

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-269918

(P2009-269918A)

(43) 公開日 平成21年11月19日(2009.11.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/155 (2006.01)</b>	C07K 14/155 ZNA	2G045
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B024
<b>C07K 16/10 (2006.01)</b>	C07K 16/10	4B065
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4H045
<b>C12N 1/19 (2006.01)</b>	C12N 1/19	

審査請求 有 請求項の数 73 O L (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-140132 (P2009-140132)	(71) 出願人	500086515 ミリアド・ジェネティクス・インコーポ レイテッド 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
(22) 出願日	平成21年6月11日(2009.6.11)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(62) 分割の表示	特願2002-571846 (P2002-571846) の分割	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
原出願日	平成14年3月14日(2002.3.14)	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(31) 優先権主張番号	60/276,259	(72) 発明者	ウェットスタイン, ダニエル・アルバート 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
(32) 優先日	平成13年3月14日(2001.3.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	09/972,035		
(32) 優先日	平成13年10月4日(2001.10.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	09/971,549		
(32) 優先日	平成13年10月4日(2001.10.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(特許庁注：以下のものは登録商標)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TSG101-GAG相互作用およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 Tsg101およびHIV GAGまたはGAG p6を含む単離されたタンパク質複合体の使用。

【解決手段】 ヒト腫瘍感受性遺伝子101(「Tsg101」)がHIV GAG p6と相互作用する。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に使用し、Tsg101ならびにTsg101とHIV GAGまたはGAG p6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であり、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、タンパク質複合体は、タンパク質複体内でのTsg101-HIV GAGまたはGAG p6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に利用できる。

【選択図】 図2

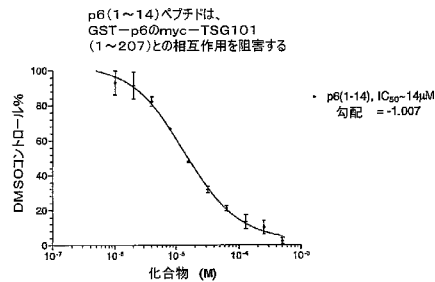


Figure 2

## 【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

10

20

30

40

50

G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、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) HIV GAG p6ポリペプチドまたは(b) HIV GAG p6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HIV GAG p6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HIV GAG p6フラグメントが、天然に存在するHIV GAG p6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)AP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Tsg101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HIV GAG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、

40

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

50

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。

【請求項 22】

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 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記接触ステップを宿主細胞において行う、請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

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 ~ 13 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 26】

前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

(a) 請求項 1 ~ 13 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 ~ 13 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 28】

請求項 27 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 29】

請求項 1 ~ 13 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 ~ 13 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 30】

前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項 28 または 29 に記載の宿主細胞。

【請求項 31】

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 28、29、または 30 の宿主細胞。

【請求項 32】

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 31 の宿主細胞。

【請求項 33】

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、

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

された抗体。

【請求項 4 1】

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 4 2】

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 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

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 4 2 に記載の方法。

10

【請求項 4 4】

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 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

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 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

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 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 7】

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 4 3 に記載の方法。

20

【請求項 4 8】

前記抗体が一本鎖抗体である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

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 4 3 に記載の方法。

【請求項 5 0】

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 4 9 に記載の方法。

30

【請求項 5 1】

前記抗体が一本鎖抗体である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

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 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

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 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

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 5 2 に記載の方法。

40

【請求項 5 5】

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 5 6】

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 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

50

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 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

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 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

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 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 0】

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。

10

【請求項 6 1】

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 6 2】

前記抗体が一本鎖抗体である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

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。

20

【請求項 6 4】

前記抗体が一本鎖抗体である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

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 6 6】

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 6 7】

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。

30

【請求項 6 8】

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 6 9】

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 7 0】

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。

40

【請求項 7 1】

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 7 2】

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 7 3】

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

50

をコードする核酸の使用。

【発明の詳細な説明】

【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間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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

、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クリーンスクリーニングを行うことができない。

#### 【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、「酵母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中には、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

40

#### 【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。

#### 【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<sup>+</sup>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

50

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。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0012】

ヒト腫瘍感受性遺伝子101（「Tsg101」）はHIV GAGp6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GAGp6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GAGp6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

50

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、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 p6 ポリペプチド、または(b) HIV GAG p6 ホモログ、または(c) HIV GAG p6 フラグメントを含む融合タンパク質であり得る。

10

【0015】

本発明はまた、(a) (i) Tsg101 タンパク質、(ii) 前記Tsg101 と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、HIV GAG p6 と相互作用することができるTsg101 タンパク質ホモログ、(iii) Tsg101 UEVドメインを含むTsg101 タンパク質フラグメント、および(iv) 前記Tsg101 タンパク質、前記Tsg101 タンパク質のホモログ、または前記Tsg101 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) HIV GAG ポリペプチド、(2) 前記HIV GAG 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、Tsg101 と相互作用することができる前記HIV GAG ポリペプチドのホモログ、(3) HIV GAG p6、(4) HIV GAG p6 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、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、および(6) 前記HIV GAG ポリペプチド、前記HIV GAG ポリペプチドのホモログ、前記HIV GAG p6 タンパク質、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、HIV GAG p6 のフラグメントは、天然に存在するHIV GAG p6 のP(T/S)AP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、HIV GAG p6 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。

20

30

【0016】

本発明は、さらに、P(T/S)AP後期ドメインモチーフを含むレトロウイルスGAG ポリペプチドまたは前記レトロウイルスGAG 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、HIV-1、HIV-2、HIV-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、

40

(a) (i) Tsg101 タンパク質、

(ii) 前記Tsg101 と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、HIV GAG p6 と相互作用することができるTsg101 タンパク質ホモログ、

(iii) Tsg101 UEVドメインを含むTsg101 タンパク質フラグメント、および

(iv) 前記Tsg101 タンパク質、前記Tsg101 タンパク質のホモログ、または前記Tsg101 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)AP後期ドメインモチーフを有するレトロウイルスGAGポ

50

リペプチド、

(2) 前記レトロウイルスGAG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、Tsg101と相互作用することができる前記レトロウイルスGAGポリペプチドのホモログ、

