic acid encoding an interacting protein member can be introduced into a suitable host cell. For purposes of recombinantly forming a protein complex within a host cell, nucleic acids encoding two or more interacting protein members should be introduced into the host cell.

Typically, the nucleic acids, preferably in the form of DNA, are incorporated into a vector to form expression vectors capable of expressing the interacting protein member(s) once introduced into a host cell. Many types of vectors can be used for the present invention. Methods for the construction of an expression vector for purposes of this invention should be apparent to skilled artisans apprised of the present disclosure.

See generally, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel, *et al.*, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13, 1988; Glover, *DNA Cloning*, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3, 1986; Bitter, *et al.*, in *Methods in Enzymology* 30 153:516-544 (1987); *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Eds. Strathern

WO 02/072790

PCT/US02/08146

et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II, 1982; and Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1989.

Generally, the expression vectors include an expression cassette having a promoter operably linked to a DNA encoding an interacting protein member. The promoter can be a native promoter, i.e., the promoter found in naturally occurring cells to be responsible for the expression of the interacting protein member in the cells. Alternatively, the expression cassette can be a chimeric one, i.e., having a heterologous promoter that is not the native promoter responsible for the expression of the interacting protein member in naturally occurring cells. The expression vector may further include an origin of DNA replication for the replication of the vectors in host cells. Preferably, the expression vectors also include a replication origin for the amplification of the vectors in, e.g., *E. coli*, and selection marker(s) for selecting and maintaining only those host cells harboring the expression vectors. Additionally, the expression cassettes preferably also contain inducible elements, which function to control the transcription from the DNA encoding an interacting protein member. Other regulatory sequences such as transcriptional enhancer sequences and translation regulation sequences (e.g., Shine-Dalgarno sequence) can also be operably included in the expression cassettes. Termination sequences such as the polyadenylation signals from bovine growth hormone, SV40, lacZ and AcMNPV polyhedral protein genes may also be operably linked to the DNA encoding an interacting protein member in the expression cassettes. An epitope tag coding sequence for detection and/or purification of the expressed protein can also be operably linked to the DNA encoding an interacting protein member such that a fusion protein is expressed. Examples of useful epitope tags include, but are not limited to, influenza virus hemagglutinin (HA), Simian Virus 5 (V5), polyhistidine (6xHis), *c-myc*, lacZ, GST, and the like. Proteins with polyhistidine tags can be easily detected and/or purified with Ni affinity columns, while specific antibodies immunoreactive with many epitope tags are generally commercially available. The expression vectors may also contain components that direct the expressed protein extracellularly or to a particular intracellular compartment. Signal peptides, nuclear localization sequences, endoplasmic reticulum retention signals, mitochondrial localization sequences, myristoylation signals, palmitoylation signals, and transmembrane sequences are example of optional vector

WO 02/072790

PCT/US02/08146

components that can determine the destination of expressed proteins. When it is desirable to express two or more interacting protein members in a single host cell, the DNA fragments encoding the interacting protein members may be incorporated into a single vector or different vectors.

5 The thus constructed expression vectors can be introduced into the host cells by any techniques known in the art, e.g., by direct DNA transformation, microinjection, electroporation, viral infection, lipofection, gene gun, and the like. The expression of the interacting protein members may be transient or stable. The expression vectors can be maintained in host cells in an extrachromosomal state, i.e., as self-replicating plasmids or
10 viruses. Alternatively, the expression vectors can be integrated into chromosomes of the host cells by conventional techniques such as selection of stable cell lines or site-specific recombination. In stable cell lines, at least the expression cassette portion of the expression vector is integrated into a chromosome of the host cells.

The vector construct can be designed to be suitable for expression in various host
15 cells, including but not limited to bacteria, yeast cells, plant cells, insect cells, and mammalian and human cells. Methods for preparing expression vectors for expression in different host cells should be apparent to a skilled artisan.

Homologues and fragments of the native interacting protein members can also be easily expressed using the recombinant methods described above. For example, to
20 express a protein fragment, the DNA fragment incorporated into the expression vector can be selected such that it only encodes the protein fragment. Likewise, a specific hybrid protein can be expressed using a recombinant DNA encoding the hybrid protein. Similarly, a homologue protein may be expressed from a DNA sequence encoding the homologue protein or protein fragment. A homologue-encoding DNA sequence may be
25 obtained by manipulating the native protein-encoding sequence using recombinant DNA techniques. For this purpose, random or site-directed mutagenesis can be conducted using techniques generally known in the art. To make protein derivatives, for example, the amino acid sequence of a native interacting protein member may be changed in predetermined manners by site-directed DNA mutagenesis to create or remove consensus
30 sequences for, e.g., phosphorylation by protein kinases, glycosylation, ribosylation, myristoylation, palmytoylation, and the like. Alternatively, non-natural amino acids can

WO 02/072790

PCT/US02/08146

be incorporated into an interacting protein member during the synthesis of the protein in recombinant host cells. For example, photoreactive lysine derivatives can be incorporated into an interacting protein member during translation by using a modified lysyl-tRNA. *See, e.g., Wiedmann et al., Nature, 328:830-833 (1989); Musch et al., Cell, 5 69:343-352 (1992).* Other photoreactive amino acid derivatives can also be incorporated in a similar manner. *See, e.g., High et al., J. Biol. Chem., 368:28745-28751 (1993).* Indeed, the photoreactive amino acid derivatives thus incorporated into an interacting protein member can function to cross-link the protein to its interacting protein partner in a protein complex under predetermined conditions.

10 In addition, derivatives of the native interacting protein members of the present invention can also be prepared by chemically linking certain moieties to amino acid side chains of the native proteins.

If desired, the homologues and derivatives thus generated can be tested to determine whether they are capable of interacting with their intended interacting partners to form protein complexes. Testing can be conducted by e.g., the yeast two-hybrid 15 system or other methods known in the art for detecting protein-protein interaction.

A hybrid protein as described above having Tsg101 or a homologue, derivative, or fragment thereof covalently linked by a peptide bond or a peptide linker to HIV GAG or HIV GAGp6, or a homologue, derivative, or fragment thereof, can be expressed 20 recombinantly from a chimeric nucleic acid, e.g., a DNA or mRNA fragment encoding the fusion protein. Accordingly, the present invention also provides a nucleic acid encoding the hybrid protein of the present invention. In addition, an expression vector having incorporated therein a nucleic acid encoding the hybrid protein of the present invention is also provided. The methods for making such chimeric nucleic acids and 25 expression vectors containing them should be apparent to skilled artisans apprised of the present disclosure.

2.4. Protein Microchip

In accordance with another embodiment of the present invention, a protein 30 microchip or microarray is provided having one or more of the protein complexes and/or antibodies selectively immunoreactive with the protein complexes of the present

WO 02/072790

PCT/US02/08146

invention. Protein microarrays are becoming increasingly important in both proteomics research and protein-based detection and diagnosis of diseases. The protein microarrays in accordance with this embodiment of the present invention will be useful in a variety of applications including, e.g., large-scale or high-throughput screening for compounds
5 capable of binding to the protein complexes or modulating the interactions between the interacting protein members in the protein complexes.

The protein microarray of the present invention can be prepared in a number of methods known in the art. An example of a suitable method is that disclosed in
10 MacBeath and Schreiber, *Science*, 289:1760-1763 (2000). Essentially, glass microscope slides are treated with an aldehyde-containing silane reagent (SuperAldehyde Substrates purchased from TeleChem International, Cupertino, California). Nanoliter volumes of protein samples in a phosphate-buffered saline with 40% glycerol are then spotted onto the treated slides using a high-precision contact-printing robot. After incubation, the slides are immersed in a bovine serum albumin (BSA)-containing buffer to quench the
15 unreacted aldehydes and to form a BSA layer which functions to prevent non-specific protein binding in subsequent applications of the microchip. Alternatively, as disclosed in MacBeath and Schreiber, proteins or protein complexes of the present invention can be attached to a BSA-NHS slide by covalent linkages. BSA-NHS slides are fabricated by first attaching a molecular layer of BSA to the surface of glass slides and then activating
20 the BSA with N,N'-disuccinimidyl carbonate. As a result, the amino groups of the lysine, aspartate, and glutamate residues on the BSA are activated and can form covalent urea or amide linkages with protein samples spotted on the slides. See MacBeath and Schreiber, *Science*, 289:1760-1763 (2000).

Another example of useful method for preparing the protein microchip of the
25 present invention is that disclosed in PCT Publication Nos. WO 00/4389A2 and WO 00/04382, both of which are assigned to Zyomyx and are incorporated herein by reference. First, a substrate or chip base is covered with one or more layers of thin organic film to eliminate any surface defects, insulate proteins from the base materials, and to ensure uniform protein array. Next, a plurality of protein-capturing agents (e.g.,
30 antibodies, peptides, etc.) are arrayed and attached to the base that is covered with the thin film. Proteins or protein complexes can then be bound to the capturing agents

WO 02/072790

PCT/US02/08146

forming a protein microarray. The protein microchips are kept in flow chambers with an aqueous solution.

The protein microarray of the present invention can also be made by the method disclosed in PCT Publication No. WO 99/36576 assigned to Packard Bioscience Company, which is incorporated herein by reference. For example, a three-dimensional hydrophilic polymer matrix, i.e., a gel, is first disposed on a solid substrate such as a glass slide. The polymer matrix gel is capable of expanding or contracting and contains a coupling reagent that reacts with amine groups. Thus, proteins and protein complexes can be contacted with the matrix gel in an expanded aqueous and porous state to allow reactions between the amine groups on the protein or protein complexes with the coupling reagents thus immobilizing the proteins and protein complexes on the substrate. Thereafter, the gel is contracted to embed the attached proteins and protein complexes in the matrix gel.

Alternatively, the proteins and protein complexes of the present invention can be incorporated into a commercially available protein microchip, e.g., the ProteinChip System from CIPHERGEN Biosystems Inc., Palo Alto, CA. The ProteinChip System comprises metal chips having a treated surface, which interact with proteins. Basically, a metal chip surface is coated with a silicon dioxide film. The molecules of interest such as proteins and protein complexes can then be attached covalently to the chip surface via a silane coupling agent.

The protein microchips of the present invention can also be prepared with other methods known in the art, e.g., those disclosed in U.S. Patent Nos. 6,087,102, 6,139,831, 6,087,103; PCT Publication Nos. WO 99/60156, WO 99/39210, WO 00/54046, WO 00/53625, WO 99/51773, WO 99/35289, WO 97/42507, WO 01/01142, WO 00/63694, WO 00/61806, WO 99/61148, WO 99/40434, all of which are incorporated herein by reference.

3. Antibodies

In accordance with another aspect of the present invention, an antibody immunoreactive against a protein complex of the present invention is provided. In one embodiment, the antibody is selectively immunoreactive with a protein complex of the

WO 02/072790

PCT/US02/08146

present invention. Specifically, the phrase "selectively immunoreactive with a protein complex" as used herein means that the immunoreactivity of the antibody of the present invention with the protein complex is substantially higher than that with the individual interacting members of the protein complex so that the binding of the antibody to the protein complex is readily distinguishable from the binding of the antibody to the individual interacting member proteins based on the strength of the binding affinities. Preferably, the binding constant differs by a magnitude of at least 2 fold, more preferably at least 5 fold, even more preferably at least 10 fold, and most preferably at least 100 fold. In a specific embodiment, the antibody is not substantially immunoreactive with the interacting protein members of the protein complex.

The antibody of the present invention can be readily prepared using procedures generally known in the art. See, e.g., Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1988. Typically, the protein complex against which the antibody to be generated will be immunoreactive is used as the antigen for the purpose of producing immune response in a host animal. In one embodiment, the protein complex used consists the native proteins. Preferably, the protein complex includes only the binding domains of Tsg101 and HIV GAGp6, respectively. As a result, a greater portion of the total antibodies may be selectively immunoreactive with the protein complexes. The binding domains can be selected from, e.g., those summarized in Table 1. In addition, various techniques known in the art for predicting epitopes may also be employed to design antigenic peptides based on the interacting protein members in a protein complex of the present invention to increase the possibility of producing an antibody selectively immunoreactive with the protein complex. Suitable epitope-prediction computer programs include, e.g., MacVector from International Biotechnologies, Inc. and Protean from DNASTar.

In a specific embodiment, a hybrid protein as described above in Section 2 is used as an antigen which has Tsg101 or a homologues, derivative, or fragment thereof covalently linked by a peptide bond or a peptide linker to HIV GAG or HIV GAGp6 or a homologue, derivative, or fragment thereof. In a preferred embodiment, the hybrid protein consists of two interacting binding domains selected from Table 1, or homologues or derivatives thereof, covalently linked together by a peptide bond or a linker molecule.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

The antibody of the present invention can be a polyclonal antibody to a protein complex of the present invention. To produce the polyclonal antibody, various animal hosts can be employed, including, e.g., mice, rats, rabbits, goats, guinea pigs, hamsters, etc. A suitable antigen which is a protein complex of the present invention or a derivative thereof as described above can be administered directly to a host animal to illicit immune reactions. Alternatively, it can be administered together with a carrier such as keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA), ovalbumin, and Tetanus toxoid. Optionally, the antigen is conjugated to a carrier by a coupling agent such as carbodiimide, glutaraldehyde, and MBS. Any conventional adjuvants may be used to boost the immune response of the host animal to the protein complex antigen. Suitable adjuvants known in the art include but are not limited to Complete Freund's Adjuvant (which contains killed mycobacterial cells and mineral oil), incomplete Freund's Adjuvant (which lacks the cellular components), aluminum salts, MF59 from Biocine, monophospholipid, synthetic trehalose dicorynomycolate (TDM) and cell wall skeleton (CWS) both from RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT, non-ionic surfactant vesicles (NISV) from Proteus International PLC, Cheshire, U.K., and saponins. The antigen preparation can be administered to a host animal by subcutaneous, intramuscular, intravenous, intradermal, or intraperitoneal injection, or by injection into a lymphoid organ.

The antibodies of the present invention may also be monoclonal. Such monoclonal antibodies may be developed using any conventional techniques known in the art. For example, the popular hybridoma method disclosed in Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975) is now a well-developed technique that can be used in the present invention. See U.S. Patent No. 4,376,110, which is incorporated herein by reference. Essentially, B-lymphocytes producing a polyclonal antibody against a protein complex of the present invention can be fused with myeloma cells to generate a library of hybridoma clones. The hybridoma population is then screened for antigen binding specificity and also for immunoglobulin class (isotype). In this manner, pure hybridoma clones producing specific homogenous antibodies can be selected. See generally, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1988. Alternatively, other techniques known in the art may also be used to prepare monoclonal

WO 02/072790

PCT/US02/08146

antibodies, which include but are not limited to the EBV hybridoma technique, the human N-cell hybridoma technique, and the trioma technique.

In addition, antibodies selectively immunoreactive with a protein complex of the present invention may also be recombinantly produced. For example, cDNAs prepared
5 by PCR amplification from activated B-lymphocytes or hybridomas may be cloned into an expression vector to form a cDNA library, which is then introduced into a host cell for recombinant expression. The cDNA encoding a specific desired protein may then be isolated from the library. The isolated cDNA can be introduced into a suitable host cell for the expression of the protein. Thus, recombinant techniques can be used to
10 recombinantly produce specific native antibodies, hybrid antibodies capable of simultaneous reaction with more than one antigen, chimeric antibodies (e.g., the constant and variable regions are derived from different sources), univalent antibodies which comprise one heavy and light chain pair coupled with the Fc region of a third (heavy) chain, Fab proteins, and the like. See U.S. Patent No. 4,816,567; European Patent
15 Publication No. 0088994; Munro, *Nature*, 312:597 (1984); Morrison, *Science*, 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques*, 4:214 (1986); and Wood *et al.*, *Nature*, 314:446-449 (1985), all of which are incorporated herein by reference. Antibody fragments such as Fv fragments, single-chain Fv fragments (scFv), Fab' fragments, and F(ab')₂ fragments can also be recombinantly produced by methods disclosed in, e.g., U.S. Patent No. 4,946,778;
20 Skerra & Plickthun, *Science*, 240:1038-1041(1988); Better *et al.*, *Science*, 240:1041-1043 (1988); and Bird, *et al.*, *Science*, 242:423-426 (1988), all of which are incorporated herein by reference.

In a preferred embodiment, the antibodies provided in accordance with the present invention are partially or fully humanized antibodies. For this purpose, any methods
25 known in the art may be used. For example, partially humanized chimeric antibodies having V regions derived from the tumor-specific mouse monoclonal antibody, but human C regions are disclosed in Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1989). In addition, fully humanized antibodies can be made using transgenic non-human animals. For example, transgenic non-human animals such as transgenic mice can be produced in
30 which endogenous immunoglobulin genes are suppressed or deleted, while heterologous antibodies are encoded entirely by exogenous immunoglobulin genes, preferably human

WO 02/072790

PCT/US02/08146

immunoglobulin genes, recombinantly introduced into the genome. *See e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,545,806; 6,075,181; PCT Publication No. WO 94/02602; Green *et al.*, *Nat. Genetics*, 7: 13-21 (1994); and Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994), all of which are incorporated herein by reference. The transgenic non-human host animal may be immunized with suitable antigens such as a protein complex of the present invention or one or more of the interacting protein members thereof to illicit specific immune response thus producing humanized antibodies. In addition, cell lines producing specific humanized antibodies can also be derived from the immunized transgenic non-human animals. For example, mature B-lymphocytes obtained from a transgenic animal producing humanized antibodies can be fused to myeloma cells and the resulting hybridoma clones may be selected for specific humanized antibodies with desired binding specificities. Alternatively, cDNAs may be extracted from mature B-lymphocytes and used in establishing a library which is subsequently screened for clones encoding humanized antibodies with desired binding specificities.

In yet another embodiment, a bifunctional antibody is provided which has two different antigen binding sites, each being specific to a different interacting protein member in a protein complex of the present invention. The bifunctional antibody may be produced using a variety of methods known in the art. For example, two different monoclonal antibody-producing hybridomas can be fused together. One of the two hybridomas may produce a monoclonal antibody specific against an interacting protein member of a protein complex of the present invention, while the other hybridoma generates a monoclonal antibody immunoreactive with another interacting protein member of the protein complex. The thus formed new hybridoma produces different antibodies including a desired bifunctional antibody, i.e., an antibody immunoreactive with both of the interacting protein members. The bifunctional antibody can be readily purified. *See* Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-540 (1983).

Alternatively, a bifunctional antibody may also be produced using heterobifunctional crosslinkers to chemically link two different monoclonal antibodies, each being immunoreactive with a different interacting protein member of a protein complex. Therefore, the aggregate will bind to two interacting protein members of the

WO 02/072790

PCT/US02/08146

protein complex. See Staerz *et al*, *Nature*, 314:628-631(1985); Perez *et al*, *Nature*, 316:354-356 (1985).

In addition, bifunctional antibodies can also be produced by recombinantly expressing light and heavy chain genes in a hybridoma that itself produces a monoclonal antibody. As a result, a mixture of antibodies including a bifunctional antibody is produced. See DeMonte *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87:2941-2945 (1990); Lenz and Weidle, *Gene*, 87:213-218 (1990).

Preferably, a bifunctional antibody in accordance with the present invention is produced by the method disclosed in U.S. Patent No. 5,582,996, which is incorporated herein by reference. For example, two different Fabs can be provided and mixed together. The first Fab can bind to an interacting protein member of a protein complex, and has a heavy chain constant region having a first complementary domain not naturally present in the Fab but capable of binding a second complementary domain. The second Fab is capable of binding another interacting protein member of the protein complex, and has a heavy chain constant region comprising a second complementary domain not naturally present in the Fab but capable of binding to the first complementary domain. Each of the two complementary domains is capable of stably binding to the other but not to itself. For example, the leucine zipper regions of c-fos and c-jun oncogenes may be used as the first and second complementary domains. As a result, the first and second complementary domains interact with each other to form a leucine zipper thus associating the two different Fabs into a single antibody construct capable of binding to two antigenic sites.

Other suitable methods known in the art for producing bifunctional antibodies may also be used, which include those disclosed in Holliger *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993); de Kruif *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:7630-7634 (1996); Coloma and Morrison, *Nat. Biotechnol.*, 15:159-163 (1997); Muller *et al.*, *FEBS Lett.*, 422:259-264 (1998); and Muller *et al.*, *FEBS Lett.*, 432:45-49 (1998), all of which are incorporated herein by reference.

