

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-538285

(P2008-538285A)

(43) 公表日 平成20年10月23日(2008. 10. 23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-505607 (P2008-505607)
 (86) (22) 出願日 平成18年4月7日(2006. 4. 7)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年12月3日(2007. 12. 3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/013170
 (87) 国際公開番号 WO2006/110591
 (87) 国際公開日 平成18年10月19日(2006. 10. 19)
 (31) 優先権主張番号 60/669, 283
 (32) 優先日 平成17年4月7日(2005. 4. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

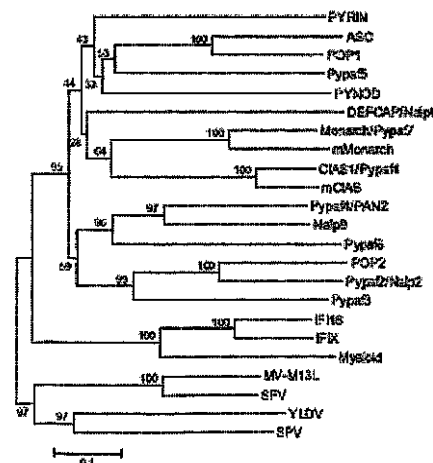
(71) 出願人 507333812
 ユニバーシティ・オブ・サウス・フロリダ
 アメリカ合衆国、フロリダ州 33621
 、タンパ、スウィート 100、スペクト
 ルム・ブルバード、3802
 (74) 代理人 100069556
 弁理士 江崎 光史
 (74) 代理人 100093919
 弁理士 奥村 義道
 (74) 代理人 100111486
 弁理士 鍛冶澤 實
 (72) 発明者 ハートン・ジョナサン・エイ
 アメリカ合衆国、フロリダ州 33647
 、タンパ、ホールステッド・ウェイ、49
 09

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 POP2 NFκB阻害ポリペプチド、核酸および使用方法

(57) 【要約】

本発明は新規のpyrin-only蛋白質 (POP2)、ポリペプチド、これらをコードする核酸、およびこれらを製造および使用する方法を提供する。本発明のポリペプチドは核因子κB (NF-κB) 調節活性を有する。NF-κBは、細胞周期制御、サイトカインおよび接着分子遺伝子のトランス活性化に重要であり、多くの癌、神経変性障害において異常な制御がなされている。Pyrinおよび/またはカスペーゼリクルートメント (CARD) ドメインを有する蛋白質は、アポトーシス、先天性免疫および炎症において役割を果たす。多くのpyrinドメイン蛋白質は、NF-κB活性を調節し、核周辺の「アポトーティックスペック」およびプロIL1β / IL-18転換インフラマソーム複合体の両方の集合に参加する。「Pyrin-only」蛋白質は、pyrinドメインが仲介する機能の負のレギュレーターとして魅力的であり、そのような蛋白質のうちの1つとしてPOP1が報告されてきた。本発明者は、第二のPyrin-only蛋白質 (POP2) を示すものである。POP2は、97アミノ酸蛋白質をコードし、ヒト3番染色体に位置する294ntの単一エクソン遺伝子であり、その他のpyrinドメインと構造的類



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含み、NFκB阻害活性を有する少なくとも1種のポリペプチドをコードする、単離または組み換え核酸。

【請求項 2】

第二の核酸分子を同定するための、配列番号1に記載される配列のうちの少なくとも10個の連続する塩基を有する第一の核酸分子であって、第二の核酸分子がNFκB阻害活性を有するポリペプチドをコードし、そして、第一の核酸分子による結合またはハイブリダイゼーションによって第二の核酸分子が同定される、前記の第一の核酸分子。

【請求項 3】

配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸を含む発現カセット。

【請求項 4】

配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸を含むベクター。

【請求項 5】

請求項4記載のベクターを含む形質転換細胞。

【請求項 6】

細胞が細菌性細胞、哺乳類細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または植物細胞である、請求項5記載の形質転換細胞。