(3) Tsg101と相互作用することができる前記レトロウイルスGAG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GAGポリペプチド、前記レトロウイルスGAGポリペプチドホモログ、または前記レトロウイルスGAG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) Tsg101タンパク質、

(ii) 前記Tsg101と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、HIV GAG p6と相互作用することができるTsg101タンパク質ホモログ、

(iii) Tsg101 UEVドメインを含むTsg101タンパク質フラグメント、および

(iv) 前記Tsg101タンパク質、前記Tsg101タンパク質のホモログ、または前記Tsg101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GAGポリペプチド、

(2) 霊長類レンチウイルスGAG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、Tsg101と相互作用することができる霊長類レンチウイルスGAGポリペプチドのホモログ、

(3) 霊長類レンチウイルスGAG p6タンパク質、

(4) HIV GAG p6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、Tsg101と相互作用することができる霊長類レンチウイルスGAG p6のホモログ、

(5) Tsg101と相互作用することができる霊長類レンチウイルスGAG p6のフラグメント、

(6) 霊長類レンチウイルスGAGポリペプチド、霊長類レンチウイルスGAGポリペプチドのホモログ、霊長類レンチウイルスGAG p6タンパク質、霊長類レンチウイルスGAG p6のホモログ、または霊長類レンチウイルスGAG p6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Tsg101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HIV GAG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

10

20

30

40

50

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 P C R 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。

#### 【 0 0 2 0 】

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。

10

#### 【 0 0 2 1 】

本発明のさらに別の態様では、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 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。T s g 1 0 1 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、T s g 1 0 1 と H I V G A G との間の相互作用の研究ならびに H I V ウイルス増殖機構の理解で使用することができる。

20

#### 【 0 0 2 2 】

したがって、本発明のタンパク質複合体または T s g 1 0 1 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、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 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、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 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のタンパク質 - タンパク質相互作用を誘発もしくは開始または増強もしくは安定化することができる化合物の選択に有用である。

30

#### 【 0 0 2 3 】

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。

40

#### 【 0 0 2 4 】

好ましい実施形態では、スクリーニング法は、( a ) 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有する第 1 の融合タンパク質およびレトロウイルス G A G ( 例えば、H I V G A G ) 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、D N A 結合ドメイン

50

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。

【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 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、
- (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

10

20

30

40

50

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、

(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

、  
(iv) 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

【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、(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。

【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 ウイルスの出芽を妨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。

【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

10

20

30

40

50

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。

#### 【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とする。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。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0036】

【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】H I V G A G p 6 の最初の 1 4 アミノ酸残基を有する p 6 ( 1 ~ 1 4 ) ペプチドが G S T - p 6 と m y c - T s g 1 0 1 ( 1 ~ 2 0 7 ) 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】G S T - p 6 と m y c - T s g 1 0 1 ( 1 ~ 2 0 7 ) との間の相互作用の p 6 ( 1 ~ 1 4 ) 阻害を示す D i x o n プロットを示す図である。

【図4】G S T - p 6 と m y c - T s g 1 0 1 ( 1 ~ 2 0 7 ) との間の相互作用の p 6 ( 1 ~ 1 4 ) 阻害を示す別の D i x o n プロットを示す図である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0037】

##### 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、パルミトイル化形態、リボシル化形態、アセチル化形態、ユビキチン

10

20

30

40

50

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、ピオチン、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。

**【0038】**

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。

10

**【0039】**

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、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。

20

**【0040】**

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、親和性プロットティング、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。

30

**【0041】**

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。

40

**【0042】**

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。

**【0043】**

50

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。

10

20

30

40

50

#### 【0044】

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。

#### 【0045】

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。

#### 【0046】

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、同一性を、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。

【0047】

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、BLASTN 2.1.2 プログラムをデフォルトパラメータ(マッチ:1; mismatches:-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: BLOSUM62; 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 BLASTP 2.1.2 プログラムを使用する。

10

【0048】

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。

20

【0049】

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')<sub>2</sub>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ート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。

30

【0050】

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。

40

【0051】

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。

【0052】

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

50

「H I V G A G p 6」は、H I V G A G p 6 タンパク質を意味する。

【0053】

本明細書中で使用される、用語「H I V 感染」は、一般に、レトロウイルスのヒト免疫不全ウイルス (H I V) ファミリー (H I V I、H I V I I、およびH I V I I I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、H I V 感染の治療は、任意のレトロウイルスH I V ファミリーを保有する患者およびA I D S 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A I D S 関連病態の治療もしくは予防を含む。H I V 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H I V 抗体陽性であるか、H I V 陽性であるか、A I D S の症状が現れていることを基本として患者をH I V キャリアと同定することができる。すなわち、「H I V 感染の治療」は、H I V 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C D 4<sup>+</sup>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A I D S (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定義される) が含まれる) 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、「H I V 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H I V への曝露後の疑わしいH I V 感染の治療を含む。

10

【0054】

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。

20

【0055】

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。

30

【0056】

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。

40

【0057】

【表 1】

## HIV GagおよびTsg101の結合領域

ペイト			プレイ		
ペイトタンパク質	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

10

## 【0058】

2.1 Tsg101はHIVウイルス出芽に関連する

腫瘍感受性遺伝子101(Tsg101)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。Tsg101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。Tsg101は、スタスミン(腫瘍形成に関与する細胞質リンタンパク質)と相互作用し、NIH-3T3細胞中でのTsg101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。Li and Cohen、Cell、85(3)、319~29、1996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Tsg101の欠損が起こり得ることが示唆されている。Liら、Cell、88(1)、143~54、1997。Tsg101は、ユビキチン結合酵素E2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Tsg101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Tsg101は、E2ユビキチン結合(Ubc)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。Koonin and Abagyan、Nat. Genet.、16(4)、330~1、1997を参照のこと。したがって、Tsg101は、明らかに不活性なUbc酵素のホモログ群に属し得る。前出を参照のこと。E2ユビキチン結合(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。

20

30

## 【0059】

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。

40

## 【0060】

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。

50

P ( T / S ) A P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H I Vの粒子産生に重要である。H u a n gら、J . V i r o l . , 6 9、6 8 1 0 ~ 6 8 1 8、1 9 9 5を参照のこと。詳細には、P T A P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、P T A P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。H u a n gら、J . V i r o l . , 6 9、6 8 1 0 ~ 6 8 1 8、1 9 9 5を参照のこと。