30

WO 02/072790

PCT/US02/08146

4. Screening Assays

The protein complexes of the present invention, Tsg101 and HIV GAG or HIV GAGp6 can be used in screening assays to select modulators of Tsg101, HIV GAGp6, and protein complexes of the present invention. In addition, homologues, derivatives and fragments of Tsg101, HIV GAG, HIV GAGp6, and protein complexes containing such homologues, derivatives and fragments may also be used in the screening assays. As used herein, the term "modulator" encompasses any compounds that can cause any forms of alteration of the properties, biological activities or functions of the proteins or protein complexes, including, e.g., enhancing or reducing their biological activities, increasing or decreasing their stability, altering their affinity or specificity to certain other biological molecules, etc. In addition, the term "modulator" as used herein also includes any compounds that simply bind Tsg101, HIV GAGp6, and/or the proteins complexes of the present invention. For example, a modulator can be an interaction antagonist capable of interfering with, or disrupting or dissociating protein-protein interaction between Tsg101 or a homologue or derivative thereof and HIV GAGp6 or a homologue or derivative thereof.

Likewise, other retroviral GAG polypeptides containing the P(T/S)AP late domain motif, or homologues, derivatives or fragments thereof may also be used in the screening assays in lieu of HIV GAG or HIV GAGp6. In other words, any interacting members of the protein complexes provided according to the present invention (e.g., as described in Section 2) can be used in the screening assays.

The term "interaction antagonist" as used herein means a compound that interferes with, blocks, disrupts or destabilizes a protein-protein interaction; blocks or interferes with the formation of a protein complex; or destabilizes, disrupts or dissociates an existing protein complex.

The term "interaction agonist" as used herein means a compound that triggers, initiates, propagates, nucleates, or otherwise enhances the formation of a protein-protein interaction; triggers, initiates, propagates, nucleates, or otherwise enhances the formation of a protein complex; or stabilizes an existing protein complex.

Accordingly, the present invention provides screening methods for selecting modulators of Tsg101 or HIV GAGp6 or a mutant form thereof, or a protein complex

WO 02/072790

PCT/US02/08146

formed between Tsg101 or a homologue or derivative or fragment thereof and HIV GAG or HIV GAGp6 or a homologue or derivative or fragment thereof. The targets suitable in the screening methods of the present invention may include any embodiments of the protein complexes of the present invention as described in Section 2. Preferably, protein
5 fragments are used in forming the protein complexes. For example, a preferred target protein complex can include a Tsg101 protein fragment encompassing the UEV domain. Also for example, the HIV GAGp6 or a fragment thereof may be used in forming a target protein complex. In a specific embodiment, a polypeptide including the first 14 amino acids of the HIV GAGp6 is used in forming a target protein complex. In another
10 embodiment, fusion proteins are used in which a detectable epitope tag is fused to a Tsg101 protein or a homologue or derivative or fragment thereof and/or to a HIV GAGp6 polypeptide or a homologue or derivative or fragment thereof. Suitable examples of such epitope tags include sequences derived from, e.g., influenza virus hemagglutinin (HA), Simian Virus 5 (V5), polyhistidine (6xHis), *c-myc*, *lacZ*, GST, and the like.

15 When Tsg101 protein or a homologue or derivative or fragment thereof is used as a target protein in the screening methods of the present invention, preferably the Tsg101 UEV domain is included in the Tsg101 protein or a homologue or derivative or fragment thereof. And preferably the Tsg101 protein or a homologue or derivative or fragment thereof is fused to a detectable tag such as sequences derived from, e.g., influenza virus
20 hemagglutinin (HA), Simian Virus 5 (V5), polyhistidine (6xHis), *c-myc*, *lacZ*, GST, and the like. In this respect, compounds selected by the methods capable of binding to Tsg101 protein, preferably the UEV domain of Tsg101 protein can be tested for their ability to inhibit or interfere with the interactions between Tsg101 and HIV GAGp6. They can also be tested for their ability to inhibit HIV viral budding or HIV propagation.
25 Suitable methods for such testing should be apparent to skilled artisan apprised of the present disclosure.

The modulators selected in accordance with the screening methods of the present invention can be effective in modulating the functions or activities of Tsg101, HIV GAG, HIV GAGp6, other retroviral GAG polypeptides containing the P(T/S)AP motif, or the
30 protein complexes of the present invention. For example, compounds capable of binding the protein complexes may be capable of modulating the functions of the protein

WO 02/072790

PCT/US02/08146

complexes. Additionally, compounds that interfere with, weaken, dissociate or disrupt, or alternatively, initiate, facilitate or stabilize the protein-protein interaction between the interacting protein members of the protein complexes can also be effective in modulating the functions or activities of the protein complexes. Thus, the compounds identified in
5 the screening methods of the present invention can be made into therapeutically or prophylactically effective drugs for preventing or ameliorating diseases, disorders or symptoms caused by or associated with the protein complexes or Tsg101 or HIV GAG or HIV GAGp6 or other retroviral GAG polypeptides. Alternatively, they may be used as leads to aid the design and identification of therapeutically or prophylactically effective
10 compounds for diseases, disorders or symptoms caused by or associated with the protein complexes of the present invention or interacting members thereof. The protein complexes and/or interacting protein members thereof in accordance with the present invention can be used in any of a variety of drug screening techniques. Drug screening can be performed as described herein or using well-known techniques, such as those
15 described in U.S. Patent Nos. 5,800,998 and 5,891,628, both of which are incorporated herein by reference.

4.1. Test Compounds

Any test compounds may be screened in the screening assays of the present
20 invention to select modulators of a Tsg101-containing protein complex of the present invention or interacting members thereof. By the term "selecting" or "select" modulators it is intended to encompass both (a) choosing compounds from a group previously unknown to be modulators of a Tsg101-containing protein complex of the present invention and/or an interacting member thereof, and (b) testing compounds that
25 are known to be capable of binding, or modulating the functions and activities of, a Tsg101-containing protein complex of the present invention and/or an interacting member thereof. Both types of compounds are generally referred to herein as "test compounds." The test compounds may include, by way of example, proteins (e.g., antibodies, small peptides, artificial or natural proteins), nucleic acids, and derivatives,
30 mimetics and analogs thereof, and small organic molecules having a molecular weight of no greater than 10,000 daltons, more preferably less than 5,000 daltons. Preferably, the

WO 02/072790

PCT/US02/08146

test compounds are provided in library formats known in the art, e.g., in chemically synthesized libraries, recombinant expression libraries (e.g., phage display libraries), and in vitro translation-based libraries (e.g., ribosome display libraries).

For example, the screening assays of the present invention can be used in the antibody production processes described in Section 3 to select antibodies with desirable specificities. Various forms antibodies or derivatives thereof may be screened, including but not limited to, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, bifunctional antibodies, chimeric antibodies, single chain antibodies, antibody fragments such as Fv fragments, single-chain Fv fragments (scFv), Fab' fragments, and F(ab')₂ fragments, and various modified forms of antibodies such as catalytic antibodies, and antibodies conjugated to toxins or drugs, and the like. The antibodies can be of any types such as IgG, IgE, IgA, or IgM. Humanized antibodies are particularly preferred. Preferably, the various antibodies and antibody fragments may be provided in libraries to allow large-scale high throughput screening. For example, expression libraries expressing antibodies or antibody fragments may be constructed by a method disclosed, e.g., in Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989), which is incorporated herein by reference. Single-chain Fv (scFv) antibodies are of particular interest in diagnostic and therapeutic applications. Methods for providing antibody libraries are also provided in U.S. Patent Nos. 6,096,551; 5,844,093; 5,837,460; 5,789,208; and 5,667,988, all of which are incorporated herein by reference.

Peptidic test compounds may be peptides having L-amino acids and/or D-amino acids, phosphopeptides, and other types of peptides. The screened peptides can be of any size, but preferably have less than about 50 amino acids. Smaller peptides are easier to deliver into a patient's body. Various forms of modified peptides may also be screened. Like antibodies, peptides can also be provided in, e.g., combinatorial libraries. *See generally*, Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.*, 37:1233-1251 (1994). Methods for making random peptide libraries are disclosed in, e.g., Devlin *et al.*, *Science*, 249:404-406 (1990). Other suitable methods for constructing peptide libraries and screening peptides therefrom are disclosed in, e.g., Scott and Smith, *Science*, 249:386-390 (1990); Moran *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 117:10787-10788 (1995) (a library of electronically tagged synthetic peptides); Stachelhaus *et al.*, *Science*, 269:69-72 (1995); U.S. Patent Nos.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

6,156,511; 6,107,059; 6,015,561; 5,750,344; 5,834,318; 5,750,344, all of which are incorporated herein by reference. For example, random-sequence peptide phage display libraries may be generated by cloning synthetic oligonucleotides into the gene III or gene VIII of an *E. coli* filamentous phage. The thus generated phage can propagate in *E. coli* and express peptides encoded by the oligonucleotides as fusion proteins on the surface of the phage. Scott and Smith, *Science*, 249:368-390 (1990). Alternatively, the "peptides on plasmids" method may also be used to form peptide libraries. In this method, random peptides may be fused to the C-terminus of the *E. coli* Lac repressor by recombinant technologies and expressed from a plasmid that also contains Lac repressor-binding sites.

10 As a result, the peptide fusions bind to the same plasmid that encodes them.

Small organic or inorganic non-peptide non-nucleotide compounds having a molecular weight of less than 5,000 daltons are preferred test compounds for the screening assays of the present invention. They too can be provided in a library format. See generally, Gordan *et al.* *J. Med. Chem.*, 37:1385-1401 (1994). For example, benzodiazepine libraries are provided in Bunin and Ellman, *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10997-10998 (1992), which is incorporated herein by reference. A method for constructing and screening peptoid libraries are disclosed in Simon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9367-9371 (1992). Methods for the biosynthesis of novel polyketides in a library format are described in McDaniel *et al.*, *Science*, 262:1546-1550 (1993) and Kao *et al.*, *Science*, 265:509-512 (1994). Various libraries of small organic molecules and methods of construction thereof are disclosed in U.S. Patent Nos. 6,162,926 (multiply-substituted fullerene derivatives); 6,093,798 (hydroxamic acid derivatives); 5,962,337 (combinatorial 1,4-benzodiazepin-2, 5-dione library); 5,877,278 (Synthesis of N-substituted oligomers); 5,866,341 (compositions and methods for screening drug libraries); 5,792,821 (polymerizable cyclodextrin derivatives); 5,766,963 (hydroxypropylamine library); and 5,698,685 (morpholino-subunit combinatorial library), all of which are incorporated herein by reference.

20
25

Other compounds such as oligonucleotides and peptide nucleic acids (PNA), and analogs and derivatives thereof may also be screened to select clinically useful compounds. Combinatorial libraries of oligos are also known in the art. See Gold *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:13581-13584 (1995).

30

WO 02/072790

PCT/US02/08146

4.2. *In vitro* Screening Assays

The test compounds may be screened in an *in vitro* assay to select compounds capable of binding the protein complexes or interacting protein members thereof in accordance with the present invention. For this purpose, a test compound is contacted with a protein complex or an interacting protein member thereof under conditions and for a time sufficient to allow specific interaction between the test compound and the target components to occur and thus binding of the compound to the target forming a complex. Subsequently, the binding event is detected.

Various screening techniques known in the art may be used in the present invention. The protein complexes and the interacting protein members thereof may be prepared by any suitable methods, e.g., by recombinant expression and purification. The protein complexes and/or interacting protein members thereof (both are referred to as "target" hereinafter in this section) may be free in solution or in cell extracts. A test compound may be mixed with a target forming a liquid mixture. The compound may be labeled with a detectable marker. Upon mixing under suitable conditions, the binding complex having the compound and the target may be co-immunoprecipitated and washed. The compound in the precipitated complex may be detected based on the marker on the compound.

In a preferred embodiment, the target is immobilized on a solid support or on a cell surface. Preferably, the target can be arrayed into a protein microchip in a method described in Section 2. For example, a target may be immobilized directly onto a microchip substrate such as glass slides or onto a multi-well plates using non-neutralizing antibodies, i.e., antibodies capable of binding to the target but do not substantially affect its biological activities. To effect the screening, test compounds can be contacted with the immobilized target to allow binding to occur to form complexes under standard binding assay conditions. Either the targets or test compounds are labeled with a detectable marker using well-known labeling techniques. For example, U.S. Patent No. 5,741,713 discloses combinatorial libraries of biochemical compounds labeled with NMR active isotopes. To select binding compounds, one may measure the formation of the target-test compound complexes or kinetics for the formation thereof. When

WO 02/072790

PCT/US02/08146

combinatorial libraries of organic non-peptide non-nucleic acid compound are screened, it is preferred that labeled or encoded (or "tagged") combinatorial libraries are used to allow rapid decoding of lead structures. This is especially important because, unlike biological libraries, individual compounds found in chemical libraries cannot be
5 amplified by self-amplification. Tagged combinatorial libraries are provided in, e.g., Borchardt and Still, *J. Am. Chem. Soc.*, 116:373-374 (1994) and Moran *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 117:10787-10788 (1995), both of which are incorporated herein by reference.

Alternatively, the test compounds can be immobilized on a solid support, e.g.,
10 forming a macroarray of test compounds. The target protein or protein complex is then contacted with the test compounds. The target may be labeled with any suitable detection marker. For example, the target may be labeled with radioactive isotopes or fluorescence marker before binding reaction occurs. Alternatively, after the binding reactions, antibodies that are immunoreactive with the target and are labeled with radioactive
15 materials, fluorescence markers, enzymes, or labeled secondary anti-Ig antibodies may be used to detect any bound target thus selecting the binding compound. One example of this embodiment is the protein probing method. That is, the target provided in accordance with the present invention is used as a probe to screen expression libraries of proteins or random peptides. The expression libraries can be phage display libraries, in
20 vitro translation-based libraries, or ordinary expression cDNA libraries. The libraries may be immobilized on a solid support such as nitrocellulose filters. *See e.g.*, Sikela and Hahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:3038-3042 (1987). The probe may be labeled by a radioactive isotope or a fluorescence marker. Alternatively, the probe can be biotinylated and detected with a streptavidin-alkaline phosphatase conjugate. More conveniently, the
25 bound probe may be detected with an antibody.

In yet another embodiment, a known ligand capable of binding to the target can be used in competitive binding assays. Complexes between the known ligand and the target can be formed and then contacted with test compounds. The ability of a test compound to interfere with the interaction between the target and the known ligand is
30 measured. One exemplary ligand is an antibody capable of specifically binding the target. Particularly, such an antibody is especially useful for identifying peptides that

WO 02/072790

PCT/US02/08146

share one or more antigenic determinants of the target protein complex or interacting protein members thereof.

In a specific embodiment, a protein complex used in the screening assay includes a hybrid protein as described in Section 2, which is formed by fusion of two interacting protein members or fragments or domains thereof. The hybrid protein may also be designed such that it contains a detectable epitope tag fused thereto. Suitable examples of such epitope tags include sequences derived from, e.g., influenza virus hemagglutinin (HA), Simian Virus 5 (V5), polyhistidine (6xHis), *c-myc*, lacZ, GST, and the like.

Test compounds may also be screened in an *in vitro* assay to select interaction antagonists of the protein complexes identified in accordance with the present invention. Thus, for example, a Tsg101-HIV GAGp6 protein complex can be contacted with a test compound and disruption or destabilization of the protein complex can be detected.

The assay can be conducted in similar manners as the binding assays described above. For example, the presence or absence of a particular protein complex can be detected by an antibody selectively immunoreactive with the protein complex. Thus, after incubation of the protein complex with a test compound, immunoprecipitation assay can be conducted with the antibody. If the test compound disrupts the protein complex, then the amount of immunoprecipitated protein complex in this assay will be significantly less than that in a control assay in which the same protein complex is not contacted with the test compound. Various other detection methods may be suitable in the dissociation assay, as will be apparent to skilled artisan apprised of the present disclosure. In one embodiment, one of the interacting partner with a detectable marker fused thereto is fixed to a solid support. For example, a GST-GAGp6 fusion protein is attached to a solid support. Then the other interacting partner with a detectable marker fused thereto (e.g., a myc-tagged Tsg101 fragment containing the UEV domain) is contacted with the immobilized first interacting partner in the presence of one or more test compounds. If binding between the two interacting partners occurs, the myc-tagged Tsg101 fragment is also immobilized, which can be detected using an anti-myc antibody after the binding reaction mixture is washed to remove unbound myc-tagged Tsg101 fragment.

30 **4.3. *In vivo* Screening Assays**

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Test compounds can also be screened in any *in vivo* assays to select modulators of the protein complexes or interacting protein members thereof in accordance with the present invention. For example, any *in vivo* assays known in the art useful in selecting compounds capable of strengthening or interfering with the stability of the protein complexes of the present invention may be used.

4.3.1. Two-Hybrid Assays

In a preferred embodiment, one of the yeast two-hybrid systems or their analogous or derivative forms is used. Examples of suitable two-hybrid systems known in the art include, but are not limited to, those disclosed in U.S. Patent Nos. 5,283,173; 5,525,490; 5,585,245; 5,637,463; 5,695,941; 5,733,726; 5,776,689; 5,885,779; 5,905,025; 6,037,136; 6,057,101; 6,114,111; and Bartel and Fields, eds., *The Yeast Two-Hybrid System*, Oxford University Press, New York, NY, 1997, all of which are incorporated herein by reference.

Typically, in a classic transcription-based two-hybrid assay, two chimeric genes are prepared encoding two fusion proteins: one contains a transcription activation domain fused to an interacting protein member of a protein complex of the present invention or an interacting domain of the interacting protein member, while the other fusion protein includes a DNA binding domain fused to another interacting protein member of the protein complex or an interacting domain thereof. For the purpose of convenience, the two interacting protein members or interacting domains thereof are referred to as "bait fusion protein" and "prey fusion protein," respectively. The chimeric genes encoding the fusion proteins are termed "bait chimeric gene" and "prey chimeric gene," respectively. Typically, a "bait vector" and a "prey vector" are provided for the expression of a bait chimeric gene and a prey chimeric gene, respectively.

4.3.1.1. Vectors

Many types of vectors can be used in a transcription-based two-hybrid assay. Methods for the construction of bait vectors and prey vectors should be apparent to skilled artisans in the art apprised of the present disclosure. See generally, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Ed. Ausubel, et al., Greene Publish. Assoc. &

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Wiley Interscience, Ch. 13, 1988; Glover, *DNA Cloning*, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3, 1986; Bitter, *et al.*, in *Methods in Enzymology* 153:516-544 (1987); *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Eds. Strathern *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II, 1982; and Rothstein in *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vol. 11, Ed.

5 DM Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986.

Generally, the bait and prey vectors include an expression cassette having a promoter operably linked to a chimeric gene for the transcription of the chimeric gene. The vectors may also include an origin of DNA replication for the replication of the vectors in host cells and a replication origin for the amplification of the vectors in, e.g., *E. coli*, and selection marker(s) for selecting and maintaining only those host cells harboring the vectors. Additionally, the expression cassette preferably also contains inducible elements, which function to control the expression of a chimeric gene. Making the expression of the chimeric genes inducible and controllable is especially important in the event that the fusion proteins or components thereof are toxic to the host cells. Other regulatory sequences such as transcriptional enhancer sequences and translation regulation sequences (e.g., Shine-Dalgarno sequence) can also be included in the expression cassette. Termination sequences such as the bovine growth hormone, SV40, lacZ and AcMNPV polyhedral polyadenylation signals may also be operably linked to a chimeric gene in the expression cassette. An epitope tag coding sequence for detection and/or purification of the fusion proteins can also be operably linked to the chimeric gene in the expression cassette. Examples of useful epitope tags include, but are not limited to, influenza virus hemagglutinin (HA), Simian Virus 5 (V5), polyhistidine (6xHis), *c-myc*, lacZ, GST, and the like. Proteins with polyhistidine tags can be easily detected and/or purified with Ni affinity columns, while specific antibodies to many epitope tags are generally commercially available. The vectors can be introduced into the host cells by any techniques known in the art, e.g., by direct DNA transformation, microinjection, electroporation, viral infection, lipofection, gene gun, and the like. The bait and prey vectors can be maintained in host cells in an extrachromosomal state, i.e., as self-replicating plasmids or viruses. Alternatively, one or both vectors can be integrated into chromosomes of the host cells by conventional techniques such as selection of stable cell lines or site-specific recombination.

10
15
20
25
30

WO 02/072790

PCT/US02/08146

The *in vivo* assays of the present invention can be conducted in many different host cells, including but not limited to bacteria, yeast cells, plant cells, insect cells, and mammalian cells. A skilled artisan will recognize that the designs of the vectors can vary with the host cells used. In one embodiment, the assay is conducted in prokaryotic cells such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*, and *Rhizobium*. Suitable origins of replication for the expression vectors useful in this embodiment of the present invention include, e.g., the ColE1, pSC101, and M13 origins of replication. Examples of suitable promoters include, for example, the T7 promoter, the *lacZ* promoter, and the like. In addition, inducible promoters are also useful in modulating the expression of the chimeric genes. For example, the *lac* operon from bacteriophage lambda *plac5* is well known in the art and is inducible by the addition of IPTG to the growth medium. Other known inducible promoters useful in a bacteria expression system include pL of bacteriophage λ , the *trp* promoter, and hybrid promoters such as the *tac* promoter, and the like.