【請求項 7】

配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列と相補的であるか、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項7記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に投与するか、または細胞中に発現させることを含む、細胞中においてNFκB活性を誘導する方法。

【請求項 9】

配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列と相補的であるか、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含む、二本鎖RNAオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

二本鎖RNA分子、または二本鎖形態に折りたたまれると予測される分子、またはハイブリダイズすることにより二本鎖RNA分子を形成できる2本の相補的なRNA分子を細胞に投与するか、または細胞中に発現させることを含む、細胞におけるメッセージのRNA干渉による分解を誘導する方法であって、二本鎖RNA分子が、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列と相補的であるか、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含む、前記の誘導方法。

【請求項 11】

(i) 配列番号2と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または(ii) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含み、NFκB阻害活性を有する単離または組み換えポリペプチド。

【請求項 12】

請求項11記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離または組み換え抗体。

【請求項 13】

請求項12記載の抗体を含むハイブリドーマ。

【請求項 14】

細胞を請求項11記載のポリペプチドまたはその断片に接触させる段階を含む、細胞中におけるNFκB活性を阻害するための方法。

【請求項 15】

NFκB阻害を有するポリペプチドを同定する方法であって、以下：請求項11記載のポリペ

10

20

30

40

50

プチドまたはその断片を、レポーター遺伝子に動作可能に連結したNFκB応答性プロモーターを含む構造体に接触させること、および産生されたレポーター遺伝子産物の量を検出することを含み、レポーター遺伝子産物量の減少によって、NFκB阻害活性を有するポリペプチドが同定される、前記の同定方法。

【請求項 16】

NFκB阻害活性のモジュレーターを同定する方法であって、以下：請求項11記載のポリペプチドまたはその断片を試験化合物に接触させること、およびNFκB阻害ポリペプチドの活性を測定することを含み、試験化合物の非存在下におけるNFκB阻害活性と比較した場合の、試験化合物の存在下で測定されるNFκB阻害活性の変化によって、試験化合物がNFκB阻害ポリペプチドの活性を調節すると判定される、前記の同定方法。

10

【請求項 17】

NFκB阻害ポリペプチドの存在下において多量体化するかまたは特異的に会合する2個またはそれ以上の分子を提供することをさらに含み、NFκB阻害活性が分子の多量体化または特異的会合の量の増加または減少を検出することによって測定される、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

NFκBの活性をダウンレギュレートすることができるポリペプチドを同定する方法であって、以下：請求項11記載のポリペプチドまたはその断片を、NFκBの活性化状態により測定される活性を有するレポーター遺伝子に接触させること、およびレポーター遺伝子活性の増加を検出することを含み、レポーター遺伝子活性量の増加により、NFκBの活性をアップレギュレートすることができるポリペプチドが同定される、前記の同定方法。

20

【請求項 19】

NFκB阻害ポリペプチドの機能的断片を決定する方法であって、以下：請求項11記載のポリペプチドから複数のアミノ酸残基を欠失させることによりそのサブ配列を作製すること、およびNFκB阻害活性に関してサブ配列の試験を行い、それによってNFκB阻害ポリペプチドの機能的断片を決定することを含む、前記の決定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2005年4月7日に出願され、「POP2: A Biological Inhibitor of NF Kappa B」として現在係属中の米国特許仮出願60/669,283に基づく優先権を主張するものである。

30

【0002】

本発明は、細胞増殖、細胞死およびサイトカインの産生を含む生物学的過程のレギュレーターに関する。より具体的には、本発明はNF-κBの阻害効果を有する新規のPyrin-only蛋白質（POP2）に関する。

【背景技術】

【0003】

NF-κBの活性化は、サイトカインおよび接着分子の発現、細胞周期制御および細胞増殖を含む多数の細胞過程を制御している。従って、炎症性疾患、自己免疫および癌では構成的または過剰なNF-κB活性が観察される。特に、活性なNF-κBは、炎症性、自己反応性または癌性細胞の蓄積の一因となり得るアポトーシスからも保護している。