#### 【0061】

本発明によれば、異なるG A G p 6の点変異 ( E 6 G、P 7 L、A 9 R、またはP 1 0 L ) を作製し、T s g 1 0 1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G A G p 6ペプチドおよびE 6 G G A G p 6変異体は、T s g 1 0 1タンパク質に結合することができ、P 7 L、A 9 R、およびP 1 0 Lの各点変異によりT s g 1 0 1に対するG A G p 6結合親和性が破壊される。P 7 L、A 9 R、およびP 1 0 Lの点変異により、G A G p 6ペプチドのP T A Pモチーフが変化する。H I V G A G p 6 g a gタンパク質のP T A Pモチーフの点変異により、H I V粒子の宿主細胞からの出芽が防止される。H u a n gら、J . V i r o l . , 6 9、6 8 1 0 ~ 6 8 1 8、1 9 9 5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、H I V G A G p 6の最初の14アミノ酸残基 ( P T A P後期ドメインモチーフを含む ) がT s g 1 0 1のN末端部分 ( T s g 1 0 1 U E Vドメインを含むアミノ酸残基1 ~ 2 0 7 ) への結合に十分であることを発見した。

10

20

#### 【0062】

T s g 1 0 1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 ( V P S ) に密接に関連する。V P S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。L e m m o n a n d T r a u b、C u r r . O p i n . C e l l . B i o l . , 1 2、4 5 7 ~ 6 6、2 0 0 0を参照のこと。2つの別のV P S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、上皮成長因子受容体 ( E G F R ) 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V P S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 ( M V B ) 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M V Bが作製されて、小胞 ( 約5 0 ~ 1 0 0 n m ) が形成される。成熟M V Bは、数百個のこれらの小胞を含む。次いで、M V B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。

30

#### 【0063】

酵母2ハイブリッドアッセイで単離されたT s g 1 0 1プレイフラグメントは、ユビキチンE 2変異型 ( U E V ) ドメインを含み、これは、U E VドメインがP ( T / S ) A Pドメインへの結合に関与することを示す。T s g 1 0 1 U E V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H I V - 1感染細胞中の遊離ユビキチンレベルを減少させ、H I V - 1およびH I V - 2の放出および成熟を妨害するという事実と一致する。P a t n a i kら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 7 ( 2 4 )、1 3 0 6 9 ~ 7 4、2 0 0 0 ; S c h u b e r tら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 7 ( 2 4 )、1 3 0 5 7 ~ 6 2、2 0 0 0 ; S t r a c kら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 7 ( 2 4 ) 1 3 0 6 3 ~ 8、2 0 0 0を参照のこと。

40

#### 【0064】

U b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。H i c k e、T r e n d s

50

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; Stauband 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。

10

## 【0065】

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。

20

## 【0066】

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; Hartlyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 13871~13876, 2000; Hartly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。

30

40

## 【0067】

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

50

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。

#### 【0068】

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。Jurá、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 GAGp6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。

#### 【0069】

##### 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 GAGp6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。

#### 【0070】

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、誘導體、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、誘導體、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、誘導體、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、誘導體、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ログ、誘導體、もしくはフラグメントであり得る。上記のセクション1.で定義されるように、Tsg101のホモログおよび誘導體は、HIV GAGと(GAGp6領域を

10

20

30

40

50

介して)相互作用することができるはずである。H I V G A G のホモログおよび誘導体は、T s g 1 0 1 と相互作用することができる。好ましくは、ホモログのアミノ酸配列は、対応する天然のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 同一である。

【 0 0 7 1 】

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 T s g 1 0 1、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 のホモログ、T s g 1 0 1 の誘導体、T s g 1 0 1 ホモログの誘導体、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(例えば、T s g 1 0 1 タンパク質の U E V ドメイン、特にアミノ酸残基 1 ~ 2 0 7、アミノ酸残基 1 ~ 1 4 7 などを含むフラグメント)、T s g 1 0 1 フラグメントの誘導体、または ( 1 ) 完全な天然の T s g 1 0 1、( 2 ) 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 のホモログ、または ( 3 ) 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 フラグメントを含む融合タンパク質であり得る。

10

【 0 0 7 2 】

他のパートナーは、( 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 8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 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 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 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 ) H I V G A G ポリペプチド、H I V G A G ポリペプチドのホモログ、H I V G A G p 6、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であり得る。

20

【 0 0 7 3 】

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 H I V G A G 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 G A G ポリペプチドおよびそのフラグメントは、H I V G A G ポリペプチドと同一の様式で 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。

30

40

【 0 0 7 4 】

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 /

50

S) APモチーフを含むフラグメント)、GAGポリペプチドフラグメントの誘導体、または(1)完全なGAGポリペプチド、(2)Tsg101と相互作用することができるGAGポリペプチドのホモログ、もしくは(3)Tsg101と相互作用することができるGAG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。

【0075】

HIV GAGp6と相互作用することができるTsg101のフラグメントは、Tsg101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(molecular engineering)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Tsg101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HIV GAGp6と相互作用する能力を試験することができる。同様に、Tsg101と同語作用することができるHIV GAGのフラグメント、HIV GAGp6のフラグメント、および他のレトロウイルスGAG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。

10

【0076】

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HIV GAG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HIV GAG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)APモチーフまたはその変異体(例えば、PIAPモチーフおよびPTTPモチーフ)であり得るHIV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)AP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)AP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GAG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。

20

30

40

【0077】

さらに、P(T/S)AP、PIAP、またはPTTPモチーフ自体でTsg101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Tsg101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。

【0078】

50

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 1 0 1 および 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) を、直接互いに融合させるか、ペプチドリinker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。

#### 【0079】

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<sup>1 2 5</sup> I - { 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。

#### 【0080】

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。

#### 【0081】

##### 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。

#### 【0082】

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ティ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。免疫ブロッティングでは、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。

#### 【0083】

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。

#### 【0084】

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ブロッティ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Sephacrose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。親和性ブロッティングでは、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プ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。

#### 【0085】

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。

#### 【0086】

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

10

20

30

40

50

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。

【0087】

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（6×His）、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。ポリヒスチジンタグ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。