In addition, selection marker sequences for selecting and maintaining only those cells expressing the desirable fusion proteins should also be incorporated into the expression vectors. Numerous selection markers including auxotrophic markers and antibiotic resistance markers are known in the art and can all be useful for purposes of this invention. For example, the *bla* gene which confers ampicillin resistance is the most commonly used selection marker in prokaryotic expression vectors. Other suitable markers include genes that confer neomycin, kanamycin, or hygromycin resistance to the host cells. In fact, many vectors are commercially available from vendors such as Invitrogen Corp. of San Diego, Calif., Clontech Corp. of Palo Alto, Calif., BRL of Bethesda, Maryland, and Promega Corp. of Madison, Wiscon. These commercially available vectors, e.g., pBR322, pSPORT, pBluescriptIIISK, pcDNAI, and pcDNAII all have a multiple cloning site into which the chimeric genes of the present invention can be conveniently inserted using conventional recombinant techniques. The constructed expression vectors can be introduced into host cells by various transformation or transfection techniques generally known in the art.

In another embodiment, mammalian cells are used as host cells for the expression of the fusion proteins and detection of protein-protein interactions. For this purpose,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

virtually any mammalian cells can be used including normal tissue cells, stable cell lines, and transformed tumor cells. Conveniently, mammalian cell lines such as CHO cells, Jurkat T cells, NIH 3T3 cells, HEK-293 cells, CV-1 cells, COS-1 cells, HeLa cells, VERO cells, MDCK cells, WI38 cells, and the like are used. Mammalian expression

5 vectors are well known in the art and many are commercially available. Examples of suitable promoters for the transcription of the chimeric genes in mammalian cells include viral transcription promoters derived from adenovirus, simian virus 40 (SV40) (e.g., the early and late promoters of SV40), Rous sarcoma virus (RSV), and cytomegalovirus (CMV) (e.g., CMV immediate-early promoter), human immunodeficiency virus (HIV)

10 (e.g., long terminal repeat (LTR)), vaccinia virus (e.g., 7.5K promoter), and herpes simplex virus (HSV) (e.g., thymidine kinase promoter). Inducible promoters can also be used. Suitable inducible promoters include, for example, the tetracycline responsive element (TRE) (*See Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)*), metallothionein IIA promoter, ecdysone-responsive promoter, and heat shock promoters.

15 Suitable origins of replication for the replication and maintenance of the expression vectors in mammalian cells include, e.g., the Epstein Barr origin of replication in the presence of the Epstein Barr nuclear antigen (*see Sugden et al., Mole. Cell. Biol., 5:410-413 (1985)*) and the SV40 origin of replication in the presence of the SV40 T antigen (which is present in COS-1 and COS-7 cells) (*see Margolskee et al., Mole. Cell. Biol., 8:2837 (1988)*). Suitable selection markers include, but are not limited to, genes

20 conferring resistance to neomycin, hygromycin, zeocin, and the like. Many commercially available mammalian expression vectors may be useful for the present invention, including, e.g., pCEP4, pcDNA1, pIND, pSecTag2, pVAX1, pcDNA3.1, and pBI-EGFP, and pDisplay. The vectors can be introduced into mammalian cells using any

25 known techniques such as calcium phosphate precipitation, lipofection, electroporation, and the like. The bait vector and prey vector can be co-transformed into the same cell or, alternatively, introduced into two different cells which are subsequently fused together by cell fusion or other suitable techniques.

Viral expression vectors, which permit introduction of recombinant genes into

30 cells by viral infection, can also be used for the expression of the fusion proteins. Viral expression vectors generally known in the art include viral vectors based on adenovirus,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

bovine papilloma virus, murine stem cell virus (MSCV), MFG virus, and retrovirus. See Sarver, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1: 486 (1981); Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3655-3659 (1984); Mackett, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:7415-7419 (1982); Mackett, *et al.*, *J. Virol.*, 49:857-864 (1984); Panicali, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4927-4931 (1982); Cone & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6349-6353 (1984); Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159 (1993); Pear *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8392-8396 (1993); Kitamura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:9146-9150 (1995); Kinsella *et al.*, *Human Gene Therapy*, 7:1405-1413 (1996); Hofmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:5185-5190 (1996); Choate *et al.*, *Human Gene Therapy*, 7:2247 (1996); WO 94/19478; Hawley *et al.*, *Gene Therapy*, 1:136 (1994) and Rivere *et al.*, *Genetics*, 92:6733 (1995), all of which are incorporated by reference.

Generally, to construct a viral vector, a chimeric gene according to the present invention can be operably linked to a suitable promoter. The promoter-chimeric gene construct is then inserted into a non-essential region of the viral vector, typically a modified viral genome. This results in a viable recombinant virus capable of expressing the fusion protein encoded by the chimeric gene in infected host cells. Once in the host cell, the recombinant virus typically is integrated into the genome of the host cell. However, recombinant bovine papilloma viruses typically replicate and remain as extrachromosomal elements.

In another embodiment, the detection assays of the present invention are conducted in plant cell systems. Methods for expressing exogenous proteins in plant cells are well known in the art. See generally, Weissbach & Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, 1988; Grierson & Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, 1988. Recombinant virus expression vectors based on, e.g., cauliflower mosaic virus (CaMV) or tobacco mosaic virus (TMV) can all be used. Alternatively, recombinant plasmid expression vectors such as Ti plasmid vectors and Ri plasmid vectors are also useful. The chimeric genes encoding the fusion proteins of the present invention can be conveniently cloned into the expression vectors and placed under control of a viral promoter such as the 35S RNA and 19S RNA promoters of CaMV or the coat protein promoter of TMV, or of a plant promoter, e.g.,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

the promoter of the small subunit of RUBISCO and heat shock promoters (e.g., soybean hsp17.5-E or hsp17.3-B promoters).

In addition, the *in vivo* assay of the present invention can also be conducted in insect cells, e.g., *Spodoptera frugiperda* cells, using a baculovirus expression system.

5. Expression vectors and host cells useful in this system are well known in the art and are generally available from various commercial vendors. For example, the chimeric genes of the present invention can be conveniently cloned into a non-essential region (e.g., the polyhedrin gene) of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) vector and placed under control of an AcNPV promoter (e.g., the polyhedrin promoter).
- 10 The non-occluded recombinant viruses thus generated can be used to infect host cells such as *Spodoptera frugiperda* cells in which the chimeric genes are expressed. See U.S. Patent No. 4,215,051.

- In a preferred embodiment of the present invention, the fusion proteins are expressed in a yeast expression system using yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*,
- 15 *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, and *Schizosaccharomyces pombe* as host cells. The expression of recombinant proteins in yeasts is a well-developed field, and the techniques useful in this respect are disclosed in detail in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Eds. Strathern *et al.*, Vols. I and II, Cold Spring Harbor Press, 1982; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, New York, Wiley, 1994;
- 20 and Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, in *Methods in Enzymology*, Vol. 194, 1991, all of which are incorporated herein by reference. Sudbery, *Curr. Opin. Biotech.*, 7:517-524 (1996) reviews the success in the art in expressing recombinant proteins in various yeast species; the entire content and references cited therein are incorporated herein by reference. In addition, Bartel and Fields, eds., *The*
- 25 *Yeast Two-Hybrid System*, Oxford University Press, New York, NY, 1997 contains extensive discussions of recombinant expression of fusion proteins in yeasts in the context of various yeast two-hybrid systems, and cites numerous relevant references. These and other methods known in the art can all be used for purposes of the present invention. The application of such methods to the present invention should be apparent
- 30 to a skilled artisan apprised of the present disclosure.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Generally, each of the two chimeric genes is included in a separate expression vector (bait vector and prey vector). Both vectors can be co-transformed into a single yeast host cell. As will be apparent to a skilled artisan, it is also possible to express both chimeric genes from a single vector. In a preferred embodiment, the bait vector and prey
5 vector are introduced into two haploid yeast cells of opposite mating types, e.g., a-type and α -type, respectively. The two haploid cells can be mated at a desired time to form a diploid cell expressing both chimeric genes.

Generally, the bait and prey vectors for recombinant expression in yeast include a yeast replication origin such as the 2μ origin or the *ARSH4* sequence for the replication and maintenance of the vectors in yeast cells. Preferably, the vectors also have a bacteria
10 origin of replication (e.g., ColE1) and a bacteria selection marker (e.g., amp^R marker, i.e., *bla* gene). Optionally, the *CEN6* centromeric sequence is included to control the replication of the vectors in yeast cells. Any constitutive or inducible promoters capable of driving gene transcription in yeast cells may be employed to control the expression of
15 the chimeric genes. Such promoters are operably linked to the chimeric genes. Examples of suitable constitutive promoters include but are not limited to the yeast *ADHI*, *PGKI*, *TEF2*, *GPD1*, *HIS3*, and *CYC1* promoters. Example of suitable inducible promoters include but are not limited to the yeast *GALI* (inducible by galactose), *CUP1* (inducible by Cu^{++}), and *FUS1* (inducible by pheromone) promoters; the *AOX/MOX* promoter from
20 *H. polymorpha* and *P. Pastoris* (repressed by glucose or ethanol and induced by methanol); chimeric promoters such as those that contain LexA operators (inducible by LexA-containing transcription factors); and the like. Inducible promoters are preferred when the fusion proteins encoded by the chimeric genes are toxic to the host cells. If it is
25 desirable, certain transcription repressing sequences such as the upstream repressing sequence (URS) from SPO13 promoter can be operably linked to the promoter sequence, e.g., to the 5' end of the promoter region. Such upstream repressing sequences function to fine-tune the expression level of the chimeric genes.

Preferably, a transcriptional termination signal is operably linked to the chimeric genes in the vectors. Generally, transcriptional termination signal sequences derived
30 from, e.g., the *CYC1* and *ADHI* genes can be used.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Additionally, it is preferred that the bait vector and prey vector contain one or more selectable markers for the selection and maintenance of only those yeast cells that harbor a chimeric gene. Any selectable markers known in the art can be used for purposes of this invention so long as yeast cells expressing the chimeric gene(s) can be positively identified or negatively selected. Examples of markers that can be positively identified are those based on color assays, including the lacZ gene which encodes β -galactosidase, the firefly luciferase gene, secreted alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, the blue fluorescent protein (BFP), and the green fluorescent protein (GFP) gene (see Cubitt *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 20:448-455 (1995)). Other markers emitting fluorescence, chemiluminescence, UV absorption, infrared radiation, and the like can also be used. Among the markers that can be selected are auxotrophic markers including, but not limited to, *URA3*, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *LYS2*, *ADE2*, and the like. Typically, for purposes of auxotrophic selection, the yeast host cells transformed with bait vector and/or prey vector are cultured in a medium lacking a particular nutrient.

Other selectable markers are not based on auxotrophies, but rather on resistance or sensitivity to an antibiotic or other xenobiotic. Examples of such markers include but are not limited to chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene, which confers resistance to chloramphenicol; *CAN1* gene, which encodes an arginine permease and thereby renders cells sensitive to canavanine (see Sikorski *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 194:302-318 (1991)); the bacterial kanamycin resistance gene (kan^R), which renders eucaryotic cells resistant to the aminoglycoside G418 (see Wach *et al.*, *Yeast*, 10:1793-1808 (1994)); and *CYH2* gene, which confers sensitivity to cycloheximide (see Sikorski *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 194:302-318 (1991)). In addition, the *CUP1* gene, which encodes metallothionein and thereby confers resistance to copper, is also a suitable selection marker. Each of the above selection markers may be used alone or in combination. One or more selection markers can be included in a particular bait or prey vector. The bait vector and prey vector may have the same or different selection markers. In addition, the selection pressure can be placed on the transformed host cells either before or after mating the haploid yeast cells.

As will be apparent, the selection markers used should complement the host strains in which the bait and/or prey vectors are expressed. In other words, when a gene

WO 02/072790

PCT/US02/08146

is used as a selection marker gene, a yeast strain lacking the selection marker gene (or having mutation in the corresponding gene) should be used as host cells. Numerous yeast strains or derivative strains corresponding to various selection markers are known in the art. Many of them have been developed specifically for certain yeast two-hybrid systems. The application and optional modification of such strains with respect to the present invention should be apparent to a skilled artisan apprised of the present disclosure. Methods for genetically manipulating yeast strains using genetic crossing or recombinant mutagenesis are well known in the art. See e.g., Rothstein, *Meth. Enzymol.*, 101:202-211 (1983). By way of example, the following yeast strains are well known in the art, and can be used in the present invention upon necessary modifications and adjustment:

L40 strain which has the genotype *MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8-lacZ*;

EGY48 strain which has the genotype *MATa trp1 his3 ura3 6ops-LEU2*; and

15 MaV103 strain which has the genotype *MATa ura3-52 leu2-3,112 trp1-901 his3Δ200 ade2-101 gal4A gal80Δ SPAL10::URA3 GAL1::HIS3::lys2* (see Kumar *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:13548-13554 (1997); Vidal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10315-10320 (1996)). Such strains are generally available in the research community, and can also be obtained by simple yeast genetic manipulation. See, e.g., *The Yeast Two-*
 20 *Hybrid System*, Bartel and Fields, eds., pages 173-182, Oxford University Press, New York, NY, 1997.

In addition, the following yeast strains are commercially available:

Y190 strain which is available from Clontech, Palo Alto, California and has the genotype *MATa gal4 gal80 his3Δ200 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3, 112*

25 *URA3::GAL1-lacZ LYS2::GAL1-HIS3 cyh^r*; and

YRG-2 Strain which is available from Stratagene, La Jolla, California and has the genotype *MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3, 112 gal4-542 gal80-538 LYS2::GAL1-HIS3 URA3::GAL1/CYCI-lacZ*.

In fact, different versions of vectors and host strains specially designed for yeast
 30 two-hybrid system analysis are available in kits from commercial vendors such as

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Clontech, Palo Alto, California and Stratagene, La Jolla, California, all of which can be modified for use in the present invention.

4.3.1.2. Reporters

5 Generally, in a transcription-based two-hybrid assay, the interaction between a bait fusion protein and a prey fusion protein brings the DNA-binding domain and the transcription-activation domain into proximity forming a functional transcriptional factor, which acts on a specific promoter to drive the expression of a reporter protein. The transcription activation domain and the DNA-binding domain may be selected from
10 various known transcriptional activators, e.g., GAL4, GCN4, ARD1, the human estrogen receptor, *E. coli* LexA protein, herpes simplex virus VP16 (Triezenberg *et al.*, *Genes Dev.* 2:718-729 (1988)), the *E. coli* B42 protein (acid blob, *see* Gyuris *et al.*, *Cell*, 75:791-803 (1993)), NF- κ B p65, and the like. The reporter gene and the promoter driving its transcription typically are incorporated into a separate reporter vector.
15 Alternatively, the host cells are engineered to contain such a promoter-reporter gene sequence in their chromosomes. Thus, the interaction or lack of interaction between two interacting protein members of a protein complex can be determined by detecting or measuring changes in the reporter in the assay system. Although the reporters and selection markers can be of similar types and used in a similar manner in the present
20 invention, the reporters and selection markers should be carefully selected in a particular detection assay such that they are distinguishable from each other and do not interfere with each other's function.

Many different types of reporters are useful in screening assays. For example, a reporter protein may be a fusion protein having an epitope tag fused to a protein.
25 Commonly used and commercially available epitope tags include sequences derived from, e.g., influenza virus hemagglutinin (HA), Simian Virus 5 (V5), polyhistidine (6xHis), *c-myc*, lacZ, GST, and the like. Antibodies specific to these epitope tags are generally commercially available. Thus, the expressed reporter can be detected using an epitope-specific antibody in an immunoassay.

30 In another embodiment, the reporter is selected such that it can be detected by a color-based assay. Examples of such reporters include, e.g., the lacZ protein (β -

WO 02/072790

PCT/US02/08146

galactosidase), the green fluorescent protein (GFP), which can be detected by fluorescence assay and sorted by flow-activated cell sorting (FACS) (See Cubitt *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 20:448-455 (1995)), secreted alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, the blue fluorescent protein (BFP), and luciferase photoproteins such as aequorin, obelin, mmeiopsin, and berovin (See U.S. Patent No. 6,087,476, which is incorporated herein by reference).

Alternatively, an auxotrophic factor is used as a reporter in a host strain deficient in the auxotrophic factor. Thus, suitable auxotrophic reporter genes include, but are not limited to, *URA3*, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *LYS2*, *ADE2*, and the like. For example, yeast cells containing a mutant *URA3* gene can be used as host cells (Ura⁻ phenotype). Such cells lack *URA3*-encoded functional orotidine-5'-phosphate decarboxylase, an enzyme required by yeast cells for the biosynthesis of uracil. As a result, the cells are unable to grow on a medium lacking uracil. However, wild-type orotidine-5'-phosphate decarboxylase catalyzes the conversion of a non-toxic compound 5-fluoroorotic acid (5-FOA) to a toxic product, 5-fluorouracil. Thus, yeast cells containing a wild-type *URA3* gene are sensitive to 5-FOA and cannot grow on a medium containing 5-FOA. Therefore, when the interaction between the interacting protein members in the fusion proteins results in the expression of active orotidine-5'-phosphate decarboxylase, the Ura^R (Foa^R) yeast cells will be able to grow on a uracil deficient medium (SC-Ura plates). However, such cells will not survive on a medium containing 5-FOA. Thus, protein-protein interactions can be detected based on cell growth.

Additionally, antibiotic resistance reporters can also be employed in a similar manner. In this respect, host cells sensitive to a particular antibiotic is used. Antibiotic resistance reporters include, for example, chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene and the *kan^R* gene, which confers resistance to G418 in eukaryotes and to kanamycin in prokaryotes.

4.3.1.3. Screening Assays for Interaction Antagonists

The screening assay of the present invention is useful in selecting compounds capable of interfering with or disrupting or dissociating protein-protein interaction in the protein complexes of the present invention, i.e., interactions between Tsg101 or a

WO 02/072790

PCT/US02/08146

homologue or derivative thereof and HIV GAG, HIV GAGp6, other retroviral GAG containing a P(T/S)AP late domain motif, or a homologue or derivative thereof. For example, Tsg101 and HIV GAG play a role in HIV propagation, and thus are involved in HIV infection and AIDS. It may be possible to ameliorate or alleviate the diseases or disorders in a patient by interfering with or dissociating normal interactions between Tsg101 and HIV GAG. Alternatively, if the disease or disorder is associated with increased expression of Tsg101 and/or HIV GAG in accordance with the present invention, then the disease may be treated or prevented by weakening or dissociating the interaction between Tsg101 and HIV GAG in a patient. In addition, if a disease or disorder is associated with mutant forms of Tsg101 and/or HIV GAG that lead to strengthened protein-protein interaction therebetween, then the disease or disorder may be treated with a compound that weakens or interferes with the interaction between the mutant forms of Tsg101 and HIV GAG.

In a screening assay for interaction antagonists, Tsg101 and HIV GAG or GAGp6, for example, are used as test proteins expressed in the form of fusion proteins as described above for purposes of a two-hybrid assay. The fusion proteins are expressed in a host cell and allowed to interact with each other in the presence of one or more test compounds.

In a preferred embodiment, a counterselectable marker is used as a reporter such that a detectable signal (e.g., appearance of color or fluorescence, or cell survival) is present only when the test compound is capable of interfering with the interaction between the two test proteins. In this respect, the reporters used in various "reverse two-hybrid systems" known in the art may be employed. Reverse two-hybrid systems are disclosed in, e.g., U.S. Patent Nos. 5,525,490; 5,733,726; 5,885,779; Vidal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10315-10320 (1996); and Vidal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10321-10326 (1996), all of which are incorporated herein by reference.

Examples of suitable counterselectable reporters useful in a yeast system include the *URA3* gene (encoding orotidine-5'-decarboxylase, which converts 5-fluorouracil to the toxic metabolite 5-fluorouracil), the *CAN1* gene (encoding arginine permease, which transports toxic arginine analog canavanine into yeast cells), the *GALI* gene (encoding galactokinase, which catalyzes the conversion of 2-deoxygalactose to

WO 02/072790

PCT/US02/08146

toxic 2-deoxygalactose-1-phosphate), the *LYS2* gene (encoding α -aminoacidipate reductase, which renders yeast cells unable to grow on a medium containing α -aminoacidipate as the sole nitrogen source), the *MET15* gene (encoding O-acetylhomoserine sulfhydrylase, which confers on yeast cells sensitivity to methyl
5 mercury), and the *CYH2* gene (encoding L29 ribosomal protein, which confers sensitivity to cycloheximide). In addition, any known cytotoxic agents including cytotoxic proteins such as the diphtheria toxin (DTA) catalytic domain can also be used as counterselectable reporters. See U.S. Patent No. 5,733,726. DTA causes the ADP-ribosylation of
10 elongation factor-2 and thus inhibits protein synthesis and causes cell death. Other examples of cytotoxic agents include ricin, Shiga toxin, and exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*.