40

【0004】

この10年の間には、NF-κBシグナルおよびアポトーシス誘導と関連する分子メカニズム、シグナル経路、およびデスドメインフォールド（death domain fold: DDF）を含有する蛋白質の生理学的な役割を理解するために、広範囲にわたる研究が行われてきた。4つの関連する蛋白質-蛋白質相互作用ドメイン：デスドメイン（DD）；デスエフェクタードメイン（DED）；カスパーゼリクルートメントドメイン（CARD）およびpyrinドメイン（PYD）、がDDFスーパーファミリーを含んでいる。これらのドメインは、類似の三次構造、すなわちホモ型の相互作用モジュールとして機能する可能性の高い5~6個のα-ヘリックスバンドルを共有している。このタイプのシグナルアダプターとしてのおよび細胞内複合体

50

ドメインへの蛋白質のリクルーターとしての作用は、アポトーシスの促進および制御、先天性免疫ならびに癌の進行に参加するものである。

【 0 0 0 5 】

Pyrinモチーフは通常、マルチドメイン蛋白質のN末端において見られる。ファミリーの当初からのメンバーであるPyrin (マレノストリン) は、散発的な発熱、ならびに激しい腹部、関節および胸の痛みを特徴とする常染色体劣性疾患である家族性地中海熱 (FMF) に関連する。Pyrinは、PYDに続いて、それぞれアダプターおよびリガンド結合ユニットとして機能すると考えられるB-ボックスジンクフィンガーおよびSPRYドメインを含有する。血液核蛋白質のHIN-200ファミリーをコードし、蛋白質 / 蛋白質相互作用を仲介すると考えられる200-amino-acidドメインのコピーを1個または2個含有するインターフェロン誘導 (IFI) 遺伝子は、PYDの後に存在する。細胞増殖および分化の制御におけるHIN-200蛋白質の役割を支持する証拠が既に示されている。ASC、すなわち、Apoptosis speck protein containing a CARD (TMS1/Pycard) のpyrinドメインの後はCARDドメインが続く。ASCは、両ドメインによるホモ型の相互作用を通してPYD-またはCARD含有蛋白質と会合する。プロアポトーシスの細胞においては、ASCはPYD含有蛋白質との相互作用により、大きな多量体である核周辺複合体中または「スペック」中に集合する。これらの相互作用の生理学的な意義およびスペック構造の意義自体については未だ不明なままである。ASCはまた、プロIL-1 β を成熟形態にさせるインフラマソーム複合体の形成に参加し、炎症の間に好中球においてアップレギュレートされる。細胞内病原体認識ユニットとして機能する脊椎動物の免疫において重要な役割を果たすと考えられる、最近発見されたCATERPILLER (CLR) 遺伝子ファミリーの21個のメンバーのうち3分の2が、PYD、それに続くヌクレオチド結合ドメイン (NBD) およびロイシンリッチ反復ドメイン (LRR) をコードしている。CLR蛋白質は、進行中の炎症反応のモジュレーターとして、およびアポトーシスのインデューサーとして考えられている。PYPAF5、MonarchおよびCIAS1を含むCLRファミリーの一部のPYD含有蛋白質は、ASCと共同して、NF- κ B活性化を誘導することが報告されている。予想されるように、炎症反応性症候群、家族性寒冷蕁麻疹、Muckle-WellsおよびCINCA症候群 (chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome) に関連するCIAS1/NALP3中の突然変異は、ASC依存的なNF- κ B活性化能力の増加を示した。その他のCLR、例えばPAN2/PYPAF4は、NF- κ Bの抑制を仲介する。CIAS1のNBD/LRRはNF- κ Bの核内輸送を阻害するが、PAN2/PYPAF4のpyrinドメインは、IKK複合体を通して仲介され得るNF- κ Bの機能を阻害する。