10

20

30

40

【0088】

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って宿主細胞の染色体に組み込むことができる。安定な細胞株では、発現ベクターの少なくとも発現カセット部分を、宿主細胞の染色体に組み込む。

【0089】

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。

【0090】

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

50

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、リボシル化、ミリスチル化、およびパルミトイル化などによるコンセンサス配列を作製するかまたは除去するために部位特異的DNA変異誘発によって変化させることができる。あるいは、非天然のアミノ酸を、組換え宿主細胞におけるタンパク質合成の間に相互作用タンパク質メンバーに組み込むことができる。例えば、光反応性リジン誘導体を、修飾リシル (lysyl) tRNAの使用により相互作用タンパク質メンバーに組み込むことができる。例えば、Wiedmannら、Nature、328、830～833、1989；Muschら、Cell、69、343～352、1992を参照のこと。他の光反応性アミノ酸誘導体を、類似の様式で組み込むこともできる。例えば、Highら、J. Biol. Chem.、368、28745～28751、1993を参照のこと。実際、相互作用タンパク質メンバーに組み込まれた光反応性アミノ酸誘導体は、所定の条件下でタンパク質複合体中での相互作用タンパク質パートナーにタンパク質が架橋するように機能することができる。

10

20

**【0091】**

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。

**【0092】**

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。

**【0093】**

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。

30

**【0094】****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。

40

**【0095】**

50

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SuperAldehyde 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1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。

10

**【0096】**

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WO 00/4389A2およびWO 00/04382 (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。

20

**【0097】**

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WO 99/36576 (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。

30

**【0098】**

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。

40

**【0099】**

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WO

50

99/60156、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。

#### 【0100】

##### 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。

10

#### 【0101】

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 GAG p6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, Inc.のMacVectorおよびDNASTARのProteanが含まれる。

20

30

#### 【0102】

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、誘導體、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、誘導體、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體からなる。

40

#### 【0103】

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體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(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン、および破傷風トキシ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MBS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

50

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MF59、モノリン脂質、合成トレハロースジコリノミコレート（TDM）および細胞壁骨格（CWS）（共にRIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, M T）、Proteus International PLC、Cheshire、U. K.の非イオン性界面活性剤小胞（NISV）、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。

#### 【0104】

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（EBV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。

#### 【0105】

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')<sub>2</sub>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。

#### 【0106】

好ましい実施形態では、本発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

10

20

30

40

50

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Lönberg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。

10

20

**【0107】**

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

30

**【0108】**

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。

40

**【0109】**

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. USA, 87, 2941~2945, 1990；Lenz and Weidle, Gene, 87, 213~218, 1990を参照のこと。

**【0110】**

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

50

の相互作用タンパク質メンバーに結合することができ、F a b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F a b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、F a b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 - f o sおよびc - j u n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F a b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。

10

## 【0111】

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. USA、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。

20

## 【0112】

## 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 GAG p6)をスクリーニングアッセイで使用して、Tsg101、HIV GAG p6、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 GAG p6n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 GAG p6、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、Tsg101またはそのホモログもしくは誘導体とHIV GAG p6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。

30

## 【0113】

同様に、HIV GAGまたはHIV GAG p6の代わりに、P(T/S)AP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GAG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。

40

## 【0114】

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。

## 【0115】

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

50

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。

【0116】

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 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。

10

【0117】

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の適切な方法は、本発明を開示された当業者には明らかにはずである。

20

30

【0118】

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

40

50

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。

【0119】

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  
体、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、リボソームディスプ  
レイライブラリー））で試験化合物が得られる。

10

【0120】

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  
または誘導体形態（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（scFv）、Fab'フ  
ラグメント、およびF(ab')<sub>2</sub>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、IgG、IgE、IgA、また  
はIgM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、Huseら、Science、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（scFv）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6,096,551号、米国特  
許第5,844,093号、5,837,460号、米国特許第5,789,208号、  
および米国特許第5,667,988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。

20

30

【0121】

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50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., 37, 1233~1251, 1994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、S  
cience、249、404~406、1990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, 249, 386~390  
, 1990; Moranら、J. Am. Chem. Soc., 117, 10787~10  
788、1995（電氣的にタグ化した合成ペプチドのライブラリー）; Stachel  
hausら、Science、269、69~72、1995; 米国特許第6,156,

40

50

511号、米国特許第6,107,059号、米国特許第6,105,561号、米国特許第5,750,344号、米国特許第5,834,318号、米国特許第5,750,344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III遺伝子または第VII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, 249, 368~390, 1990。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。

10

20

30

40

50

#### 【0122】

5,000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., 37, 1385~1401, 1994を参照のこと。例えば、Bunin and Ellman, J. Am. Chem. Soc., 114, 10997~10998, 1992(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, 89, 9367~9371, 1992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, 262, 1546~1550, 1993およびKaorら、Science, 265, 509~512, 1994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6,162,926号(多置換フラレン誘導体);米国特許第6,093,798号(ヒドロキサム酸誘導体);米国特許第5,962,337号(コンビナトリアル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5,877,278号(N置換オリゴマーの合成);米国特許第5,866,341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5,792,821号(重合可能なシクロデキストリン誘導体);米国特許第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。

#### 【0123】

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。

#### 【0124】

##### 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。

#### 【0125】

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。

#### 【0126】

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。

#### 【0127】

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ー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、蛍光マーカー、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、Sikela and Han, 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ー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複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。

#### 【0128】

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

10

20

30

40

50

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。

【0129】

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。

10

【0130】

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。

【0131】

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。

20

30

【0132】

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。

【0133】

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。

40

【0134】

50

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。

10

## 【0135】

## 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。

20

## 【0136】

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、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。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。

30

40

## 【0137】

本発明のインビボアッセイを、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

50

。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。

10

#### 【0138】

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、pBluescript IISK、pcDNA1、およびpcDNAII)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。

20

#### 【0139】

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細胞、NIH3T3細胞、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SV40T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)(Margolskeeら、Mole. Cell. Biol.、8、28

30

40

50

37、1988を参照のこと)が含まれる。適切な選択マーカ-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。

#### 【0140】

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; Panicali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。

#### 【0141】

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。

#### 【0142】

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35SRNAおよび19SRNA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

10

20

30

40

50

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。

【0143】

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。

10

【0144】

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にはずである。

20

30

【0145】

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。当業者に明らかのように、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。