For example, when the *URA3* gene is used as a counterselectable reporter gene, yeast cells containing a mutant *URA3* gene can be used as host cells (Ura^r Foa^R phenotype) for the *in vivo* assay. Such cells lack *URA3*-encoded functional orotidine-5'-
15 phosphate decarboxylase, an enzyme required for the biosynthesis of uracil. As a result, the cells are unable to grow on media lacking uracil. However, because of the absence of a wild-type orotidine-5'-phosphate decarboxylase, the yeast cells cannot convert non-toxic 5-fluoroorotic acid (5-FOA) to a toxic product, 5-fluorouracil. Thus, such yeast cells are resistant to 5-FOA and can grow on a medium containing 5-FOA. Therefore, for
20 example, to screen for a compound capable of disrupting interaction between Tsg101 and HIV GAGp6, Tsg101 can be expressed as a fusion protein with a DNA-binding domain of a suitable transcription activator while HIV GAGp6 is expressed as a fusion protein with a transcription activation domain of a suitable transcription activator. In the host strain, the reporter *URA3* gene may be operably linked to a promoter specifically
25 responsive to the association of the transcription activation domain and the DNA-binding domain. After the fusion proteins are expressed in the Ura^r Foa^R yeast cells, an *in vivo* screening assay can be conducted in the presence of a test compound with the yeast cells being cultured on a medium containing uracil and 5-FOA. If the test compound does not disrupt the interaction between Tsg101 and HIV GAG or GAGp6, active *URA3* gene
30 product, i.e., orotidine-5'-decarboxylase, which converts 5-FOA to toxic 5-fluorouracil, is expressed. As a result, the yeast cells cannot grow. On the other hand, when the test

WO 02/072790

PCT/US02/08146

compound disrupts the interaction between Tsg101 and HIV GAG or GAGp6, no active orotidine-5'-decarboxylase is produced in the host yeast cells. Consequently, the yeast cells will survive and grow on the 5-FOA-containing medium. Therefore, compounds capable of interfering with or dissociating the interaction between Tsg101 and HIV GAG or GAGp6 can thus be identified based on colony formation.

As will be apparent, the screening assay of the present invention can be applied in a format appropriate for large-scale screening. For example, combinatorial technologies can be employed to construct combinatorial libraries of small organic molecules or small peptides. See generally, e.g., Kenan *et al.*, *Trends Biochem. Sc.*, 19:57-64 (1994); Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.*, 37:1233-1251 (1994); Gordon *et al.*, *J. Med. Chem.*, 37:1385-1401 (1994); Ecker *et al.*, *Biotechnology*, 13:351-360 (1995). Such combinatorial libraries of compounds can be applied to the screening assay of the present invention to isolate specific modulators of particular protein-protein interactions. In the case of random peptide libraries, the random peptides can be co-expressed with the fusion proteins of the present invention in host cells and assayed *in vivo*. See e.g., Yang *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 23:1152-1156 (1995). Alternatively, they can be added to the culture medium for uptake by the host cells.

Conveniently, yeast mating is used in an *in vivo* screening assay. For example, haploid cells of a-mating type expressing one fusion protein as described above is mated with haploid cells of a-mating type expressing the other fusion protein. Upon mating, the diploid cells are spread on a suitable medium to form a lawn. Drops of test compounds can be deposited onto different areas of the lawn. After culturing the lawn for an appropriate period of time, drops containing a compound capable of modulating the interaction between the particular test proteins in the fusion proteins can be identified by stimulation or inhibition of growth in the vicinity of the drops.

The screening assays of the present invention for selecting compounds capable of modulating protein-protein interactions can also be fine-tuned by various techniques to adjust the thresholds or sensitivity of the positive and negative selections. Mutations can be introduced into the reporter proteins to adjust their activities. The uptake of test compounds by the host cells can also be adjusted. For example, yeast high uptake mutants such as the *erg6* mutant strains can facilitate yeast uptake of the test compounds.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

conducted offshore, the information and data on a selected test compound can be generated and cast in a transmittable form as described above. The data and information in a transmittable form thus can be imported into the U.S. or transmitted to any other countries, where the data and information may be used in further testing the selected test compound and/or in modifying and optimizing the selected test compound to develop lead compounds for testing in clinical trials.

Compounds can also be selected based on structural models of the target protein or protein complex and/or test compounds, e.g., by virtual screen. In addition, once an effective compound is identified, structural analogs or mimetics thereof can be produced based on rational drug design with the aim of improving drug efficacy and stability, and reducing side effects. Methods known in the art for virtual screen and rational drug design can be used in the present invention. See, e.g., Hodgson *et al.*, *BioTechnology*, 9:19-21 (1991); U.S. Patent Nos. 5,800,998 and 5,891,628, all of which are incorporated herein by reference. An example of rational drug design is the development of HIV protease inhibitors. See Erickson *et al.*, *Science*, 249:527-533 (1990).

In this respect, structural information on the target protein or protein complex is obtained. Preferably, atomic coordinates defining a three-dimensional structure of the target protein or protein complex are obtained. For example, each of the interacting pair can be expressed and purified. The purified interacting protein pairs are then allowed to interact with each other *in vitro* under appropriate conditions. Optionally, the interacting protein complex can be stabilized by crosslinking or other techniques. The interacting complex can be studied using various biophysical techniques including, e.g., X-ray crystallography, NMR, computer modeling, mass spectrometry, and the like. Methods for obtaining such atomic coordinates by X-ray crystallography, NMR, and the like are known in the art and the application thereof to the target protein or protein complex of the present invention should be apparent to skilled persons in the art of structural biology. See Smyth and Martin, *Mol. Pathol.*, 53:8-14 (2000); Oakley and Wilce, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 27(3):145-151 (2000); Ferentz and Wagner, *Q. Rev. Biophys.*, 33:29-65 (2000); and Roberts, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10:42-47 (1999).

In addition, understanding of the interaction between the proteins of interest in the presence or absence of a modulator compound can also be derived from mutagenesis

WO 02/072790

PCT/US02/08146

analysis using yeast two-hybrid system or other methods for detecting protein-protein interaction. In this respect, various mutations can be introduced into the interacting proteins and the effect of the mutations on protein-protein interaction is examined by a suitable method such as the yeast two-hybrid system.

- 5 Various mutations including amino acid substitutions, deletions and insertions can be introduced into a protein sequence using conventional recombinant DNA technologies. Generally, it is particularly desirable to decipher the binding sites. Thus, it is important that the mutations introduced only affect protein-protein interaction or protein-compound interaction and cause minimal structural disturbances. Mutations are
- 10 preferably designed based on knowledge of the three-dimensional structure of the interacting proteins. Preferably, mutations are introduced to alter charged amino acids or hydrophobic amino acids exposed on the surface of the proteins, since ionic interactions and hydrophobic interactions are often involved in protein-protein interactions. Alternatively, the "alanine scanning mutagenesis" technique is used. *See Wells, et al.,*
- 15 *Methods Enzymol.*, 202:301-306 (1991); *Bass et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:4498-4502 (1991); *Bennet et al., J. Biol. Chem.*, 266:5191-5201 (1991); *Diamond et al., J. Virol.*, 68:863-876 (1994). Using this technique, charged or hydrophobic amino acid residues of the interacting proteins are replaced by alanine, and the effect on the interaction between the proteins is analyzed using e.g., the yeast two-hybrid system. For
- 20 example, the entire protein sequence can be scanned in a window of five amino acids. When two or more charged or hydrophobic amino acids appear in a window, the charged or hydrophobic amino acids are changed to alanine using standard recombinant DNA techniques. The thus mutated proteins are used as "test proteins" in the above-described two-hybrid assay to examine the effect of the mutations on protein-protein interaction.
- 25 Preferably, the mutagenesis analysis is conducted both in the presence and in the absence of an identified modulator compound. In this manner, the domains or residues of the proteins important to protein-protein interaction and/or the interaction between the modulator compound and the proteins can be identified. Likewise, interactions between a selected compound and a target protein (e.g., Tsg101) can also be studied by mutagenesis
- 30 of the target protein.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Based on the structural information obtained, structural relationships between the interacting proteins, between a selected compound and the interacting proteins, or between a selected compound and a target protein are elucidated. The moieties and the three-dimensional structure of the selected compound critical to its modulating effect on the interaction of the proteins of interest or on a target protein are revealed. Medicinal chemists can then design analog compounds having similar moieties and structures.

In addition, an identified peptide compound capable of modulating a particular protein-protein interaction or a particular target protein can also be analyzed by the alanine scanning technique and/or a screening assay to determine the domains or residues of the peptide important to its modulating effect on a particular protein-protein interaction or a particular target protein. The peptide compound can be used as a lead molecule for rational design of small organic molecules or peptide mimetics. See Huber *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, 1:13-34 (1994).

The residues or domains critical to the modulating effect of the identified compound constitute the active region of the compound known as its "pharmacophore." Once the pharmacophore has been elucidated, a structural model can be established by a modeling process that may incorporate data from NMR analysis, X-ray diffraction data, alanine scanning, spectroscopic techniques and the like. Various techniques including computational analysis, similarity mapping and the like can all be used in this modeling process. See *e.g.*, Perry *et al.*, in *OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design*, pp.189-193, Alan R. Liss, Inc., 1989; Rotivinen *et al.*, *Acta Pharmaceutical Fennica*, 97:159-166 (1988); Lewis *et al.*, *Proc. R. Soc. Lond.*, 236:125-140 (1989); McKinaly *et al.*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29:111-122 (1989). Commercial molecular modeling systems available from Polygen Corporation, Waltham, MA, include the CHARMM program, which performs the energy minimization and molecular dynamics functions, and QUANTA program which performs the construction, graphic modeling and analysis of molecular structure. Such programs allow interactive construction, visualization and modification of molecules. Other computer modeling programs are also available from BioDesign, Inc. (Pasadena, CA.), Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario), and Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada).

WO 02/072790

PCT/US02/08146

A template can be formed based on the established model. Various compounds can then be designed by linking various chemical groups or moieties to the template. Various moieties of the template can also be replaced. In addition, in the case of a peptide lead compound, the peptide or mimetics thereof can be cyclized, e.g., by linking
5 the N-terminus and C-terminus together, to increase its stability. These rationally designed compounds are further tested. In this manner, pharmacologically acceptable and stable compounds with improved efficacy and reduced side effect can be developed. The compounds identified in accordance with the present invention can be incorporated into a pharmaceutical formulation suitable for administration to an individual.

10 In addition, the structural models or atomic coordinates defining a three-dimensional structure of the target protein or protein complex can also be used in virtual screen to select compounds capable of modulating the target protein or protein complex. Various methods of computer-based virtual screen using atomic coordinates are generally known in the art. For example, U.S. Patent No. 5,798,247 (which is incorporated herein
15 by reference) discloses a method of identifying a compound (specifically, an interleukin converting enzyme inhibitor) by determining binding interactions between an organic compound and binding sites of a binding cavity within the target protein. The binding sites are defined by atomic coordinates.

20 Thus, as will be apparent to a skilled artisan, atomic coordinates defining a three-dimensional structure of a target protein or protein complex of the present invention can be provided by any methods known in the art. Compounds can then be designed or selected based on the atomic coordinates.

5. Therapeutic Applications

25 In accordance with another aspect of the present invention, methods are provided for modulating a protein complex comprising Tsg101 and HIV GAG or GAGp6 in human cells. The human cells can be in *in vitro* cell or tissue cultures. The methods are also applicable to human cells in a patient.

30 In one embodiment, the concentration of a protein complex having Tsg101 interacting with HIV GAG or GAGp6 is reduced in the cells. Various methods can be employed to reduce the concentration of the protein complex. The protein complex

WO 02/072790

PCT/US02/08146

concentration can be reduced by interfering with the interactions between Tsg101 and HIV GAG or GAGp6. For example, compounds capable of interfering with interactions between Tsg101 and HIV GAG or GAGp6 can be administered to the cells in vitro or in vivo in a patient. Such compounds can be compounds capable of binding Tsg101
5 protein, particularly the UEV domain of Tsg101 protein, or HIV GAG or GAGp6. They can also be antibodies immunoreactive with the Tsg101 protein or HIV GAG or GAGp6. Preferably, antibodies that bind to the UEV domain of the Tsg101 protein are used. Also, the compounds can be small peptides derived from the HIV GAG or GAGp6 protein or mimetics thereof capable of binding Tsg101, or small peptides derived from Tsg101
10 protein or mimetics thereof capable of binding HIV GAG or GAGp6.

In another embodiment, the method of modulating the protein complex includes inhibiting the expression of Tsg101 protein and/or HIV GAG or GAGp6 protein. The inhibition can be at the transcriptional, translational, or post-translational level. For example, antisense compounds and ribozyme compounds can be administered to human
15 cells in cultures or in human bodies.

In the various embodiments described above, preferably the concentrations or activities of both Tsg101 protein and HIV GAG or GAGp6 are reduced or inhibited.

In yet another embodiment, an antibody selectively immunoreactive with a protein complex having Tsg101 interacting with HIV GAG or GAGp6 is administered to
20 cells in vitro or in human bodies to inhibit the protein complex activities and/or reduce the concentration of the protein complex in the cells or patient.

The methods for modulating the protein complex comprising Tsg101 and HIV GAG or GAGp6 as provided according to the present invention can be used to inhibit HIV viral budding from infected host cells. When multiple cells are present, e.g., in cell
25 culture or in a patient's body, the inhibition of viral budding prevents the viruses from being released from the infected host cells thereby suppressing further viral propagation. Accordingly, the present invention also encompasses methods of treating HIV infection and preventing AIDS in patients by reducing the concentration or inhibiting the activities of protein complexes having Tsg101 and HIV GAG or GAGp6, or by reducing the
30 concentration or inhibiting the activities of Tsg101 or of HIV GAG or GAGp6.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

In addition, the methods for modulating the protein complex comprising Tsg101 and HIV GAG or GAGp6 can also be useful in inhibiting the budding of many other viruses, particularly those viruses whose budding from infected host cells is dependent on the late domain motif P(T/S)AP. As described above, the P(T/S)AP motif, which is
5 responsible for HIV GAGp6's interaction with Tsg101, is conserved among the GAGp6 domains of all known primate lentiviruses. In non-primate lentiviruses, which lack a GAGp6 domain, the P(T/S)AP motif is at the immediate C terminus of the GAG polypeptide. In addition, many other retroviruses also contain the P(T/S)AP late domain motif in their GAG polypeptides, which are believed to also interact with Tsg101 in the
10 same manner as the HIV GAGp6 protein.

Accordingly, the present invention also provides methods for modulating a protein complex containing Tsg101 protein and a human retrovirus (other than HIV) GAG polypeptide or a fragment thereof containing a P(T/S)AP late domain motif. Such modulating methods can be used in inhibiting the budding of such a virus from its
15 infected host cells and in treating infections by such a virus in patients.

In addition, the present invention also encompasses methods for modulating a protein complex containing a Tsg101 protein ortholog and a non-human retrovirus GAG polypeptide or a fragment thereof containing a P(T/S)AP late domain motif. Such modulating methods can be used in inhibiting the budding of such non-human
20 retroviruses from their infected animal host cells and in treating infections by such viruses in animals.

Examples of such non-human retroviruses include, but are not limited to, primate lentiviruses other than HIV and non-primate lentiviruses (except for EIAV). As is known in the art, lentiviruses are a group of retroviruses capable of long-term latent infection of
25 vertebrate cells. They replicate in host cells only when activated. Lentiviruses typically have enveloped virions. Non-primate lentiviruses include bovine lentiviruses (e.g. bovine immunodeficiency virus (BIV), Jembrana disease virus), feline lentiviruses (e.g. feline immunodeficiency virus (FIV) which causes immunodeficiency, wasting, and encephalitis in cats), ovine/caprine lentivirus (e.g. caprine arthritis-encephalitis virus
30 (CAEV) which causes anemia and wasting in goats, ovine lentivirus, Visna virus which causes pneumonia, wasting, encephalitis and arthritis), and Equine lentiviruses (e.g.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Equine infectious anemia virus (EIAV), which infects horses causing arthritis and encephalitis). Examples of non-human primate lentiviruses include various simian immunodeficiency viruses that infect hosts such as chimpanzee, mangabey, African Green monkey, mandrill, L'Hoest, Sykes' monkey, or Guereza Colobus monkey.

5 The methods for modulating a protein complex containing Tsg101 protein and a human retrovirus GAG polypeptide or a fragment thereof containing a P(T/S)AP late domain motif and the methods for modulating a protein complex containing a Tsg101 protein ortholog and a non-human retrovirus GAG polypeptide or a fragment thereof containing a P(T/S)AP late domain motif should be performed in a manner similar to
10 those described above in the context of modulating a protein complex of Tsg101 and HIV GAG or GAGp6. Likewise, the methods for treating infection by such other human or non-human viruses should be similar to the methods for treating HIV infection, as will be apparent to skilled artisans apprised of the present disclosure.

Specifically, the concentration of the protein complexes can be reduced in the
15 cells by various methods. For example, the protein complex concentration can be reduced by interfering with the interactions between Tsg101 protein and a human retrovirus GAG polypeptide or a fragment thereof containing a P(T/S)AP late domain motif, or the interactions between a Tsg101 protein ortholog and non-human retroviruses GAG polypeptide or a fragment thereof containing a P(T/S)AP late domain motif.
20 Compounds capable of interfering with the interactions can be administered to cells in vitro or in vivo in a subject to be treated. Such compounds can be compounds capable of binding Tsg101 protein or the Tsg101 protein ortholog, particularly the UEV domain of Tsg101 protein or the Tsg101 protein ortholog. They can also be antibodies immunoreactive with Tsg101 protein or the Tsg101 protein ortholog. Preferably,
25 antibodies that bind to the UEV domain of the Tsg101 protein or the Tsg101 protein ortholog are used. Also, the compounds can be small peptides derived from a retrovirus GAG polypeptide, preferably including the amino acid residues spanning the P(T/S)AP late domain motif. In addition, antibodies selectively immunoreactive with the protein complexes can be administered. In other embodiments, the expression of Tsg101 protein
30 or a Tsg101 ortholog is inhibited. The inhibition can be at the transcriptional, translational, or post-translational level. For example, antisense compounds and

WO 02/072790

PCT/US02/08146

ribozyme compounds can be administered to cells in culture or in the subject to be treated.

The details of the various methods for modulating the protein complexes or protein-protein interactions and methods for treating virus infection are described below.

5 Although such details are described in the context of interactions between Tsg101 protein and HIV GAG or GAGp6 and HIV infection in human cells, the analogous methods with respect to infections by other viruses should be apparent to skilled artisans apprised of the present disclosure.

10 5.1. Antibody Therapy

In one embodiment, an antibody may be administered to cells or tissue *in vitro* or in a patient. The antibody administered may be immunoreactive with Tsg101 or HIV GAG or GAGp6. Suitable antibodies may be monoclonal or polyclonal that fall within any antibody classes, e.g., IgG, IgM, IgA, etc. The antibody suitable for this invention
15 may also take a form of various antibody fragments including, but not limited to, Fab and F(ab')₂, single-chain fragments (scFv) ("single-chain antibodies"), and the like. In one embodiment, an antibody selectively immunoreactive with the protein complex formed from Tsg101 and HIV GAG or GAGp6 in accordance with the present invention is administered to cells or tissue *in vitro* or in a patient. In another embodiment, an
20 antibody specific to Tsg101 is administered to cells or tissue *in vitro* or in a patient. Preferably, an antibody specific to the UEV domain of Tsg101 is administered to cells or tissue *in vitro* or in a patient. Methods for making the antibodies of the present invention should be apparent to a person of skill in the art, especially in view of the discussions in Section 3 above. The antibodies can be administered in any suitable form and route as
25 described in Section 6 below. Preferably, the antibodies are administered in a pharmaceutical composition together with a pharmaceutically acceptable carrier.

Alternatively, the antibodies may be delivered by a gene-therapy approach. That is, nucleic acids encoding the antibodies, particularly single-chain fragments (scFv), may be introduced into cells or tissue *in vitro* or in a patient such that desirable antibodies may
30 be produced by recombinant expression *in vivo* from the nucleic acids. For this purpose, the nucleic acids with appropriate transcriptional and translation regulatory sequences can

WO 02/072790

PCT/US02/08146

be directly administered into the patient. Alternatively, the nucleic acids can be incorporated into a suitable vector as described in Sections 4 and 5.5 and delivered into cells or tissue in vitro or in a patient along with the vector. The expression vector containing the nucleic acids can be administered directly to a patient. It can also be
5 introduced into cells, preferably cells derived from a patient to be treated, and subsequently delivered into the patient by cell transplantation. See Section 5.5 below.