10

20

30

【 0 0 0 6 】

転写因子のNF- κ Bファミリーは、哺乳類において、細胞質ゾル中のI κ B阻害複合体と結合するホモ二量体またはヘテロ二量体として存在する5つのメンバー：p65 (Rel A)、Rel B、c-Rel、p50/p105およびp52/p100、からなる。TNF- α またはLPSのような炎症性刺激による誘導において、I κ B α がI κ Bキナーゼ (IKK) 複合体によってリン酸化され、ユビキチン化され、そして26Sプロテアソームによって分解される。この過程は、NF- κ Bの核局在化配列の覆いを外し、核への移行を引き起こす。同種のDNA応答エレメントへのNF- κ Bの結合が、多くのサイトカインおよび増殖因子 (例えば、IL-2、IL-8、IFN- β 、M-CSF、G-CSF、VEGF)、ならびに種々の転写因子およびシグナルレギュレーター (例えば、I κ B α 、IRF-1、IRF-2) の転写を誘導する。免疫応答を調節する生物学的過程におけるNF- κ Bの重要な役割は、局在化およびそれに続く活性化が厳格に制御されるべきであることを示唆するものである。これらの事象の制御異常は、癌、神経変性障害、関節炎および慢性炎症を含む、多くのヒト疾患に関連する異常な遺伝子発現を引き起こすものである。

40

【 0 0 0 7 】

単独のpyrinドメインは、pyrinドメイン相互作用を妨げ、スペックおよび/またはインフラマソーム複合体の形成ならびに下流の効果を遮断する可能性がある。ヒトゲノムおよびボックスウイルスゲノムにおいて、専らPYDからなる遺伝子が最近同定された。Pyrin-only protein (POP1) はASCに近接した遺伝子によりコードされており、これは、Pop1が古代の遺伝子重複事象により生じた可能性を示唆している。POP1は、主に免疫組織中に発現

50

しており、そこでNF- κ B活性化を阻害し、そして驚くべきことにカスパーゼ-1活性化を増強すると考えられる。Pyrin-only蛋白質をコードするその他の遺伝子は、カプリボックスウイルス (Capripoxviridae)、レポリボックスウイルス (Leporipoxviridae)、スイボックスウイルス (Suipoxviridae) およびヤタボックスウイルス (Yatapoxviridae) のゲノムにおいて発見されている。最近、Johnston等によって、粘液腫ウイルスからのM13L-PYD (Pyrin-only蛋白質) がNF- κ B活性およびカスパーゼ-1依存的なIL-1 β 産生の両方を阻害し、M13Lの欠失がインビボでのウイルス複製阻害に十分であることが報告された (非特許文献1)。従って、PYDは、宿主免疫のサプレッサーとして積極的な役割を有する。NF- κ Bのシグナル経路を調節することが、このような抑制に関するメカニズムの1つとして考えられる。

10

【非特許文献1】 Johnston, J. B., et al. A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity* 23:587

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

ヒトゲノムの完了およびその他の種のゲノムの塩基配列決定により、新規の遺伝子が発見し、新しい遺伝子ファミリーが同定されている。最近発表されたCLRファミリーには、先天性および後天性免疫の両方において役割を有するPYD蛋白質が含まれている。本発明者はこの遺伝子ファミリーに関心を有しており、新しいPYDコード遺伝子の同定を図ったものである。

20

【0009】

< 本発明の概要 >

97個のアミノ酸を含み、POP2と名付けられた新規なヒトPyrin-only蛋白質について説明する。POP2は、3番染色体上の単独のエキソン遺伝子によってコードされ、末梢血白血球において発現している。本発明者により、POP2がTNF α によってまたはp65 NF- κ Bの細胞内再分布に関連するp65のトランスフェクションによって活性化されるNF- κ B (RelA) を阻害することが実証される。さらに、POP2は核周辺スペック構造においてASCと会合し、CIAS1/NALP3およびASCからなるスペックを阻害する。まとめると、これらの結果はNF- κ Bシグナル経路の負のレギュレーターとしてのPOP2の重要な役割を示唆するものであり、CIAS1