40

【0146】

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2μ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<sup>R</sup>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

50

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<sup>++</sup>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。

10

## 【0147】

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。

## 【0148】

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、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ーゼをコードし、それにより細胞にカナ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<sup>R</sup>) (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。

20

30

40

## 【0149】

明らかのように、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

50

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。

10

## 【0150】

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

遺伝子型 MAT atrp1his3ura36ops-LEU2を有するEGY48株; および

遺伝子型 MAT aura3-52leu2-3, 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。

20

## 【0151】

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

30

Stratagene (La Jolla、California) から利用可能であり、遺伝子型 MATaura3-52his3-200ade2-101lys2-801trp1-901leu2-3, 112gal4-542gal80-538LYS2:: GAL1-HIS3URA3:: GAL1/CYC1-lacZを有するYRG-2。

## 【0152】

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。

40

## 【0153】

## 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プ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 (Triezenbe

50

rgら、Genes Dev., 2, 718~729, 1988)、大腸菌B42タンパク質(酸のプロンプ、Gyurisら、Cell, 75, 791から803, 1993を参照のこと)、NF-kBp65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。

10

#### 【0154】

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(6xHis)、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。

20

#### 【0155】

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、オペリン、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。

30

#### 【0156】

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、変異URA3遺伝子を含む酵母細胞を、宿主細胞(Ura<sup>-</sup>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<sup>-</sup>(Foa<sup>R</sup>)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。

40

#### 【0157】

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

50

商標) 遺伝子が含まれる。

【0158】

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 GAGp6、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。

10

【0159】

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GAGp6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。

20

【0160】

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。

30

【0161】

酵母系で有用な適切な対抗選択レポーターの例には、URA3遺伝子 (5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) 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)、CAN1遺伝子 (有毒なアルギニン類似体であるカナバニンを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)、GAL1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)、LYS2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)、MET15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ヒドリラーゼをコードする)、およびCYH2遺伝子 (シクロヘキシミド感受性を付与するL29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 (DTA) 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。DTAは、伸長因子2のADP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。

40

【0162】

50

例えば、対抗選択レポーター遺伝子としてURA3遺伝子を使用する場合、インビボアッセイでの宿主細胞(Ura<sup>-</sup>Foa<sup>R</sup>表現型)として変異URA3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、URA3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-FOA)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-FOAに耐性を示し、5-FOA含有培地で成長することができる。したがって、例えば、Tsg101とHIV GAGp6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、Tsg101を、適切な転写アクチベーターのDNA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、HIV GAGp6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URA3遺伝子を、転写活性化ドメインとDNA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。Ura<sup>-</sup>Foa(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-FOA含有培地で培養することができる。試験化合物がTsg101とHIV GAGまたはGAGp6との間の相互作用を破壊しない場合、活性URA3遺伝子産物(すなわち、5-FOA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Tsg101とHIV GAGまたはGAGp6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-FOA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Tsg101とHIV GAGまたはGAGp6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。

10

20

30

40

50

#### 【0163】

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、Kenanら、Trends Biochem. Sc., 19、57~64、1994; Gallopら、J. Med. Chem., 37、1233~1251、1994; Gordonら、J. Med. Chem., 37、1385~1401、1994; Eckerら、Biotechnology、13、351~360、1995を参照のこと。化合物のこのよ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、Nucl. 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。

#### 【0164】

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。

#### 【0165】

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。

#### 【0166】

##### 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。

10

20

30

#### 【0167】

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。

#### 【0168】

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。Ericksonら、*Science*, 249, 527~533、1990を参照のこと。

40

#### 【0169】

50

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ピ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はす。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。

10

## 【0170】

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。

20

## 【0171】

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、5191~5201、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ャ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。

30

40

## 【0172】

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

50

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。

【0173】

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、アラニンスキャニング技術および/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。

10

【0174】

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、アラニンスキャニング、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。Polypgen 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。

20

30

【0175】

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。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。

【0176】

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。

40

【0177】

したがって、当業者に明らかのように、本発明の標的タンパク質またはタンパク質複合

50

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。

【0178】

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 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。

【0179】

1つの実施形態では、細胞中の H I V G A G または G A G p 6 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 H I V G A G または G A G p 6 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 または G A G p 6 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、T s g 1 0 1 タンパク質（特に、T s g 1 0 1 の U E V ドメイン）または H I V G A G もしくは G A G p 6 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、T s g 1 0 1 タンパク質または H I V G A G もしくは G A G p 6 に免疫反応性を示す抗体であり得る。好ましくは、T s g 1 0 1 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 または G A G p 6 タンパク質もしくは T s g 1 0 1 に結合することができるその模倣物由来の小ペプチド、T s g 1 0 1 タンパク質または H I V G A G または G A G p 6 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。

10

20

【0180】

別の実施形態では、タンパク質複合体の調整方法は、T s g 1 0 1 タンパク質および/または H I V G A G もしくは G A G p 6 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。

【0181】

上記の種々の実施形態では、好ましくは、T s g 1 0 1 タンパク質および H I V G A G または G A G p 6 の濃度または活性を、減少させるか阻害する。

30

【0182】

さらに別の実施形態では、H I V G A G または G A G p 6 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。

【0183】

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。

40

【0184】

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

50

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。

【 0 1 8 5 】

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。

10

【 0 1 8 6 】

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。

【 0 1 8 7 】

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ナウイルス ) 、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、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。

20

30

【 0 1 8 8 】

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 ) 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。

40

【 0 1 8 9 】

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

50

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 9 0 】

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 感染の文脈に記載されているが、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。

10

#### 【 0 1 9 1 】

##### 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 ' )<sub>2</sub>、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。

20

30

#### 【 0 1 9 2 】

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。

40

#### 【 0 1 9 3 】

##### 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

50

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 *Vitravene* (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。

【0194】

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、*Sanghvi* 編、「アンチセンス研究と適用」、CRC Press、*Boca Raton*、1993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mRNA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mRNA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DNAまたはmRNA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、100%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DNAまたはmRNAの正常な発現が妨害される。

【0195】

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mRNA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、*Tsg101* 遺伝子または *Tsg101 mRNA* を、標的として使用する。