5.2. Antisense Therapy

In another embodiment, antisense compounds specific to nucleic acids encoding
10 one or more interacting protein members of a protein complex identified in the present invention is administered to cells or tissue in vitro or in a patient to be therapeutically or prophylactically treated. The antisense compounds should specifically inhibit the expression of the one or more interacting protein members. In preferred embodiments, antisense compounds specifically hybridizing to a Tsg101 nucleic acid is administered.
15 As is known in the art, antisense drugs generally act by hybridizing to a particular target nucleic acid thus blocking gene expression. Methods for designing antisense compounds and using such compounds in treating diseases are well known and well developed in the art. For example, the antisense drug Vitravene[®] (fomivirsen), a 21-base long oligonucleotide, has been successfully developed and marketed by Isis Pharmaceuticals,
20 Inc. for treating cytomegalovirus (CMV)-induced retinitis.

Any methods for designing and making antisense compounds may be used for purpose of the present invention. See generally, Sanghvi *et al.*, eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993. Typically, antisense compounds are oligonucleotides designed based on the nucleotide sequence of the mRNA or gene of one
25 or more of the interacting protein members of a particular protein complex of the present invention. In particular, antisense compounds can be designed to specifically hybridize to a particular region of the gene sequence or mRNA of one or more of the interacting protein members to modulate (increase or decrease), replication, transcription, or translation. As used herein, the term "specifically hybridize" or paraphrases thereof
30 means a sufficient degree of complementarity or pairing between an antisense oligo and a target DNA or mRNA such that stable and specific binding occurs therebetween. In

WO 02/072790

PCT/US02/08146

particular, 100% complementary or pairing is not required. Specific hybridization takes place when sufficient hybridization occurs between the antisense compound and its intended target nucleic acids in substantially absence of non-specific binding of the antisense compound to non-target sequences under predetermined conditions, e.g., for purposes of in vivo treatment, preferably under physiological conditions. Preferably, specific hybridization results in the interference with normal expression of the target DNA or mRNA.

For example, an antisense oligo can be designed to specifically hybridize to the replication or transcription regulatory regions of a target gene, or the translation regulatory regions such as translation initiation region and exon/intron junctions, or the coding regions of a target mRNA. Preferably, Tsg101 gene or Tsg101 mRNA is used as the target.

As is generally known in the art, commonly used oligonucleotides are oligomers or polymers of ribonucleic acid or deoxyribonucleic acid having a combination of naturally-occurring nucleoside bases, sugars and covalent linkages between nucleoside bases and sugars including a phosphate group. However, it is noted that the term "oligonucleotides" also encompasses various non-naturally occurring mimetics and derivatives, i.e., modified forms, of naturally-occurring oligonucleotides as described below. Typically an antisense compound of the present invention is an oligonucleotide having from about 6 to about 200, preferably from about 8 to about 30 nucleoside bases.

The antisense compounds preferably contain modified backbones or non-natural internucleoside linkages, including but not limited to, modified phosphorous-containing backbones and non-phosphorous backbones such as morpholino backbones; siloxane, sulfide, sulfoxide, sulfone, sulfonate, sulfonamide, and sulfamate backbones; formacetyl and thioformacetyl backbones; alkene-containing backbones; methyleneimino and methylenehydrazino backbones; amide backbones, and the like.

Examples of modified phosphorous-containing backbones include, but are not limited to phosphorothioates, phosphorodithioates, chiral phosphorothioates, phosphotriesters, aminoalkylphosphotriesters, alkyl phosphonates, thionoalkylphosphonates, phosphinates, phosphoramidates, thionophosphoramidates, thionoalkylphosphotriesters, and boranophosphates and various salt forms thereof. *See*

WO 02/072790

PCT/US02/08146

e.g., U.S. Pat. Nos. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; and 5,625,050, each of which is herein incorporated by reference.

5 Examples of the non-phosphorous containing backbones described above are disclosed in, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,034,506; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,677,437; and 5,677,439, each of which is herein incorporated by reference.

10 Another useful modified oligonucleotide is peptide nucleic acid (PNA), in which the sugar-backbone of an oligonucleotide is replaced with an amide containing backbone, e.g., an aminoethylglycine backbone. See U.S. Patent Nos. 5,539,082 and 5,714,331; and Nielsen *et al.*, *Science*, 254, 1497-1500 (1991), all of which are incorporated herein by reference. PNA antisense compounds are resistant to RNase H digest and thus exhibit
15 longer half-life. In addition, various modifications may be made in PNA backbones to impart desirable drug profiles such as better stability, increased drug uptake, higher affinity to target nucleic acid, etc.

 Alternatively, the antisense compounds are oligonucleotides containing modified nucleosides, i.e., modified purine or pyrimidine bases, e.g., 5-substituted pyrimidines, 6-azapyrimidines, and N-2, N-6 and O-substituted purines, and the like. See e.g., U.S. Pat.
20 Nos. 3,687,808; 4,845,205; 5,130,302; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,681,941; and 5,750,692, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

 In addition, oligonucleotides with substituted or modified sugar moieties may also
25 be used. For example, an antisense compound may have one or more 2'-O-methoxyethyl sugar moieties. See e.g., U.S. Pat. Nos. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; and 5,700,920, each of which is herein incorporated by reference.

30 Other types of oligonucleotide modifications are also useful including linking an oligonucleotide to a lipid, phospholipid or cholesterol moiety, cholic acid, thioether,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

aliphatic chain, polyamine, polyethylene glycol (PEG), or a protein or peptide. The modified oligonucleotides may exhibit increased uptake into cells, improved stability, i.e., resistance to nuclease digestion and other biodegradations. See e.g., U.S. Patent No. 4,522,811; Burnham, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 15:210-218 (1994).

5 Antisense compounds can be synthesized using any suitable methods known in the art. In fact, antisense compounds may be custom made by commercial suppliers. Alternatively, antisense compounds may be prepared using DNA synthesizers commercially from various vendors, e.g., Applied Biosystems Group of Norwalk, CT.

10 The antisense compounds can be formulated into a pharmaceutical composition with suitable carriers and administered into cells or tissue *in vitro* or in a patient using any suitable route of administration. Alternatively, the antisense compounds may also be used in a "gene-therapy" approach. That is, the oligonucleotide is subcloned into a suitable vector and transformed into human cells. The antisense oligonucleotide is then produced *in vivo* through transcription. Methods for gene therapy are disclosed in
15 Section 6.3.2 below.

5.3. Ribozyme Therapy

In another embodiment, an enzymatic RNA or ribozyme is designed to target the nucleic acids encoding one or more of the interacting protein members of the protein
20 complex of the present invention. In preferred embodiments, Tsg101 nucleic acids are targeted. Ribozymes are RNA molecules, which have an enzymatic activity and are capable of repeatedly cleaving other separate RNA molecules in a nucleotide base sequence specific manner. See Kim *et al.*, *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA*, 84:8788 (1987); Haseloff and Gerlach, *Nature*, 334:585 (1988); and Jefferies *et al.*, *Nucleic Acid Res.*,
25 17:1371 (1989). A ribozyme typically has two portions: a catalytic portion and a binding sequence that guides the binding of ribozymes to a target RNA through complementary base-pairing. Once the ribozyme is bound to a target RNA, it enzymatically cleaves the target RNA, typically destroying its ability to direct translation of an encoded protein. After a ribozyme has cleaved its RNA target, it is released from that target RNA and
30 thereafter can bind and cleave another target. That is, a single ribozyme molecule can repeatedly bind and cleave new targets. Therefore, one advantage of ribozyme treatment

WO 02/072790

PCT/US02/08146

is that a lower amount of exogenous RNA is required as compared to conventional antisense therapies. In addition, ribozymes exhibit less affinity to mRNA targets than DNA-based antisense oligos, and therefore are less prone to bind to wrong targets.

In accordance with the present invention, a ribozyme may target any portions of
5 the mRNA of one or more interacting protein members including Tsg101 and HIV GAG. Methods for selecting a ribozyme target sequence and designing and making ribozymes are generally known in the art. See e.g., U.S. Patent Nos. 4,987,071; 5,496,698; 5,525,468; 5,631,359; 5,646,020; 5,672,511; and 6,140,491, each of which is incorporated herein by reference in its entirety. For example, suitable ribozymes may be
10 designed in various configurations such as hammerhead motifs, hairpin motifs, hepatitis delta virus motifs, group I intron motifs, or RNase P RNA motifs. See e.g., U.S. Patent Nos. 4,987,071; 5,496,698; 5,525,468; 5,631,359; 5,646,020; 5,672,511; and 6,140,491; Rossi *et al.*, *AIDS Res. Human Retroviruses* 8:183 (1992); Hampel and Tritz, *Biochemistry* 28:4929 (1989); Hampel *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 18:299 (1990); Perrotta
15 and Been, *Biochemistry* 31:16 (1992); and Guerrier-Takada *et al.*, *Cell*, 35:849 (1983).

Ribozymes can be synthesized by the same methods used for normal RNA synthesis. For example, such methods are disclosed in Usman *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845-7854 (1987) and Scaringe *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 18:5433-5441 (1990). Modified ribozymes may be synthesized by the methods disclosed in, e.g., U.S. Pat. No.
20 5,652,094; International Publication Nos. WO 91/03162; WO 92/07065 and WO 93/15187; European Patent Application No. 92110298.4; Perrault *et al.*, *Nature*, 344:565 (1990); Pieken *et al.*, *Science*, 253:314 (1991); and Usman and Cedergren, *Trends in Biochem. Sci.*, 17:334 (1992).

Ribozymes of the present invention may be administered to cells by any known
25 methods, e.g., disclosed in International Publication No. WO 94/02595. For example, they can be administered directly to cells or tissue in vitro or in a patient through any suitable route, e.g., intravenous injection. Alternatively, they may be delivered in encapsulation in liposomes, by iontophoresis, or by incorporation into other vehicles such as hydrogels, cyclodextrins, biodegradable nanocapsules, and bioadhesive microspheres.
30 In addition, they may also be delivered by gene therapy approach, using a DNA vector

WO 02/072790

PCT/US02/08146

from which the ribozyme RNA can be transcribed directly. Gene therapy methods are disclosed in detail below in Section 6.3.2.

5.4. Competitive Inhibition

5 The patient concentration and activity of a particular protein complex and the interacting protein members thereof identified in accordance with the present invention may also be inhibited by various other methods. For example, compounds identified in accordance with the methods described in Section 4 that are capable of interfering with or dissociating protein-protein interactions between the interacting protein members of a
10 protein complex may be administered to cells or tissue in vitro or in a patient. Compounds identified in *in vitro* binding assays described in Section 4 that bind to the Tsg101-containing protein complex or the interacting members thereof may also be used in the treatment.

In addition, useful agents also include incomplete proteins, i.e., fragments of the
15 interacting protein members that are capable of binding to their respective binding partners in a protein complex but are defective with respect to their cellular functions. For example, binding domains of the interacting member proteins of a protein complex may be used as competitive inhibitors of the activities of the protein complex. As will be apparent to skilled artisans, derivatives or homologues of the binding domains may also
20 be used. Binding domains can be easily identified using molecular biology techniques, e.g., mutagenesis in combination with yeast two-hybrid assays. Preferably, the protein fragment used is a fragment of an interacting protein member having a length of less than 90%, 80%, more preferably less than 75%, 65%, 50%, or less than 40% of the full length of the protein member. In one embodiment, a HIV GAGp6 protein fragment capable of
25 binding Tsg101 is administered. For example, suitable protein fragments can include a polypeptide having a contiguous span of 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20 or 25, preferably from 4 to 30, 40 or 50 amino acids or more of the sequence of HIV GAGp6 and is capable of interacting with Tsg101. Also, suitable protein fragments can also include a peptide capable of binding Tsg101 and having an amino acid sequence of
30 from 4 to 30 amino acids that is at least 75%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 95% or more identical to a contiguous span of amino acids of HIV GAG or GAGp6 of the same length.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Alternatively, a polypeptide capable of interacting with HIV GAGp6 and having a contiguous span of 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20 or 25, preferably from 4 to 30, 40 or 50 or more amino acids of the amino acid sequence of Tsg101 may be administered. Also, other examples of suitable compounds include a peptide capable of
5 binding HIV GAGp6 and having an amino acid sequence of from 4 to 30, 40, 50 or more amino acids that is at least 75%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 95% or more identical to a contiguous span of amino acids of Tsg101 amino acid sequence of the same length. In addition, the administered compounds can also be an antibody or antibody fragment, preferably single-chain antibody immunoreactive with Tsg101 or HIV GAGp6 or protein
10 complexes of the present invention.

The protein fragments suitable as competitive inhibitors can be delivered into cells by direct cell internalization, receptor mediated endocytosis, or via a "transporter." It is noted that when the target proteins or protein complexes to be modulated reside inside cells, the compound administered to cells in vitro or in vivo in the method of the
15 present invention preferably is delivered into the cells in order to achieve optimal results. Thus, preferably, the compound to be delivered is associated with a transporter capable of increasing the uptake of the compound by cells having the target protein or protein complex. As used herein, the term "transporter" refers to an entity (e.g., a compound or a composition or a physical structure formed from multiple copies of a compound or
20 multiple different compounds) that is capable of facilitating the uptake of a compound of the present invention by animal cells, particularly human cells. Typically, the cell uptake of a compound of the present invention in the presence of a "transporter" is at least 20% higher, preferably at least 40%, 50%, 75%, and more preferably at least 100% higher than the cell uptake of the compound in the absence of the "transporter."

25 Many molecules and structures known in the art can be used as "transporters." In one embodiment, a penetratin is used as a transporter. For example, the homeodomain of Antennapedia, a *Drosophila* transcription factor, can be used as a transporter to deliver a compound of the present invention. Indeed, any suitable member of the penetratin class of peptides can be used to carry a compound of the present invention into cells.
30 Penetratins are disclosed in, e.g., Derossi *et al.*, *Trends Cell Biol.*, 8:84-87 (1998), which is incorporated herein by reference. Penetratins transport molecules attached thereto

WO 02/072790

PCT/US02/08146

- across cytoplasm membranes or nucleus membranes efficiently in a receptor-independent, energy-independent, and cell type-independent manner. Methods for using a penetratin as a carrier to deliver oligonucleotides and polypeptides are also disclosed in U.S. Patent No. 6,080,724; Pooga *et al.*, *Nat. Biotech.*, 16:857 (1998); and Schutze *et al.*, *J. Immunol.*, 157:650 (1996), all of which are incorporated herein by reference. U.S. Patent No. 6,080,724 defines the minimal requirements for a penetratin peptide as a peptide of 16 amino acids with 6 to 10 of which being hydrophobic. The amino acid at position 6 counting from either the N- or C-terminal is tryptophan, while the amino acids at positions 3 and 5 counting from either the N- or C-terminal are not both valine.
- 5
10
15
20
25
30
- Preferably, the helix 3 of the homeodomain of *Drosophila* Antennapedia is used as a transporter. More preferably, a peptide having a sequence of the amino acids 43-58 of the homeodomain Antp is employed as a transporter. In addition, other naturally occurring homologs of the helix 3 of the homeodomain of *Drosophila* Antennapedia can also be used. For example, homeodomains of Fushi-tarazu and Engrailed have been shown to be capable of transporting peptides into cells. See Han *et al.*, *Mol. Cells*, 10:728-32 (2000). As used herein, the term "penetratin" also encompasses peptoid analogs of the penetratin peptides. Typically, the penetratin peptides and peptoid analogs thereof are covalently linked to a compound to be delivered into cells thus increasing the cellular uptake of the compound.
- In another embodiment, the HIV-1 tat protein or a derivative thereof is used as a "transporter" covalently linked to a compound according to the present invention. The use of HIV-1 tat protein and derivatives thereof to deliver macromolecules into cells has been known in the art. See Green and Loewenstein, *Cell*, 55:1179 (1988); Frankel and Pabo, *Cell*, 55:1189 (1988); Vives *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:16010-16017 (1997); Schwarze *et al.*, *Science*, 285:1569-1572 (1999). It is known that the sequence responsible for cellular uptake consists of the highly basic region, amino acid residues 49-57. See *e.g.*, Vives *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:16010-16017 (1997); Wender *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 97:13003-13008 (2000). The basic domain is believed to target the lipid bilayer component of cell membranes. It causes a covalently linked protein or nucleic acid to cross cell membrane rapidly in a cell type-independent manner. Proteins ranging in size from 15 to 120 kD have been delivered with this technology into

WO 02/072790

PCT/US02/08146

a variety of cell types both in vitro and in vivo. See Schwarze *et al.*, *Science*, 285:1569-1572 (1999). Any HIV tat-derived peptides or peptoid analogs thereof capable of transporting macromolecules such as peptides can be used for purposes of the present invention. For example, any native tat peptides having the highly basic region, amino acid residues 49-57 can be used as a transporter by covalently linking it to the compound to be delivered. In addition, various analogs of the tat peptide of amino acid residues 49-57 can also be useful transporters for purposes of this invention. Examples of various such analogs are disclosed in Wender *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 97:13003-13008 (2000) (which is incorporated herein by reference) including, e.g., *d*-Tat₄₉₋₅₇, retro-inverso isomers of *l*- or *d*-Tat₄₉₋₅₇ (i.e., *l*-Tat₅₇₋₄₉ and *d*-Tat₅₇₋₄₉), L-arginine oligomers, D-arginine oligomers, L-lysine oligomers, D-lysine oligomers, L-histidine oligomers, D-histidine oligomers, L-ornithine oligomers, D-ornithine oligomers, and various homologues, derivatives (e.g., modified forms with conjugates linked to the small peptides) and peptoid analogs thereof.

Other useful transporters known in the art include, but are not limited to, short peptide sequences derived from fibroblast growth factor (See Lin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:14255-14258 (1998)), Galparan (See Pooga *et al.*, *FASEB J.* 12:67-77 (1998)), and HSV-1 structural protein VP22 (See Elliott and O'Hare, *Cell*, 88:223-233 (1997)).

As the above-described various transporters are generally peptides, fusion proteins can be conveniently made by recombinant expression to contain a transporter peptide covalently linked by a peptide bond to a competitive protein fragment. Alternatively, conventional methods can be used to chemically synthesize a transporter peptide or a peptide of the present invention or both.

The hybrid peptide can be administered to cells in vitro or to a patient in a suitable pharmaceutical composition as provided in Section 5.

In addition to peptide-based transporters, various other types of transporters can also be used, including but not limited to cationic liposomes (see Rui *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 120:11213-11218 (1998)), dendrimers (Kono *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 10:1115-1121 (1999)), siderophores (Ghosh *et al.*, *Chem. Biol.*, 3:1011-1019 (1996)), etc. In a specific embodiment, the compound according to the present invention is encapsulated into liposomes for delivery into cells.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Additionally, when a compound according to the present invention is a peptide, it can be administered to cells by a gene therapy method. That is, a nucleic acid encoding the peptide can be administered to in vitro cells or to cells in vivo in a human or animal body. Any suitable gene therapy methods may be used for purposes of the present invention. Various gene therapy methods are well known in the art and are described in Section 6.3.2, below. Successes in gene therapy have been reported recently. *See e.g., Kay et al., Nature Genet., 24:257-61 (2000); Cavazzana-Calvo et al., Science, 288:669 (2000); and Blaese et al., Science, 270: 475 (1995); Kantoff, et al., J. Exp. Med., 166:219 (1987).*

10

5.5. Gene Therapy

In yet another embodiment, the gene therapy approach is taken to "knock out" the gene encoding Tsg101, or to reduce the gene expression level. For example, the gene may be replaced with a different gene sequence or a non-functional sequence or simply deleted by homologous recombination. In another gene therapy embodiment, the method disclosed in U.S. Patent No. 5,641,670, which is incorporated herein by reference, may be used to reduce the expression of the Tsg101 gene. Essentially, an exogenous DNA having at least a regulatory sequence, an exon and a splice donor site can be introduced into an endogenous gene encoding Tsg101 by homologous recombination such that the regulatory sequence, the exon and the splice donor site present in the DNA construct become operatively linked to the endogenous gene. As a result, the expression of the endogenous gene is controlled by the newly introduced exogenous regulatory sequence. Therefore, when the exogenous regulatory sequence is a strong gene expression repressor, the expression of the endogenous gene encoding the interacting protein member is reduced or blocked. *See U.S. Patent No. 5,641,670.*

25

Various gene therapy methods are well known in the art. Successes in gene therapy have been reported recently. *See e.g., Kay et al., Nature Genet., 24:257-61 (2000); Cavazzana-Calvo et al., Science, 288:669 (2000); and Blaese et al., Science, 270: 475 (1995); Kantoff, et al., J. Exp. Med. 166:219 (1987).*

30

Any suitable gene therapy methods may be used for purposes of the present invention. Generally, a gene therapy vector is used to carry the nucleic acids (exogenous

WO 02/072790

PCT/US02/08146

nucleic acids) useful in modifying the endogenous Tsg101 gene. The vector typically includes nucleic acid sequences that can direct site-specific homologous recombination. For example, an exogenous nucleic acid encoding a defective Tsg101 protein, e.g., incapable of binding HIV GAGp6, is preferably carried within the gene therapy vector.

- 5 Alternatively, the vector may contain sequences corresponding to the two ends of the endogenous Tsg101 gene which can cause homologous recombination thereby "knocking out" the endogenous Tsg101 gene.

In one embodiment, the exogenous nucleic acid (gene) is incorporated into a plasmid DNA vector. Many commercially available expression vectors may be useful for
10 the present invention, including, e.g., pCEP4, pcDNA1, pIND, pSecTag2, pVAX1, pcDNA3.1, and pBI-EGFP, and pDisplay.

Various viral vectors may also be used. Typically, in a viral vector, the viral genome is engineered to eliminate the disease-causing capability, e.g., the ability to replicate in the host cells. The exogenous nucleic acid to be introduced into a patient
15 may be incorporated into the engineered viral genome, e.g., by inserting it into a viral gene that is non-essential to the viral infectivity. Viral vectors are convenient to use as they can be easily introduced into tissue cells by way of infection. Once in the host cell, the recombinant virus typically is integrated into the genome of the host cell. In rare instances, the recombinant virus may also replicate and remain as extrachromosomal
20 elements.

A large number of retroviral vectors have been developed for gene therapy. These include vectors derived from oncoretroviruses (e.g., MLV), lentiviruses (e.g., HIV and SIV) and other retroviruses. For example, gene therapy vectors have been developed based on murine leukemia virus (*See, Cepko, et al., Cell, 37:1053-1062 (1984), Cone and*
25 *Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:6349-6353 (1984)*), mouse mammary tumor virus (*See, Salmons et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 159:1191-1198 (1984)*), gibbon ape leukemia virus (*See, Miller et al., J. Virology, 65:2220-2224 (1991)*), HIV, (*See Shimada et al., J. Clin. Invest., 88:1043-1047 (1991)*), and avian retroviruses (*See Cosset et al., J. Virology, 64:1070-1078 (1990)*). In addition, various retroviral vectors
30 are also described in U.S. Patent Nos. 6,168,916; 6,140,111; 6,096,534; 5,985,655; 5,911,983; 4,980,286; and 4,868,116, all of which are incorporated herein by reference.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Adeno-associated virus (AAV) vectors have been successfully tested in clinical trials. *See e.g., Kay et al., Nature Genet.* 24:257-61 (2000). AAV is a naturally occurring defective virus that requires other viruses such as adenoviruses or herpes viruses as helper viruses. *See Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immun.*, 158:97 (1992).

5 A recombinant AAV virus useful as a gene therapy vector is disclosed in U.S. Patent No. 6,153,436, which is incorporated herein by reference.

Adenoviral vectors can also be useful for purposes of gene therapy in accordance with the present invention. For example, U.S. Patent No. 6,001,816 discloses an adenoviral vector, which is used to deliver a leptin gene intravenously to a mammal to
10 treat obesity. Other recombinant adenoviral vectors may also be used, which include those disclosed in U.S. Patent Nos. 6,171,855; 6,140,087; 6,063,622; 6,033,908; and 5,932,210, and Rosenfeld *et al., Science*, 252:431-434 (1991); and Rosenfeld *et al., Cell*, 68:143-155 (1992).

Other useful viral vectors include recombinant hepatitis viral vectors (*See, e.g.,*
15 U.S. Patent No. 5,981,274), and recombinant entomopox vectors (*See, e.g.,* U.S. Patent Nos. 5,721,352 and 5,753,258). Non-traditional vectors may also be used for purposes of this invention. For example, International Publication No. WO 94/18834 discloses a method of delivering DNA into mammalian cells by conjugating the DNA to be delivered with a polyelectrolyte to form a complex. The complex may be microinjected into or
20 uptaken by cells.

The exogenous nucleic acids may also be introduced into cells by way of receptor-mediated endocytosis. *See e.g.,* U.S. Patent No. 6,090,619; Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 263:14621 (1988); Curiel *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8850 (1991). For
25 example, U.S. Patent No. 6,083,741 discloses introducing an exogenous nucleic acid into mammalian cells by associating the nucleic acid to a polycation moiety (e.g., poly-L-lysine having 3-100 lysine residues), which is itself coupled to an integrin receptor binding moiety (e.g., a cyclic peptide having the sequence RGD).

Alternatively, the exogenous nucleic acids or vectors containing it can also be delivered into cells via amphiphiles. *See e.g.,* U.S. Patent No. 6,071,890. Typically, the
30 exogenous nucleic acid or a vector containing the nucleic acid forms a complex with the

WO 02/072790

PCT/US02/08146

cationic amphiphile. Mammalian cells contacted with the complex can readily take the complex up.

The exogenous nucleic acids can be introduced into a patient for purposes of gene therapy by various methods known in the art. For example, the exogenous gene
5 sequences alone or in a conjugated or complex form described above, or incorporated into viral or DNA vectors, may be administered directly by injection into an appropriate tissue or organ of a patient. Alternatively, catheters or like devices may be used for delivery into a target organ or tissue. Suitable catheters are disclosed in, e.g., U.S. Patent Nos. 4,186,745; 5,397,307; 5,547,472; 5,674,192; and 6,129,705, all of which are
10 incorporated herein by reference.

In addition, the exogenous nucleic acids or vectors containing the nucleic acids can be introduced into isolated cells using any known techniques such as calcium phosphate precipitation, microinjection, lipofection, electroporation, gene gun, receptor-mediated endocytosis, and the like. Cells expressing the exogenous nucleic acids may be
15 selected and redelivered back to the patient by, e.g., injection or cell transplantation. The appropriate amount of cells delivered to a patient will vary with patient conditions, and desired effect, which can be determined by a skilled artisan. *See e.g.*, U.S. Patent Nos. 6,054,288; 6,048,524; and 6,048,729. Preferably, the cells used are autologous, i.e., cells obtained from the patient being treated.

20

6. Pharmaceutical Compositions and Formulations

In another aspect of the present invention, pharmaceutical compositions are also provided containing one or more of the therapeutic agents provided in the present invention as described in Section 6. For example, such therapeutic agents include, but
25 are not limited to, (1) small organic compounds selected based on the screening methods of the present invention capable of interfering with the interaction between Tsg101 and HIV GAG or GAGp6 or another retroviral GAG containing a P(T/S)AP late domain motif, (2) antisense compounds specifically hybridizable to Tsg101 nucleic acids (gene or mRNA), (3) ribozyme compounds specific to Tsg101 nucleic acids (gene or mRNA), (4)
30 antibodies immunoreactive with Tsg101 or HIV GAG or GAGp6 or another retroviral GAG containing a P(T/S)AP late domain motif, (5) antibodies selectively

WO 02/072790

PCT/US02/08146

immunoreactive with a protein complex of the present invention, (6) small organic compounds capable of binding a protein complex of the present invention, (7) small peptide compounds as described above (optionally linked to a transporter) capable of interacting with Tsg101 or a retroviral GAG polypeptide, (8) nucleic acids encoding the antibodies or peptides, etc. The compositions are prepared as a pharmaceutical formulation suitable for administration into a patient. Accordingly, the present invention also extends to pharmaceutical compositions, medicaments, drugs or other compositions containing one or more of the therapeutic agent in accordance with the present invention.

In the pharmaceutical composition, an active compound identified in accordance with the present invention can be in any pharmaceutically acceptable salt form. As used herein, the term "pharmaceutically acceptable salts" refers to the relatively non-toxic, organic or inorganic salts of the compounds of the present invention, including inorganic or organic acid addition salts of the compound. Examples of such salts include, but are not limited to, hydrochloride salts, sulfate salts, bisulfate salts, borate salts, nitrate salts, acetate salts, phosphate salts, hydrobromide salts, laurylsulfonate salts, glucoheptonate salts, oxalate salts, oleate salts, laurate salts, stearate salts, palmitate salts, valerate salts, benzoate salts, naththylate salts, mesylate salts, tosylate salts, citrate salts, lactate salts, maleate salts, succinate salts, tartrate salts, fumarate salts, and the like. See, e.g., Berge, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66:1-19 (1977).

For oral delivery, the active compounds can be incorporated into a formulation that includes pharmaceutically acceptable carriers such as binders (e.g., gelatin, cellulose, gum tragacanth), excipients (e.g., starch, lactose), lubricants (e.g., magnesium stearate, silicon dioxide), disintegrating agents (e.g., alginate, Primogel, and corn starch), and sweetening or flavoring agents (e.g., glucose, sucrose, saccharin, methyl salicylate, and peppermint). The formulation can be orally delivered in the form of enclosed gelatin capsules or compressed tablets. Capsules and tablets can be prepared in any conventional techniques. The capsules and tablets can also be coated with various coatings known in the art to modify the flavors, tastes, colors, and shapes of the capsules and tablets. In addition, liquid carriers such as fatty oil can also be included in capsules.

Suitable oral formulations can also be in the form of suspension, syrup, chewing gum, wafer, elixir, and the like. If desired, conventional agents for modifying flavors,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

tastes, colors, and shapes of the special forms can also be included. In addition, for convenient administration by enteral feeding tube in patients unable to swallow, the active compounds can be dissolved in an acceptable lipophilic vegetable oil vehicle such as olive oil, corn oil and safflower oil.

- 5 The active compounds can also be administered parenterally in the form of solution or suspension, or in lyophilized form capable of conversion into a solution or suspension form before use. In such formulations, diluents or pharmaceutically acceptable carriers such as sterile water and physiological saline buffer can be used. Other conventional solvents, pH buffers, stabilizers, anti-bacteria agents, surfactants, and
- 10 antioxidants can all be included. For example, useful components include sodium chloride, acetates, citrates or phosphates buffers, glycerin, dextrose, fixed oils, methyl parabens, polyethylene glycol, propylene glycol, sodium bisulfate, benzyl alcohol, ascorbic acid, and the like. The parenteral formulations can be stored in any conventional containers such as vials and ampoules.
- 15 Routes of topical administration include nasal, bucal, mucosal, rectal, or vaginal applications. For topical administration, the active compounds can be formulated into lotions, creams, ointments, gels, powders, pastes, sprays, suspensions, drops and aerosols. Thus, one or more thickening agents, humectants, and stabilizing agents can be included in the formulations. Examples of such agents include, but are not limited to,
- 20 polyethylene glycol, sorbitol, xanthan gum, petrolatum, beeswax, or mineral oil, lanolin, squalene, and the like. A special form of topical administration is delivery by a transdermal patch. Methods for preparing transdermal patches are disclosed, e.g., in Brown, *et al.*, *Annual Review of Medicine*, 39:221-229 (1988), which is incorporated herein by reference.
- 25 Subcutaneous implantation for sustained release of the active compounds may also be a suitable route of administration. This entails surgical procedures for implanting an active compound in any suitable formulation into a subcutaneous space, e.g., beneath the anterior abdominal wall. *See, e.g.*, Wilson *et al.*, *J. Clin. Psych.* 45:242-247 (1984). Hydrogels can be used as a carrier for the sustained release of the active compounds.
- 30 Hydrogels are generally known in the art. They are typically made by crosslinking high molecular weight biocompatible polymers into a network, which swells in water to form

WO 02/072790

PCT/US02/08146

a gel like material. Preferably, hydrogels is biodegradable or biosorbable. For purposes of this invention, hydrogels made of polyethylene glycols, collagen, or poly(glycolic-co-L-lactic acid) may be useful. *See, e.g., Phillips et al., J. Pharmaceut. Sci.* 73:1718-1720 (1984).

5 The active compounds can also be conjugated, to a water soluble non-immunogenic non-peptidic high molecular weight polymer to form a polymer conjugate. For example, an active compound is covalently linked to polyethylene glycol to form a conjugate. Typically, such a conjugate exhibits improved solubility, stability, and reduced toxicity and immunogenicity. Thus, when administered to a patient, the active
10 compound in the conjugate can have a longer half-life in the body, and exhibit better efficacy. *See generally, Burnham, Am. J. Hosp. Pharm.*, 15:210-218 (1994). PEGylated proteins are currently being used in protein replacement therapies and for other therapeutic uses. For example, PEGylated interferon (PEG-INTRON A[®]) is clinically used for treating Hepatitis B. PEGylated adenosine deaminase (ADAGEN[®]) is being
15 used to treat severe combined immunodeficiency disease (SCIDS). PEGylated L-asparaginase (ONCAPSPAR[®]) is being used to treat acute lymphoblastic leukemia (ALL). It is preferred that the covalent linkage between the polymer and the active compound and/or the polymer itself is hydrolytically degradable under physiological conditions. Such conjugates known as "prodrugs" can readily release the active
20 compound inside the body. Controlled release of an active compound can also be achieved by incorporating the active ingredient into microcapsules, nanocapsules, or hydrogels generally known in the art.

Liposomes can also be used as carriers for the active compounds of the present invention. Liposomes are micelles made of various lipids such as cholesterol,
25 phospholipids, fatty acids, and derivatives thereof. Various modified lipids can also be used. Liposomes can reduce the toxicity of the active compounds, and increase their stability. Methods for preparing liposomal suspensions containing active ingredients therein are generally known in the art. *See, e.g., U.S. Patent No. 4,522,811; Prescott, Ed., Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976).

30 The active compounds can also be administered in combination with another active agent that synergistically treats or prevents the same symptoms or is effective for

WO 02/072790

PCT/US02/08146

another disease or symptom in the patient treated so long as the other active agent does not interfere with or adversely affect the effects of the active compounds of this invention. Such other active agents include but are not limited to anti-inflammation agents, antiviral agents, antibiotics, antifungal agents, antithrombotic agents, 5 cardiovascular drugs, cholesterol lowering agents, anti-cancer drugs, hypertension drugs, and the like.

Generally, the toxicity profile and therapeutic efficacy of the therapeutic agents can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell models or animal models, e.g., those provided in Section 7. As is known in the art, the LD₅₀ represents the 10 dose lethal to about 50% of a tested population. The ED₅₀ is a parameter indicating the dose therapeutically effective in about 50% of a tested population. Both LD₅₀ and ED₅₀ can be determined in cell models and animal models. In addition, the IC₅₀ may also be obtained in cell models and animal models, which stands for the circulating plasma 15 concentration that is effective in achieving about 50% of the maximal inhibition of the symptoms of a disease or disorder. Such data may be used in designing a dosage range for clinical trials in humans. Typically, as will be apparent to skilled artisans, the dosage range for human use should be designed such that the range centers around the ED₅₀ and/or IC₅₀, but significantly below the LD₅₀ obtained from cell or animal models. It will be apparent to skilled artisans that therapeutically effective amount for each active 20 compound to be included in a pharmaceutical composition of the present invention can vary with factors including but not limited to the activity of the compound used, stability of the active compound in the patient's body, the severity of the conditions to be alleviated, the total weight of the patient treated, the route of administration, the ease of absorption, distribution, and excretion of the active compound by the body, the age and 25 sensitivity of the patient to be treated, and the like. The amount of administration can also be adjusted as the various factors change over time.

EXAMPLES

1. Yeast Two-Hybrid System

30 The principles and methods of the yeast two-hybrid system have been described in detail in *The Yeast Two-Hybrid System*, Bartel and Fields, eds., pages 183-196, Oxford

WO 02/072790

PCT/US02/08146

University Press, New York, NY, 1997. The following is thus a description of the particular procedure that we used.

The cDNA encoding the bait protein HIV GAGp6 was derived from HIV-1 NYS/BRU isolate. The cDNA product was then introduced by recombination into the yeast expression vector pGBT.Q, which is a close derivative of pGBT.C (See Bartel *et al.*, *Nat Genet.*, 12:72-77 (1996)) in which the polylinker site has been modified to include M13 sequencing sites. The new construct was selected directly in the yeast strain PNY200 for its ability to drive tryptophane synthesis (genotype of this strain: *MAT α trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 ade2 gal4A gal80*). In these yeast cells, the bait was produced as a C-terminal fusion protein with the DNA binding domain of the transcription factor Gal4 (amino acids 1 to 147).

Prey libraries (e.g., a human spleen cDNA library) were transformed into the yeast strain BK100 (genotype of this strain: *MAT α trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4A gal80 LYS2::GAL-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*), and selected for the ability to drive leucine synthesis. In these yeast cells, each cDNA was expressed as a fusion protein with the transcription activation domain of the transcription factor Gal4 (amino acids 768 to 881) and a 9 amino acid hemagglutinin epitope tag. PNY200 cells (*MAT α* mating type), expressing the bait, were then mated with BK100 cells (*MAT α* mating type), expressing prey proteins from the prey library. The resulting diploid yeast cells expressing proteins interacting with the bait protein were selected for the ability to synthesize tryptophan, leucine, histidine, and adenine. DNA was prepared from each clone, transformed by electroporation into *E. coli* strain KC8 (Clontech KC8 electrocompetent cells, Catalog No. C2023-1), and the cells were selected on ampicillin-containing plates in the absence of either tryptophan (selection for the bait plasmid) or leucine (selection for the library plasmid). DNA for both plasmids was prepared and sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method. The identity of the bait cDNA insert was confirmed and the cDNA insert from the prey library plasmid was identified using the BLAST program to search against public nucleotide and protein databases. Plasmids from the prey library were then individually transformed into yeast cells together with a plasmid driving the synthesis of lamin and 5 other test proteins, respectively, fused to the Gal4 DNA binding domain. Clones that gave a positive signal

WO 02/072790

PCT/US02/08146

in the β -galactosidase assay were considered false-positives and discarded. Plasmids for the remaining clones were transformed into yeast cells together with the original bait plasmid. Clones that gave a positive signal in the β -galactosidase assay were considered true positives.

- 5 HIV GAGp6 sequence indicated in Table 1 was used in the yeast two-hybrid system described above. The isolated Tsg101 prey sequences are summarized in Table 1. The GenBank Accession Nos. for the bait and prey proteins are also provided in Table 1, upon which the bait and prey sequences are aligned.

2. Production of Antibodies Selectively Immunoreactive with Protein Complex

- 10 HIV GAGp6 and the UEV domain of Tsg101 are recombinantly expressed in human host cells and isolated and purified. A protein complex is formed by mixing the two purified interacting proteins (fragments). A protein complex is also formed by mixing recombinantly expressed intact complete Tsg101 and HIV GAGp6. The two protein complexes are used as antigens in immunizing a mouse. mRNA is isolated from
15 the immunized mouse spleen cells, and first-strand cDNA is synthesized based on the mRNA. The V_H and V_K genes are amplified from the thus synthesized cDNAs by PCR using appropriate primers.

- The amplified V_H and V_K genes are ligated together and subcloned into a phagemid vector for the construction of a phage display library. *E. coli* cells are
20 transformed with the ligation mixtures, and thus a phage display library is established. Alternatively, the ligated V_H and V_K genes are subcloned into a vector suitable for ribosome display in which the V_H - V_K sequence is under the control of a T7 promoter. See Schaffitzel *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 231:119-135 (1999).

- The libraries are screened with the Tsg101-HIV GAGp6 complex and individual
25 Tsg101 and HIV GAGp6. Several rounds of screening are preferably performed. Clones corresponding to scFv fragments that bind the Tsg101-HIV GAGp6 complex, but not the individual Tsg101 and HIV GAGp6 are selected and purified. A single purified clone is used to prepare an antibody selectively immunoreactive with the Tsg101-HIV GAGp6 complex. The antibody is then verified by an immunochemistry method such as RIA and
30 ELISA.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

In addition, the clones corresponding to scFv fragments that bind the Tsg101-HIV GAGp6 complex and also binds Tsg101 and/or HIV GAGp6 may be selected. The scFv genes in the clones are diversified by mutagenesis methods such as oligonucleotide-directed mutagenesis, error-prone PCR (See Lin-Goerke *et al.*, *Biotechniques*, 23:409 (1997)), dNTP analogues (See Zaccolo *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 255:589 (1996)), and other methods. The diversified clones are further screened in phage display or ribosome display libraries. In this manner, scFv fragments selectively immunoreactive with the Tsg101-HIV GAGp6 complex may be obtained.

10 3. Correlations between Tsg101-HIV GAGp6 Interaction and HIV Budding

Yeast two-hybrid assays were utilized to determine the effect of amino acid substitution mutations in the PTAP motif of HIV GAGp6 on the interaction between Tsg101 and GAGp6. To prepare a yeast two-hybrid activation domain-Tsg101 construct, a DNA fragment encompassing the full-length coding sequence for Tsg101 according to GenBank Accession No. U82130 was obtained by PCR from a human fetal brain cDNA library and cloned into the EcoRI/Pst1 sites of the activation domain parent plasmid GADpN2 (LEU2, CEN4, ARS1, ADH1p-SV40NLS-GAL4 (768-881)-MCS (multiple cloning site)-PGK1t, AmpR, ColE1_ori).