【0196】

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オチドの種々の天然に存在しない模倣物および誘導體(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。

【0197】

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。

【0198】

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、チオホスホロアミデート、チオ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,

10

20

30

40

50

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。

#### 【0199】

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。

#### 【0200】

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ィー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。

#### 【0201】

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。

#### 【0202】

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,

10

20

30

40

50

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。

【0203】

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。

10

【0204】

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。

【0205】

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。

20

【0206】

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. of Sci. USA、84、8788、1987; Haseloff and Gerlach、Nature、334、585、1988; および Jeffries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、リボザイム療法の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。

30

40

【0207】

本発明によれば、リボザイムは、Tsg101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

50

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RN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 Gurrier - Takadaら、Cell、35、849、1983を参照のこと。

10

#### 【0208】

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Scaringer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。

20

#### 【0209】

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。

30

#### 【0210】

##### 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。Tsg101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。

40

#### 【0211】

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

50

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、Tsg101に結合することができるHIV GAGp6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HIV GAGp6配列の連続スパンを有し、Tsg101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、Tsg101に結合することができ、同一の長さのHIV GAGまたはGAGp6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、HIV GAGp6と相互作用することができ、Tsg101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、HIV GAGp6に結合することができ、同一の長さのTsg101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Tsg101、またはHIV GAGp6、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。

10

20

#### 【0212】

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。

30

#### 【0213】

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。

#### 【0214】

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

40

50

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

#### 【0215】

別の実施形態では、HIV-1tat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-1tat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HIVtat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、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<sub>49～57</sub>、l-またはd-Tat<sub>49～57</sub>のレトロインベルソイソ型（すなわち、l-Tat<sub>57～49</sub>およびd-Tat<sub>57～49</sub>）、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、誘導体（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。

20

30

40

#### 【0216】

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）、ガルパラン（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。

50

## 【0217】

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。

## 【0218】

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。

## 【0219】

ペプチドベースの輸送体に加えて、種々の他の輸送体型（カチオン性リボソーム（Ruira, J. Am. Chem. Soc., 120, 11213~11218, 1998）、デンドリマー（Konora, Bioconjugate Chem., 10, 1115~1121, 1999）、シデロフフォア（Ghoshra, 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、細胞送達用のリボソームにカプセル化する。

10

## 【0220】

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、Kayra, Nature Genet., 24, 257~61, 2000; Cavazzana-Calvo, Science, 288, 669, 2000; および Blaese, Science, 270, 475, 1995; Kantoff, J. Exp. Med., 166, 219, 1987を参照のこと。

20

## 【0221】

## 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「ロックアウト」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、Tsg101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、およびスプライスドナー部位を有する外因性DNAを相同組換えによってTsg101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。

30

40

## 【0222】

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、Kayra, Nature Genet., 24, 257~61, 2000; Cavazzana-Calvo, Science, 288, 669, 2000; および Blaese, Science, 270, 475, 1995; Kantoff, J. Exp. Med., 166, 219, 1987を参照のこと。

## 【0223】

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Tsg101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

50

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、H I V G A G p 6 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「ノックアウト」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。

#### 【0224】

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、p C E P 4、p c D N A I、p I N D、p S e c T a g 2、p V A X 1、p c D N A 3 . 1、および p B I - E G F P、および p D i s p l a y を含む）。

10

#### 【0225】

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、組み換えウイルスは、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。

#### 【0226】

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、M L V）、レンチウイルス（例えば、H I V および S I V）、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（C e p k o ら、C e l l、37、1053~1062、1984；C o n e a n d M u l l i g a n、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、81、6349~6353、1984を参照のこと）、マウス乳癌ウイルス（S a l m o n s ら、B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n .、159、1191~1198、1984を参照のこと）、テナガザル白血病ウイルス（M i l l e r ら、J . V i r o l o g y、65、2220~2224、1991を参照のこと）に、H I V（S h i m a d a ら、J . C l i n . I n v e s t .、88、1043~1047、1991を参照のこと）、トリレトロウイルス（C o s s e t ら、J . V i r o l o g y、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。

20

30

#### 【0227】

アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターが、臨床試験で首尾よく試験されている。例えば、K a y ら、N a t u r e G e n e t .、24、257~61、2000を参照のこと。A A V 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。M u z y c z k a、C u r r . T o p . M i c r o b g i o l . I m m u n .、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 A A V 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。

40

#### 【0228】

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 6,03

50

3, 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）。

#### 【0229】

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ボックスウイルス（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。

10

#### 【0230】

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；Curiel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。

#### 【0231】

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。

20

#### 【0232】

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。

30

#### 【0233】

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）。

40

#### 【0234】

### 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（

50

遺伝子または mRNA) に特異的なリボザイム化合物、(4) Ts g 1 0 1 または HIV G A G もしくは G A G p 6 または P ( T / S ) A P 後期ドメインモチーフを含む別のレトロウイルス G A G 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) Ts g 1 0 1 またはレトロウイルス G A G 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。

#### 【0235】

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、B e r g e r、J . P h a r m . S c i . , 6 6、1 ~ 1 9、1 9 7 7 を参照のこと。

#### 【0236】

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、P r i m o g e l、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。

#### 【0237】

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ための従来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。

#### 【0238】

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プルなどの従来容器で保存することができる。

#### 【0239】

局所投与経路には、鼻腔、口腔内、粘膜、直腸、または腔投与が含まれる。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

10

20

30

40

50

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、キサンタンガム、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。

#### 【0240】

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。

10

#### 【0241】

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」としても公知のこのような化合物は、体内で活性化合物を容易に放出することができる。活性化合物の徐放を、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。

20

30

#### 【0242】

本発明の活性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。

40

#### 【0243】

他の有効成分が本発明の活性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。

50

## 【0244】

一般に、治療薬の毒性プロファイ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、LD<sub>50</sub>は、試験集団の約50%が死亡する用量を示し、ED<sub>50</sub>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。LD<sub>50</sub>およびED<sub>50</sub>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IC<sub>50</sub>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ED<sub>50</sub>および/またはIC<sub>50</sub>とするが、LD<sub>50</sub>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。

10

## 【実施例1】

## 【0245】

## [1. 酵母2ハイブリッドシステム]

20

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。

## 【0246】

ベイトタンパク質HIV GAgp6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（Barterlら、Nat. Genet., 12, 72~77, 1996を参照のこと）の密接な誘導體である）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 trp1-9011eu2-3, 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。

30

## 【0247】

プレイブラリー（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；MAT trp1-9011eu2-3, 112ura3-52his3-200gal4 gal80 LYS2::GAL-HIS3 GAL2-ADE2 met2::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ー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、プレイブラリーからプレイ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

40

50

決定した。ベイト cDNA インサートの同一性を確認し、プレ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。

#### 【0248】

表 1 に示した HIV GAG p6 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 Ts g 101 プレイ配列を、表 1 にまとめる。ベイトおよびプレイタンパク質の GenBank 寄託番号も表 1 に示し、その際にベイト配列とプレイ配列を並べた。

#### 【実施例 2】

#### 【0249】

[ 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 GAG p6 および Ts g 101 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 Ts g 101 と HIV GAG p6 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、免役化マウスにおける抗原として使用する。免役化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。

#### 【0250】

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ボ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。

#### 【0251】

Ts g 101 - HIV GAG p6 複合体ならびに各 Ts g 101 および HIV GAG p6 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。Ts g 101 - HIV GAG p6 複合体に結合するが、各 Ts g 101 および HIV GAG p6 に結合しない scFv 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、Ts g 101 - HIV GAG p6 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、RIA および ELISA などの免役化学的方法によって評価する。

#### 【0252】

さらに、Ts g 101 - HIV GAG p6 複合体に結合し、Ts g 101 および / または HIV GAG p6 にも結合する scFv 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 scFv 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、Biotechniques, 23, 409, 1997 を参照のこと)、dNTP 類似体 (Zaccolloら、J. Mol. Biol., 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、Ts g 101 - HIV GAG p6 複合体に選択的に免疫反応性を示す scFv フラグメントを得ることができる。

10

20

30

40

50

## 【実施例3】

## 【0253】

[3. Tsg101 - HIV GAG p6 相互作用と HIV 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、Tsg101とHIV GAG p6との間の相互作用に及ぼすHIV GAG p6のPTAP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(Tsg101構築物)を調製するために、ヒト胎児脳cDNAライブラリーからPCRによってGenBank寄託番号U82130によるTsg101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GADpN2のEcoRI/PstI部位(LEU2、CEN4、ARS1、ADH1p-SV40NLS-GAL4(768-881)-MCS(多クローニング部位)-PGK1t、AmpR、ColE1\_\_ori)にクローン化する。

10

## 【0254】

酵母2ハイブリッドDNA結合ドメイン(HIV1GAG p6構築物)を調製するために、HIV1.NL43株GAGタンパク質由来のHIV1GAG p6ペプチドに対応するDNAフラグメントを、NL43含有プラスミドR9apaからPCRによって獲得し、結合ドメイン親プラスミドpGBT.QのEcoRI/SalI部位にクローン化した。

## 【0255】

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(HIV1GAG p6構築物)中のHIV1GAG p6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。

20

## 【0256】

## 【表2】

試験したGAG p6タンパク質の変異

変異構築物	PTAPモチーフ周辺のGAGp6ペプチド配列														
	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							

30

## 【0257】

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(ur3-52his3\*200ade2-101trp1-901leu2-3,112metgal4gal80URA3::GAL1p-lacZ)を、活性化ドメインTsg101構築物および結合ドメイン(変異GAG p6構築物)または結合ドメイン(野生型GAG p6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、GAG p6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。

40

## 【0258】

【表 3】

T s g 1 0 1 と G A G p 6 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					-

10

## 【 0 2 5 9 】

したがって、表 3 で明らかなように、H I V G A G p 6 の P T A P モチーフの変異により、T s g 1 0 1 と H I V G A G p 6 との間の相互作用が破壊される一方で、P T A P モチーフの外側の P 6 / E 6 G 変異により T s g 1 0 1 - G A G p 6 相互作用は排除されなかった。

## 【 0 2 6 0 】

T s g 1 0 1 と H I V 野生型 G A G p 6 ( W T ) または G A G p 6 P T A P 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 9 6 ウェルプレートの合成培地 ( - L e u 、 - T r p 、 + グルコース ) 中で一晩成長させ、光学密度を標準化し、6 x 溶解 / 基質溶液を含む 6 x Z 緩衝液 ( 6 0 m M の K C l 、 6 m M の M g S O <sub>4</sub> 、 3 6 0 m M の N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> 、 2 4 0 m M の N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> 、 6 m g / m l の C P R G 、 0 . 1 2 U / m l の リ ガ ー ゼ 、 0 . 0 7 5 % の N P - 4 0 ) の添加によって溶解した。培養物を、3 7 °C 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 ( 5 7 5 n m ) 。 2 ハイブリッド液体培養アッセイでの全長 T s g 1 0 1 結合野生型 p 6 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 3 0 0 倍超 ) が得られた。3 つの異なる p 6 点変異を使用して、T s g 1 0 1 結合相互作用が H I V - 1 p 6 内の P T A P 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 ( P 6 L 、 A 9 R 、 および P 1 0 L ) 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 H I V - 1 出芽を停止させる ( H u a n g ら、1 9 9 5 ) 。これらの結果は、H I V G A G p 6 と ヒト細胞タンパク質 T s g 1 0 1 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。

20

30

## 【実施例 4】

## 【 0 2 6 1 】

## [ 4 . インビトロ結合アッセイ ]

H I V - 1 G A G p 6 ドメインに融合した G S T 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 1 4 アミノ酸残基を含む G A G p 6 ペプチド ( 「 p 6 ( 1 - 1 4 ) 」 ) を、標準的なペプチド合成法によって化学合成した。ペプチドを、従来のタンパク質精製技術 ( 例えば、クロマトグラフィー ) によって精製した。

40

## 【 0 2 6 2 】

N u n c / N a l g e n e M a x i s o r p プレートを、精製 G S T - p 6 および 5 0 m M の炭酸塩 ( p H = 9 . 6 ) を含む 1 0 0 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、G S T - p 6 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 4 0 0 μ l / ウェルのブロッキング緩衝液 ( S u p e r B l o c k ; P i e c e - E n d o g e n 、 R o c k f o r d 、 I L ) で満たした。室温で 1 時間のインキュベーション後、ショウジョウバエ S 2 細胞溶解物 m y c タグ化 T s g 1 0 1 ( 残基 1 ~ 2 0 7 ) および所定量の p 6 ( 1 ~ 1 4 ) ペプ