To prepare the yeast two-hybrid DNA binding domain-HIV1 GAGp6 construct, a DNA fragment corresponding to the HIV1 GAGp6 peptide derived from the HIV1.NL43 strain GAG protein was obtained by PCR from the NL43 containing plasmid R9Δapa and was cloned into the EcoRI/Sal1 sites of the binding domain parent plasmid pGBT.Q.

The following amino acid substitution mutations were introduced by PCR into the HIV1 GAGp6 sequence in the yeast two-hybrid binding domain-HIV1 GAGp6 construct described above. The mutations were verified by DNA sequence analysis. Such mutations are summarized in Table 2 below.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Table 2. Tested Mutations in GAGp6 Protein

Mutant Construct	GAGp6 Peptide Sequence Surrounding the PTAP Motif														
	S	R	P	E	P	T	A	P	P	E	E	S	F	R	F
P6/wt															
P6/E6G				G											
P6/P7L					L										
P6/A9R							R								
P6/P10L								L							

- To test the effect of the mutations, yeast cells of the strain Y189 purchased from Clontech (ura3-52 his3*200 ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 met gal4 gal80 URA3::GAL1p-lacZ) were co-transformed with the activation domain-Tsg101 construct and one of the binding domain-mutant GAGp6 constructs or the binding domain-wild type GAGp6 construct. Filter lift assays for β -Gal activity were conducted by lifting the transformed yeast colonies with filters, lysing the yeast cells by freezing and thawing, and contacting the lysed cells with X-Gal. Positive β -Gal activity indicates that the GAGp6 wild type or mutant protein interacts with Tsg101. All binding domain constructs were also tested for self-activation of β -Gal activity. The results are shown in Table 3.

15

Table 3. Interactions Between Tsg101 and GAGp6

	P6/wt	P6/E6G	P6/P7L	P6/A9R	P6/P10L
Tsg101	+	+	-	-	-
P6/wt	-				
P6/E6G		-			
P6/P7L			-		
P6/A9R				-	
P6/P10L					-

WO 02/072790

PCT/US02/08146

Thus, as is clear from Table 3, the mutations in the PTAP motif of HIV GAGp6 abolished the interaction between Tsg101 and HIV GAGp6, while the p6/E6G mutation outside the PTAP motif did not result in the elimination of the Tsg101-GAGp6 interaction.

The interactions between Tsg101 and wild-type GAGp6 (WT) or the GAGp6 PTAP mutants were further quantitated by performing liquid culture β -galactosidase assays. Cultures were grown overnight in synthetic media (-Leu, -Trp, + glucose) in 96 well plates, normalized for optical density, and lysed by addition of 6X lysis/substrate solution in 6X Z-buffer (60mM KCl, 6mM MgSO₄, 360mM Na₂HPO₄, 240 mM NaH₂PO₄, 6mg/ml CPRG, 0.12U/ml lyticase, 0.075% NP-40). Cultures were incubated for 2 hr at 37°C, clarified by centrifugation, and the optical absorbance of each supernatant was measured (575 nm). Full length Tsg101 bound wild-type p6 in the two-hybrid liquid culture assay, resulting in high levels of β -galactosidase activity (>300-fold over background). Three different p6 point mutants were used to test whether the Tsg101 binding interaction required the PTAP late domain motif within HIV-1 p6, and all three (P6L, A9R and P10L) reduced β -galactosidase activity to background levels. Each of these point mutations also arrests HIV-1 budding at a late stage (Huang et al. 1995). These results are consistent with the hypothesis that the interaction between HIV GAGp6 and the human cellular protein Tsg101 is essential for viral budding to occur.

5 4. *In Vitro* Binding Assays

A fusion protein with a GST tag fused to the HIV-1 GAGp6 domain was recombinantly expressed and purified by chromatography. In addition, a GAGp6 peptide containing the first 14 amino acid residues ("p6(1-14)") was synthesized chemically by standard peptide synthesis methods. The peptide was purified by conventional protein purification techniques, e.g., by chromatography.

Nunc/Nalgene Maxisorp plates were incubated overnight at 4°C or for 1-2 hrs at room temperature in 100 μ l of a protein coupling solution containing purified GST-p6 and 50mM Carbonate, pH=9.6. This allowed the attachment of the GST-p6 fusion protein to the plates. Liquids in the plates were then emptied and wells filled with 400 μ l/well of a blocking buffer (SuperBlock; Pierce-Endogen, Rockford, IL). After

WO 02/072790

PCT/US02/08146

incubating for 1 hour at room temperature, 100 μ l of a mixture containing *Drosophila* S2 cell lysate myc-tagged Tsg101 (residues 1-207) and a specific amount of the p6(1-14) peptide were applied to the wells of the plate. This mixture was allowed to react for 2 hours at room temperature to form p6:Tsg101 protein-protein complexes.

- 5 Plates were then washed 4 x 100 μ l with 1 x PBST solution (Invitrogen; Carlsbad, CA). After washing, 100 μ l of 1 μ g/ml solution of anti-myc monoclonal antibody (Clone 9E10; Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN) in 1 x PBST was added to the wells of the plate to detect the myc-epitope tag on the Tsg101 protein. Plates were then washed again with 4 x 100 μ l with 1 x PBST solution and 100 μ l of 1 μ g/ml solution of horseradish
- 10 peroxidase (HRP) conjugated Goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Labs; West Grove, Pennsylvania) in 1 x PBST was added to the wells of the plate to detect bound mouse anti-myc antibodies. Plates were then washed again with 4 x 100 μ l with 1 x PBST solution and 100 μ l of fluorescent substrate (QuantaBlu; Pierce-Endogen, Rockford, IL) was added to all wells. After 30 minutes, 100 μ l of stop solution was
- 15 added to each well to inhibit the function of HRP. Plates were then read on a Packard Fusion instrument at an excitation wavelength of 325nm and an emission wavelength of 420nm. The presence of fluorescent signals indicates binding of Tsg101 to the fixed GST-p6. In contrast, the absence of fluorescent signals indicates that the PX₁X₂P-containing short peptide is capable of disrupting the interaction between Tsg101 and HIV
- 20 p6.

Different concentrations of the p6(1-14) peptide were tested, and the relative intensities of the fluorescence signals obtained at different concentrations were plotted against the peptide concentrations. The competitive inhibition curve is shown in Figure 2. Two Dixon plots are shown in Figure 3 and Figure 4, respectively.

25

5. Yeast Screen To Identify Small Molecule Inhibitors Of The Interaction Between HIV GAGp6 And Tsg101

Beta-galactosidase is used as a reporter enzyme to signal the interaction between yeast two-hybrid protein pairs expressed from plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*.

30

Yeast strain MY209 (*ade2 his3 leu2 trp1 cyh2 ura3::GAL1p-lacZ gal4 gal80 lys2::GAL1p-HIS3*) bearing the plasmids Mp364 (*LEU2 CEN4 ARS1 ADHIp-SV40NLS-*

WO 02/072790

PCT/US02/08146

GALA (768-881)-*Tsg101* (1-390)-*PGK1t AmpR ColE1_ori*) and Mp206 (*TRP1 CEN4 ARS ADHIp-GALA*(1-147)-*HIV1_gag* (448-500)-*ADHIt AmpR ColE1_ori*) is cultured in synthetic complete media lacking leucine and tryptophan (SC -Leu -Trp) overnight at 30°C. This culture is diluted to 0.01 OD₆₃₀ units/ml using SC -Leu -Trp media. The diluted MY209 culture is dispensed into 96-well microplates. Compounds from a library of small molecules are added to the microplates; the final concentration of test compounds is approximately 60µM. The assay plates are incubated at 30°C overnight. The following day an aliquot of concentrated substrate/lysis buffer is added to each well and the plates incubated at 37°C for 1-2 hours. At an appropriate time an aliquot of stop solution is added to each well to halt the beta-galactosidase reaction. For all microplates an absorbance reading is obtained to assay the generation of product from the enzyme substrate. The presence of putative inhibitors of the interaction between HIV p6 and Tsg101 results in inhibition of the beta-galactosidase signal generated by MY209. Additional testing eliminates compounds that decreased expression of beta-galactosidase by affecting yeast cell growth and non-specific inhibitors that affected the beta-galactosidase signal generated by the interaction of an unrelated protein pair.

Once a hit, i.e., a compound which inhibits the interaction between the viral and cellular proteins, is obtained, the compound is identified and subjected to further testing wherein the compounds are assayed at several concentrations to determine an IC₅₀ value, this being the concentration of the compound at which the signal seen in the two-hybrid assay described in this Example is 50% of the signal seen in the absence of the inhibitor.

All publications and patent applications mentioned in the specification are indicative of the level of those skilled in the art to which this invention pertains. All publications and patent applications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be obvious that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated protein complex comprising a first protein which is Tsg101 or a homologue or derivative or fragment thereof interacting with a second protein which is a retrovirus GAG polypeptide containing the P(T/S)AP late domain motif or a homologue
5 or derivative or fragment of said retrovirus GAG polypeptide.

2. The isolated protein complex according to Claim 1, wherein said first protein is selected from the group consisting of
 - (i) Tsg101 protein,
 - 10 (ii) a Tsg101 protein homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of Tsg101 and capable of interacting with HIV GAGp6,
 - (iii) a Tsg101 protein fragment containing the Tsg101 UEV domain, and
 - (iv) a fusion protein containing said Tsg101 protein, said Tsg101 protein homologue or said Tsg101 protein fragment.

3. The isolated protein complex according to Claim 1 or 2, wherein said second protein is selected from the group consisting of
 - (1) a retrovirus GAG polypeptide having the P(T/S)AP late domain motif,
 - 20 (2) a homologue of said retrovirus GAG polypeptide, said homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of said retrovirus GAG polypeptide and capable of interacting with Tsg101,
 - (3) a fragment of said retrovirus GAG polypeptide, said fragment being capable of interacting with Tsg101, and
 - 25 (4) a fusion protein containing said retrovirus GAG polypeptide, said retrovirus GAG polypeptide homologue or said retrovirus GAG polypeptide fragment.

4. The isolated protein complex of Claim 1, 2 or 3, wherein said retrovirus is
30 a lentivirus.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

5. The isolated protein complex of Claim 4, wherein said lentivirus is a primate lentivirus.
6. The isolated protein complex of Claim 5, wherein said primate lentivirus is selected from the group consisting of HIV-1, HIV-2, HIV-3, and simian immunodeficiency viruses.
7. The isolated protein complex of Claim 4, wherein said lentivirus is a non-primate lentivirus selected from the group consisting of bovine lentiviruses, feline lentiviruses, and ovine/caprine lentiviruses.
8. The isolated protein complex according to any of Claims 1-6, wherein said second protein is an HIV GAG polypeptide or a homologue or derivative or fragment thereof.
9. The isolated protein complex according to any of Claims 1-6 and 8, wherein said second protein is a fusion protein containing (a) an HIV GAG polypeptide or (b) an HIV GAG polypeptide fragment.
10. The isolated protein complex according to any of Claims 1-6, 8 and 9, wherein said second protein is HIV GAGp6 or a homologue or derivative or fragment thereof.
11. The isolated protein complex according to any of Claims 1-6, 8, 9 and 10, wherein said second protein is a fusion protein containing (a) an HIV GAGp6 polypeptide or (b) an HIV GAGp6 fragment.
12. The isolated protein complex according to Claim 10 or 11, wherein said HIV GAGp6 fragment contains an amino acid sequence of SEQ ID NO:31 or SEQ ID NO:32.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

13. The isolated protein complex of Claim 10 or 11, wherein said HIV GAGp6 fragment has a contiguous span of at least 10 amino acid residues of a naturally occurring HIV GAGp6, said contiguous span containing a P(T/S)AP late domain motif.
- 5 14. A method for making the protein complex according to any one of Claims 1-13, comprising the steps of:
providing said first protein and said second protein; and
contacting said first protein with said second protein.
- 10 15. A protein microarray comprising the protein complex according to any one of Claims 1-13.
16. A fusion protein having a first polypeptide covalently linked to a second polypeptide, wherein said first polypeptide is Tsg101 or a homologue or fragment
15 thereof, and wherein said second polypeptide is HIV GAG or a homologue or fragment thereof.
17. An isolated nucleic acid encoding the fusion protein of Claim 16.
- 20 18. A method for selecting modulators of a protein complex according any one of Claims 1-13, comprising:
providing the protein complex;
contacting said protein complex with a test compound; and
determining the presence or absence of binding of said test compound to said
25 protein complex.
19. A method for selecting modulators of a protein complex according any one of Claims 1-13, said method comprising:
contacting said first protein with said second protein in the presence of one or
30 more test compounds; and
detecting interaction between said first protein and said second protein.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

20. A method for selecting modulators of a protein complex according any one of Claims 1-13, said method comprising:
contacting said protein complex with a test compound; and
5 detecting interaction between said first protein and said second protein.
21. The method of Claim 18, 19 or 20, wherein at least one of said first and second proteins is a fusion protein having a detectable tag.
- 10 22. The method according to any one of Claims 18-20, wherein said contacting step is conducted in a substantially cell free environment.
23. The method of according to any one of Claims 18-20, wherein said contacting step is conducted in a host cell.
15
24. The method of Claim 22, wherein said host cell is a yeast cell.
25. A method for selecting modulators of the interaction between the first and second proteins of the protein complex of any one of Claims 1-13, comprising:
20 providing in a host cell a first fusion protein having said first protein, and a second fusion protein having said second protein, wherein a DNA binding domain is fused to one of said first and second proteins while a transcription-activating domain is fused to the other of said first and second proteins;
providing in said host cell a reporter gene, wherein the transcription of the
25 reporter gene is determined by the interaction between the first protein and the second protein;
allowing said first and second fusion proteins to interact with each other within said host cell in the presence of a test compound; and
determining the presence or absence of expression of said reporter gene.
30
26. The method of Claim 25, wherein said host cell is a yeast cell.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

27. A composition comprising:
(a) a first expression vector having a nucleic acid encoding the first protein according to any one of Claims 1-13; and
5 (b) a second expression vector having a nucleic acid encoding the second protein according to any one of Claims 1-13.
28. A host cell comprising the first and second expression vectors of Claim 27.
10
29. A host cell comprising:
a first expression cassette having a first promoter operably linked to a first nucleic acid encoding the first protein according to any one of Claims 1-13; and
15 a second expression cassette having a second promoter operably linked to a second nucleic acid encoding the second protein according to any one of Claims 1-13.
30. The host cell of Claim 28 or 29, wherein said host cell is a yeast cell.
31. The host cell of Claim 28, 29 or 30, wherein one of said first and second nucleic acids is linked to a nucleic acid encoding a DNA binding domain, and the other of said first and second nucleic acids is linked to a nucleic acid encoding a transcription-activation domain, whereby two fusion proteins can be produced in said host cell.
20
32. The host cell of Claim 31, further comprising a reporter gene, wherein the expression of the reporter gene is determined by the interaction between the first protein and the second protein.
25
33. A method for providing a compound capable of interfering with an interaction between the first and second proteins in the protein complex according to any
30 one of Claims 1-13, comprising:

WO 02/072790

PCT/US02/08146

providing atomic coordinates defining a three-dimensional structure of said protein complex; and

designing or selecting compounds capable of interfering with the interaction between said first protein and said second protein based on said atomic coordinates.

5

34. A method for selecting a compound capable of inhibiting a protein-protein interaction between Tsg101 and HIV GAGp6, comprising:

contacting a test compound with a protein selected from group consisting of

(i) Tsg101 protein,

10

(ii) a Tsg101 protein homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of Tsg101 and capable of interacting with HIV GAGp6,

(iii) a Tsg101 protein fragment containing the Tsg101 UEV domain, and

(iv) a fusion protein containing said Tsg101 protein, said Tsg101 protein homologue or said Tsg101 protein fragment; and

15

determining whether said test compound is capable of binding said protein.

35. The method of Claim 34, further comprising testing a test compound capable of binding said protein for its ability to interfere with a protein-protein interaction between Tsg101 and HIV GAGp6.

20

36. The method of Claim 34 or 35, further comprising testing a test compound capable of binding said protein for its ability to inhibit HIV viral budding from an HIV-infected host cell.

25

37. A method for selecting a compound capable of inhibiting a protein-protein interaction between Tsg101 and HIV GAGp6, comprising:

providing atomic coordinates defining a three-dimensional structure of a protein selected from group consisting of

(i) Tsg101 protein,

30

(ii) a Tsg101 protein homologue having an amino acid sequence at least 90% identical to that of Tsg101 and capable of interacting with HIV GAGp6,

WO 02/072790

PCT/US02/08146

- (iii) a Tsg101 protein fragment containing the Tsg101 UEV domain, and
(iv) a fusion protein containing said Tsg101 protein, said Tsg101 protein
homologue or said Tsg101 protein fragment; and
designing or selecting compounds capable of interacting with said protein based
5 on said atomic coordinates.
38. The method of Claim 37, further comprising testing a compound capable
of interacting with said protein for its ability to interfere with a protein-protein interaction
between Tsg101 and HIV GAGp6.
10
39. The method of Claim 37 or 38, further comprising testing a test compound
capable of interacting with said protein for its ability to inhibit HIV viral budding from an
HIV-infected host cell.
- 15 40. An isolated antibody selectively immunoreactive with a protein complex
according to any of Claims 1-13.
41. A method for modulating, in a cell, a protein complex having a first
protein which is Tsg101 interacting with a second protein which is HIV GAG, said
20 method comprising:
reducing the concentration of said protein complex in the cell.
42. The method of Claim 41, wherein said reducing step comprising
interfering with an interaction between said first protein and said second protein.
25
43. The method of Claim 42, wherein said reducing step comprises
administering to the cell a compound capable of interfering with an interaction between
said first protein and said second protein.
- 30 44. The method of Claim 43, wherein said compound is capable of binding
Tsg101.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

45. The method of Claim 43, wherein said compound is capable of binding the UEV domain of Tsg101 protein.

5 46. The method of Claim 43, wherein said compound is an antibody immunoreactive with Tsg101.

47. The method of Claim 43, wherein said compound is a nucleic acid encoding an antibody immunoreactive with Tsg101.

10 48. The method of Claim 47, wherein said antibody is a single-chain antibody.

49. The method of Claim 43, wherein said compound is an antibody selectively immunoreactive with said protein complex.

15 50. The method of Claim 49, wherein said compound is a nucleic acid encoding an antibody selectively immunoreactive with said protein complex.

51. The method of Claim 50, wherein said antibody is a single chain antibody.

20 52. The method of Claim 41, wherein said reducing step comprises reducing the concentration of Tsg101 in the cell.

25 53. The method of Claim 52, wherein said step of reducing the concentration of Tsg101 in the cell comprises administering to the cell an antisense compound specifically hybridizing to a Tsg101 nucleic acid.

30 54. The method of Claim 52, wherein said step of reducing the concentration of Tsg101 in the cell comprises administering to the cell a ribozyme compound specifically hybridizing to a Tsg101 nucleic acid.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

55. A method for inhibiting HIV viral budding from a host cell, comprising:
interfering with an interaction between Tsg101 and HIV GAG in the host cell.

56. The method of Claim 55, wherein said interfering step comprises
5 administering to the host cell a compound capable of interfering with the interaction
between Tsg101 and HIV GAG.

57. The method of Claim 55, wherein said interfering step comprises
10 administering to the host cell a compound capable of binding Tsg101 protein.

58. The method of Claim 57, wherein said compound is an antibody
immunoreactive with Tsg101.

59. The method of Claim 57, wherein said compound is an antibody
15 immunoreactive with Tsg101, said antibody be capable of binding the UEV domain of
Tsg101.

60. A method for inhibiting HIV viral budding from a host cell, comprising:
administering to the host cell an antibody selectively immunoreactive with a
20 protein complex comprising Tsg101 interacting with HIV GAGp6.

61. A method for inhibiting HIV viral budding from a host cell, comprising:
administering to the host cell a nucleic acid encoding an antibody immunoreactive
with Tsg101.
25

62. The method of Claim 61, wherein said antibody is a single chain antibody.

63. A method for inhibiting HIV viral budding from a host cell, comprising:
administering to the host cell a nucleic acid encoding an antibody selectively
30 immunoreactive with a protein complex comprising Tsg101 interacting with HIV
GAGp6.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

64. The method of Claim 63, wherein said antibody is a single chain antibody.
65. Use of an antisense compound specifically hybridizing to a Tsg101
5 nucleic acid in inhibiting HIV budding, treating HIV infection or preventing AIDS.
66. Use of a ribozyme compound specifically hybridizing to a Tsg101 nucleic acid in inhibiting HIV budding, treating HIV infection or preventing AIDS.
- 10 67. Use of a compound capable of binding Tsg101 protein in inhibiting HIV budding, treating HIV infection or preventing AIDS.
68. Use of an antibody immunoreactive with Tsg101 in inhibiting HIV
budding, treating HIV infection or preventing AIDS.
15
69. Use of an antibody capable of binding the UEV domain of Tsg101 in inhibiting HIV budding, treating HIV infection or preventing AIDS.
70. Use of a compound capable of interfering with the interaction between
20 Tsg101 and HIV GAG in inhibiting HIV budding, treating HIV infection or preventing AIDS.
71. Use of an antibody selectively immunoreactive with a protein complex comprising Tsg101 interacting with HIV GAG in inhibiting HIV budding, treating HIV
25 infection or preventing AIDS.
72. Use of a nucleic acid encoding an antibody immunoreactive with Tsg101 in inhibiting HIV budding, treating HIV infection or preventing AIDS.