50

チドを含む100 $\mu$ 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 $\mu$ lの1xPBST溶液(Invitrogen; Carlsbad, CA)で4回洗浄した。洗浄後、1 $\mu$ g/mlの抗myc-モノクローナル抗体(Clone9E10; Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN)を含む1xPBST溶液を100 $\mu$ 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 $\mu$ lの1xPBST溶液で4回洗浄し、100 $\mu$ lの1 $\mu$ 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1xPBST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 $\mu$ lの1xPBST溶液で4回洗浄し、100 $\mu$ lの蛍光基質(Quantable; Pierce-Endogen, Rockford, IL)を、全ウェルに添加した。30分後、100 $\mu$ 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325nmおよび発光波長420nm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、PX<sub>1</sub>PX<sub>2</sub>P含有短ペプチドがTsg101とHIVp6との間の相互作用を破壊することができることを示す。

10

## 【0263】

20

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】

## 【0264】

[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OD<sub>630</sub>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 $\mu$ 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各ウェルに添加して、-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。HIVp6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-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-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-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。

30

40

## 【0265】

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

50

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<sub>50</sub>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。

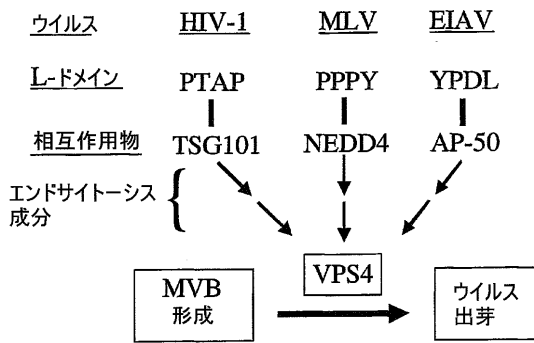
【0266】

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。

【0267】

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。

【図1】



【図2】

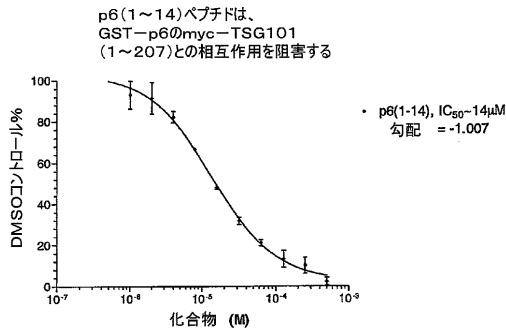


Figure 2

【図3】

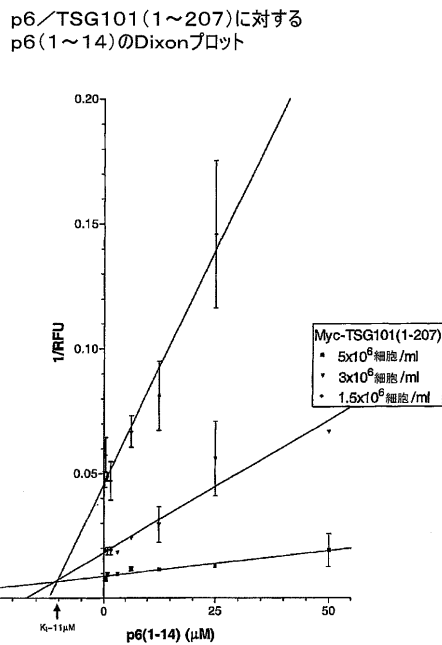


Figure 3

【 図 4 】

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

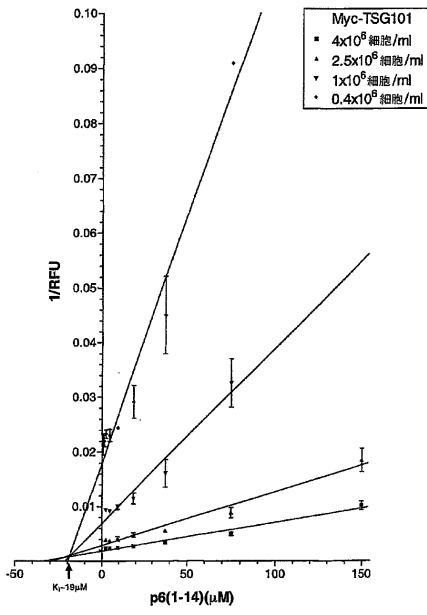


Figure 4

【 配 列 表 】

2009269918000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z

## 1. 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 BB14 BB51 DA36 FA11  
 4B024 AA01 AA13 BA32 BA51 CA01 GA11 HA01 HA15  
 4B065 AA97Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46  
 4H045 AA10 AA11 BA10 CA05 DA76 DA86 EA22 EA29 FA74

专利名称(译)	TSG 101-GAG交互及其使用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009269918A</a>	公开(公告)日	2009-11-19
申请号	JP2009140132	申请日	2009-06-11
[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	C07K14/155 C12N15/09 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K19/00 G01N33/15 G01N33/50 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/18 C07K14/16 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/10 C12Q1/02 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	C07K14/155.ZNA C12N15/00.A C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K19/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N15/10.P C12N15/10.Z C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB14 2G045/BB51 2G045/DA36 2G045/FA11 4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B065/AA97Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA05 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA29 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	JP2009269918A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

包含Tsg101和HIV GAG或GAGp6的分离蛋白复合物的用途。人类肿瘤易感基因101 (“Tsg101”)与HIV GAG p6相互作用。一种能够在筛选试验中调节Tsg101和单独由HIV GAG或GAGp6和Tsg101形成的蛋白质复合物的功能和活性，并调节Tsg101和含有Tsg101和HIV GAG或GAGp6的蛋白质复合物的化合物。已鉴定的化合物可用于抑制慢病毒生长(特别是HIV的生长)以及治疗HIV感染和艾滋病，蛋白质复合物可用于调节蛋白质复合物中Tsg101-HIV GAG或GAGp6的相互作用。它可以用于筛选测定中以选择有效的化合物。[选择图]图2