WO 02/072790

PCT/US02/08146

73. Use of a nucleic acid encoding an antibody selectively immunoreactive with a protein complex comprising Tsg101 interacting with HIV GAG in inhibiting HIV budding, treating HIV infection or preventing AIDS.

5

WO 02/072790

PCT/US02/08146

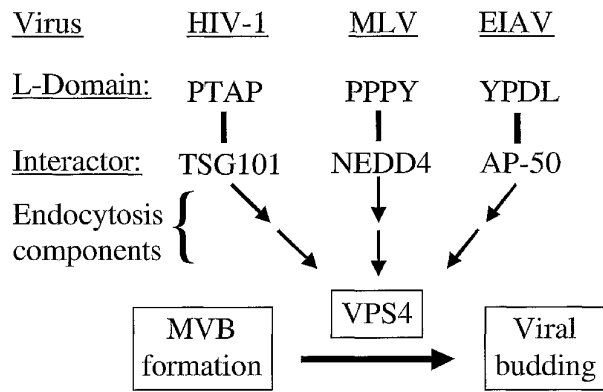


Figure 1

WO 02/072790

PCT/US02/08146

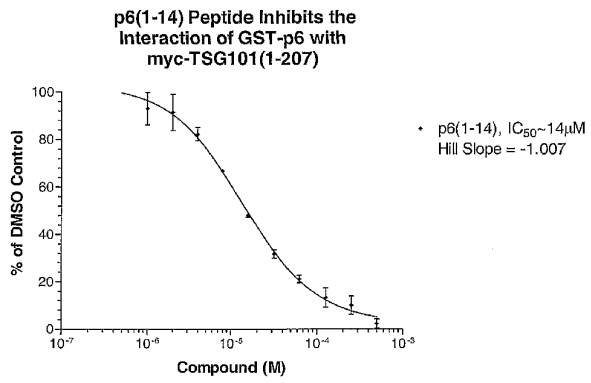


Figure 2

Dixon plot of p6(1-14) on p6/TSG101(1-207)

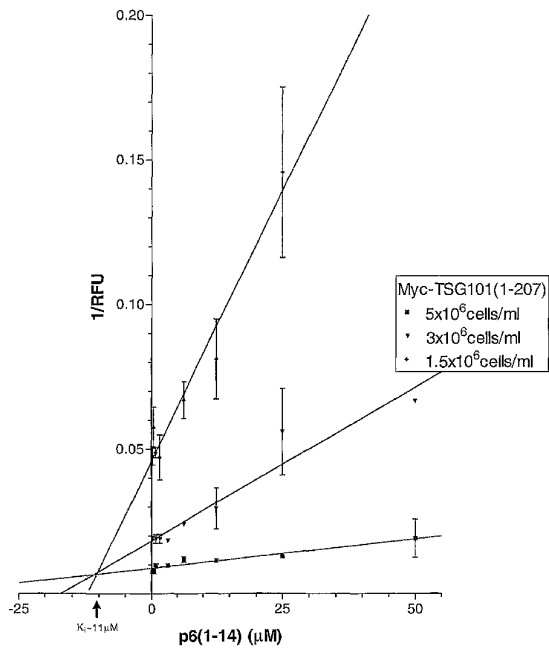


Figure 3

Dixon plot of p6(1-14) on
GST-p6/Myc-TSG101 interaction

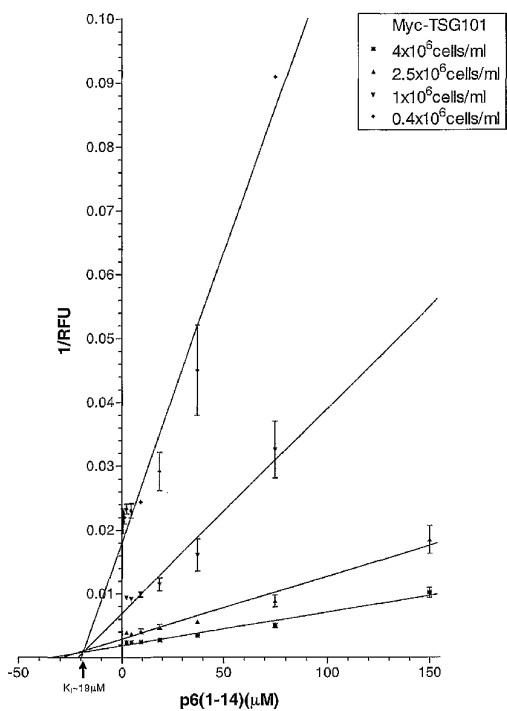


Figure 4

WO 02/072790

PCT/US02/08146

SEQUENCE LISTING

<110> Myriad Genetics, Incorporated
Wettstein, Daniel A
Morham, Scott
Zavitz, Kenton

<120> TSG101-GAG INTERACTION AND USE THEREOF

<130> 1907.03 WO

<140> PCT/US02/08146
<141> 2002-03-14

<150> US 09/972,035
<151> 2001-10-04

<150> US 09/971,549
<151> 2001-10-04

<150> US 60/276,259
<151> 2001-03-14

<160> 32

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus

<400> 1
Pro Thr Ala Pro
1

Page 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/072790

PCT/US02/08146

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Mutant human immunodeficiency virus

<400> 2
Pro Thr Thr Pro
1

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus

<400> 3
Pro Ser Ala Pro
1

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Mutant human immunodeficiency virus

<400> 4
Pro Ser Thr Pro
1

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Mutant human immunodeficiency virus

<400> 5
Pro Ile Ala Pro
1

<210> 6
<211> 4

WO 02/072790

PCT/US02/08146

<212> PRT

<213> Mutant human immunodeficiency virus

<400> 6

Pro Ile Thr Pro
1

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 7

Glu Pro Thr Ala Pro
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 8

Glu Pro Ser Ala Pro
1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 9

Pro Thr Ala Pro Pro
1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

WO 02/072790

PCT/US02/08146

<400> 10

Pro Ser Ala Pro Pro
1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 11

Glu Pro Thr Ala Pro Pro
1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 12

Glu Pro Ser Ala Pro Pro
1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 13

Pro Glu Pro Thr Ala Pro
1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 14

Pro Glu Pro Ser Ala Pro
1 5

Page 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/072790

PCT/US02/08146

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus

<400> 15
Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus

<400> 16
Arg Pro Glu Pro Ser Ala Pro
1 5

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus

<400> 17
Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus

<400> 18
Pro Glu Pro Ser Ala Pro Pro
1 5

<210> 19
<211> 8

Page 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/072790

PCT/US02/08146

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 19

Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu
1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 20

Glu Pro Ser Ala Pro Pro Glu Glu
1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 21

Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 22

Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

Page 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/072790

PCT/US02/08146

<400> 23
Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 24

Pro Glu Pro Ser Ala Pro Pro Glu Glu
1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 25

Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu
1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 26

Arg Pro Glu Pro Ser Ala Pro Pro Glu Glu
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 27

Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu
Page 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/072790

PCT/US02/08146

1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 28

Arg Pro Glu Pro Ser Ala Pro Pro Ala Glu
1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 29

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu
1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 30

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Ser Ala Pro Pro Glu Glu
1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 31

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser
1 5 10

<210> 32

WO 02/072790

PCT/US02/08146

<211> 14

<212> PRF

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 32

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Ser Ala Pro Pro Glu Glu Ser
1 5 10

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/072790 A3(51) International Patent Classification: A01N 43/04,
A61K 31/70, C07H 21/04, C07K 1/00, C12P 1/00MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/US02/08146

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(22) International Filing Date: 14 March 2002 (14.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/276,259 14 March 2001 (14.03.2001) US
09/972,035 4 October 2001 (04.10.2001) US
09/971,549 4 October 2001 (04.10.2001) US

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations AE,
AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GI, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
— of inventorship (Rule 4.17(ii)) for US only(71) Applicant (for all designated States except US): MYRIAD
GENETICS, INC [US/US]; 320 Wakara Way, Salt Lake
City, UT 84108 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WETTSTEIN,
Daniel, Albert [US/US]; 1208 East 900 South, Salt Lake
City, UT 84105 (US). MORHAM, Scott [US/US]; 1337
Roosevelt Avenue, Salt Lake City, UT 84105 (US). ZA-
VITZ, Kenton [US/US]; 321 North "T" Street, Salt Lake
City, UT 84103 (US).(74) Agents: ZHANG, Jay, Z. et al.; Myriad Genetics, Inc.,
320 Wakara Way, Salt Lake City, UT 84108 (US).

Published:

with international search report

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GI, GR,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,(88) Date of publication of the international search report:
18 September 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/072790 A3

(54) Title: TSG101-GAG INTERACTION AND USE THEREOF

(57) Abstract: Isolated protein complexes are provided comprising Tsg101 and HIV GAG or GAGp6. The protein complexes are useful in screening assays for selecting compounds effective in modulating the Tsg101-HIV GAG or GAGp6 interaction within the protein complexes.

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/08146
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01N 43/04; A61K 31/70; C07H 21/04; C07K 1/00; C12P US CL : 424/159.1, 160.1, 172.1; 435/91.21; 514/44; 530/350, 327, 387.9; 536/23.4 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Continuation Sheet Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, Medline		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 20030049607A1 (GREENER et al.) 13 March 2003 (13.03.03), see entire document.	1-3, 16, 17, 34-39, and 41-73
P, X	LUBAN. HIV-1 and Ebola virus: The getaway driver nabbed. Nature Medicine, (Dec. 2001) Vol. 7, No. 12, pp. 1278-1280.	1-3
P, Y		1-3, 16, 17, 34-39, & 41-73
P, X	MARTIN-SERRANO et al. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. Nature Medicine, (Dec. 2001) Vol. 7, No. 12, pp. 1313-1319.	1-3
P, Y		1-3, 16, 17, 34-39, & 41-73
P, X	DÉMIROV et al. Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, (22 January 2002) Vol. 99, No. 2, pp 955-960.	1-3, 34-39, 67, & 70
P, Y		1-3, 16, 17, 34-39, & 41-73
P, X	GARRUS et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. Cell, (05 Oct. 2001) Vol. 107, No. 1, pp.55-65.	1-3
P, Y		13, 16, 17, 34-39, & 41-73
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
21 April 2003 (21.04.2003)	09 JUN 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Jeffrey Stueker Telephone No. 703-308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US02/08146
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUANG et al. p6Gag Is Required for Particle Production from Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Molecular Clones Expressing Protease. <i>Journal of Virology</i> , (Nov. 1995) Vol. 69, No. 11, pp. 6810-6818.	1-3, 16, 17, 34-39, & 41-73
Y	VERKHIVKER et al. Towards understanding the mechanisms of molecular recognition by computer simulations of ligand-protein interactions. <i>Journal of Molecular Recognition</i> , (No.-Dec. 1999) Vol. 12, No. 6, pp. 371-89. Ref: 190.	37-39
Y	WHITTLE et al. Protein structure-based drug design. <i>Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure</i> , (1994) Vol. 23, pp. 349-75. Ref: 72.	37-39
Y	LEVIN et al. Inhibition of early and late events of the HIV-1 replication cycle by cytoplasmic Fab intrabodies against the matrix protein, p17. <i>Molecular Medicine</i> , (Feb. 1997) Vol. 3, No. 2, pp. 96-110.	34-36, 41-49, 55-64, & 68-73
Y	MHASHILKAR et al. Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. <i>EMBO Journal</i> , (3 April 1995) Vol. 14, No. 7, pp. 1542-51.	34-36, 41-49, 55-64, & 68-73
Y	SAVARINO et al. The biochemistry of gene therapy for AIDS. <i>Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i> , (April 1998) Vol. 36, No. 4, pp. 205-10. Ref: 48.	34-36, 41-49, 52-65, & 68-73
Y	ROSSI et al. Therapeutic applications of catalytic antisense RNAs (ribozymes). <i>CIBA Foundation Symposium</i> , (1997) Vol. 209, pp. 195-204; discussion 204-6. Ref: 34.	66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/08146
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		
	<input checked="" type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/08146

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

The inventions listed as Groups I-XIX do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Each of the compounds of the different groups are different structures that lack a common technical feature between them; they lack common chemical compositions and core structures and are not interchangeable. The methods do not have a common technical feature because they do not share common steps or reagents with the other claimed methods. For the reasons given above, the claims can not be said to have unity of invention.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-3, drawn to a protein complex.

Group II, claim 16, drawn to a fusion protein.

Group III, claim 17, drawn to nucleic acid encoding a fusion protein.

Group IV, claims 34-36, drawn to a method of selecting an inhibitor of protein-protein interactions in a cell.

Group V, claims 37-39, drawn to a method of selecting a compound that inhibits protein-protein interactions by computer.

Group VI, claims 41-49, drawn to a method of modulating in a cell with antibodies.

Group VII, claims 50 and 51, drawn to a method of modulating with nucleic acid encoding an antibody in a cell.

Group VIII, claims 52-54, drawn to a method of modifying with antisense nucleic acid.

Group IX, claims 55-59, drawn to a method of inhibiting viral budding with antibodies against Tsg101.

Group X, claims 60-62, drawn to a method of inhibiting viral budding with nucleic acid encoding antibodies against Tsg101.

Group XI, claims 63 and 64, drawn to a method of inhibiting viral budding with nucleic acid encoding antibodies against the complex.

Group XII, claim 65, drawn to the use of antisense nucleic acid to inhibit HIV budding.

Group XIII, claim 66, drawn to the use of a ribozyme to inhibit HIV budding.

Group XIV, claim 67, drawn to the use of a compound to inhibit HIV budding.

Group XV, claims 68 and 69, drawn to the use of antibody capable of binding Tsg101 to inhibit HIV budding.

Group XVI, claim 70, drawn to the use of the compound capable of interfering to inhibit HIV budding.

Group XVII, claim 71, drawn to the use of an antibody reactive with complex to inhibit HIV budding.

Group XVIII, claim 72, drawn to the use of nucleic acid encoding an antibody immunoreactive with Tsg101 to inhibit HIV budding.

Group XIX, claim 73, drawn to the use of nucleic acid encoding antibodies immunoreactive with the complex to inhibit HIV budding.

The special technical feature of Group I is a protein complex.

The special technical feature of Group II is a fusion protein.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/08146

The special technical feature of Group III is nucleic acid encoding a fusion protein.

The special technical feature of Group IV is a method of selecting an inhibitor of protein-protein interactions in a cell.

The special technical feature of Group V is a method of selecting a compound that inhibits protein-protein interactions by computer.

The special technical feature of Group VI is a method of modulating in a cell with antibodies.

The special technical feature of Group VII is a method of modulating with nucleic acid encoding an antibody in a cell.

The special technical feature of Group VIII is a method of modifying with antisense nucleic acid.

The special technical feature of Group IX is a method of inhibiting viral budding with antibodies against Tsg101.

The special technical feature of Group X is a method of inhibiting viral budding with nucleic acid encoding antibodies against Tsg101.

The special technical feature of Group XI is a method of inhibiting viral budding with nucleic acid encoding antibodies against the complex.

The special technical feature of Group XII is the use of antisense nucleic acid to inhibit HIV budding.

The special technical feature of Group XIII is the use of a ribozyme to inhibit HIV budding.

The special technical feature of Group XIV is the use of a compound to inhibit HIV budding.

The special technical feature of Group XV is the use of antibody capable of binding Tsg101 to inhibit HIV budding.

The special technical feature of Group XVI is the use of the compound capable of interfering to inhibit HIV budding.

The special technical feature of Group XVII is the use of an antibody reactive with complex to inhibit HIV budding.

The special technical feature of Group XVIII is the use of nucleic acid encoding an antibody immunoreactive with Tsg101 to inhibit HIV budding.

The special technical feature of Group XIX is the use of nucleic acid encoding antibodies immunoreactive with the complex to inhibit HIV budding.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:

424/159.1, 160.1, 172.1, 435/91.21; 514/44; 530/350, 327, 387.9 388.2, 388.3, 388.35, 388.85, 389.4; 536/23.4, 23.53, 23.72, 24.5

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/18	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/155	A 6 1 P 31/18	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/155	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/10	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/10	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

フロッピー

(72) 発明者 モーラム, スコット

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 0 5, ソルト・レイク・シティ, ルーズヴェルト・アヴェニュー 1 3 3 7

(72) 発明者 ザヴィッツ, ケントン

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 0 3, ソルト・レイク・シティ, ノース・I・ストリート 3 2 1

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02

FB03

4B024 AA01 AA11 BA31 BA44 BA51 CA01 GA11 HA20

4B063 QA05 QQ91 QQ96 QR48 QR77 QS15 QS32 QX01

4B065 AA93Y AA97Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA14 AA17 BA35 CA01 CA59 NA13

NA14 ZB332 ZC552

4C085 AA13 AA14 BB31 BB33 BB36 BB37 BB41 BB43 CC05 CC22

CC23 EE01 GG01

4C086 AA01 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 ZB33 ZC55

4H045 AA10 AA11 BA09 BA40 CA05 CA40 DA76 EA29 EA53 EA60

FA74

专利名称(译)	TSG 101-GAG交互及其使用		
公开(公告)号	JP2004533815A	公开(公告)日	2004-11-11
申请号	JP2002571846	申请日	2002-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	美瑞德生物工程公司		
申请(专利权)人(译)	无数的遗传学公司		
[标]发明人	ウェットスタインダニエルアルバート モーラムスコット ザヴィッツケントン		
发明人	ウェットスタイン,ダニエル・アルバート モーラム,スコット ザヴィッツ,ケントン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/18 C07K14/155 C07K14/16 C07K14/47 C07K16/10 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/10 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	C07K14/005 C07K14/4703 C07K2319/00 C12N15/1055 C12N2740/16222 Y02P20/582		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P31/18 C07K14/155 C07K14/47 C07K16/10 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33 /15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 G01N37/00.102 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA44 4B024/BA51 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA20 4B063/QA05 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063 /QR48 4B063/QR77 4B063/QS15 4B063/QS32 4B063/QX01 4B065/AA93Y 4B065/AA97Y 4B065 /AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA14 4C084/AA17 4C084/BA35 4C084/CA01 4C084 /CA59 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZB332 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/BB33 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC05 4C085/CC22 4C085 /CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA13 4C086/NA14 4C086/ZB33 4C086/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045 /BA09 4H045/BA40 4H045/CA05 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/EA53 4H045/EA60 4H045/FA74		
优先权	60/276259 2001-03-14 US 09/972035 2001-10-04 US 09/971549 2001-10-04 US		
其他公开文献	JP2004533815A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了包含Tsg101和HIV GAG或GAGp6的分离的蛋白质复合物。蛋白质复合物可用于筛选试验以选择有效调节蛋白质复合物中Tsg101-HIV GAG或GAGp6相互作用的化合物。

nt. Cl. ⁷	FI	テマコード (参考)
12 N 15/09	C 12 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
61 K 31/7088	A 61 K 31/7088	4 B 0 2 4
61 K 39/395	A 61 K 39/395 D	4 B 0 6 3
61 K 45/00	A 61 K 39/395 N	4 B 0 6 5
61 K 48/00	A 61 K 45/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 202 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-571846 (P2002-571846)	(71) 出願人	500086515
22) 出願日	平成14年3月14日 (2002.3.14)		ミリアド・ジュネティックス・インコーポ レイテッド
翻訳文提出日	平成15年9月16日 (2003.9.16)		アメリカ合衆国84108ユタ州ソルト・ レイク・シティ、ワカラ・ウェイ320番
国際出願番号	PCT/US2002/008146		
国際公開番号	W02002/072790		
国際公開日	平成14年9月18日 (2002.9.18)	(74) 代理人	100099623
優先権主張番号	60/276,259		弁理士 奥山 尚一
優先日	平成13年3月14日 (2001.3.14)	(74) 代理人	100096769
優先権主張国	米国 (US)		弁理士 有原 幸一
優先権主張番号	09/972,035	(74) 代理人	100107319
優先日	平成13年10月4日 (2001.10.4)		弁理士 松島 鉄男
優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ウェットスタイン, ダニエル・アルバート
優先権主張番号	09/971,549		アメリカ合衆国ユタ州84105, ソルト ・レイク・シティ, イースト・900・サ ウス 1208
優先日	平成13年10月4日 (2001.10.4)		
優先権主張国	米国 (US)		