30

依存的な炎症反応の制御メカニズムを提唱するものである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、Pyrin-only蛋白質 (POP2)、ポリペプチド、これらをコードする核酸、およびこれらを製造および使用方法を提供する。1つの態様において、本発明のポリペプチドはNF κ B阻害活性を有する。本発明はまた、本発明の核酸またはポリペプチドを含む医薬組成物も提供する。

【0011】

1つの態様において、本発明は、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む単離または組み換え核酸であって、NF κ B阻害活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする前記の核酸を提供する。

40

【0012】

本発明は、配列番号1と少なくとも約50残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む単離または組み換え核酸であって、NF κ B阻害活性を有する少なくとも1つのポリペプチドをコードする前記の核酸を提供する。配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる解析によって、または目視での確認によって決定することができる。

【0013】

別の態様において、単離または組み換え核酸は、配列番号1と少なくとも約50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300またはそれ以上の

50

残基の領域にわたって少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有する核酸配列を含む。1つの態様において、単離または組み換え核酸は配列番号1に記載の配列を有する。

【0014】

別の態様において、本発明は、第二の核酸分子を同定するための、配列番号1に記載される配列のうちの少なくとも10個の連続する塩基を有する第一の核酸分子であって、第二の核酸分子がNFκB阻害活性を有するポリペプチドをコードし、そして、第一の核酸分子による結合またはハイブリダイゼーションによって第二の核酸分子が同定される、前記の第一の核酸分子を提供する。

【0015】

本発明は、NFκB阻害活性を有するポリペプチドをコードする核酸またはPOP2遺伝子またはそのバリエーションを同定するための核酸プローブであって、配列番号1で示される配列のうちの少なくとも10個の連続した塩基を含み、結合またはハイブリダイゼーションによって核酸を同定する、前記のプローブを提供する。該プローブは、好ましくは少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25個の連続した塩基を含む。本発明は、NFκB阻害活性を有するポリペプチドをコードする核酸またはPOP2遺伝子またはそのバリエーションを同定するための核酸プローブであって、配列番号1と少なくとも約50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300またはそれ以上の残基の領域にわたって少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有する核酸配列を含む、前記の核酸プローブを提供する。配列同一性は配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定することができる。別の態様において、プローブは、配列番号1に記載される配列のうちの少なくとも約10～50、約20～60、約30～70、約40～80または約60～100個の連続した塩基を含むオリゴヌクレオチドを含有する。プローブは、好ましくは少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25個の連続した塩基を含む。別の態様において、プローブの長さは30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、200、250、300またはそれ以上の残基である。1つの態様において、プローブは配列番号1に記載される配列のサブセットである。

【0016】

本発明は、本発明の核酸、例えば、NFκB阻害活性を有するポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマー配列ペアを提供する。該プライマーペアは、配列番号1に記載される核酸配列を増幅することができる。1つの態様において、増幅プライマー配列ペアの各メンバーは、少なくとも約10～50個の連続した塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドを含有する。

【0017】

本発明は、配列番号1に記載される核酸配列を増幅することができる増幅プライマー配列ペアを用いて、鋳型の核酸を増幅することを含む、NFκB阻害活性を有するポリペプチドをコードする核酸またはPOP2遺伝子またはそのバリエーションを増幅する方法を提供する。

【0018】

別の態様において、本発明は、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸を含有する、発現カセット、ベクターまたは形質転換された細胞を提供する。該形質転換された細胞は、細菌性細胞、哺乳類細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または植物細胞でよい。本発明はさらに、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含むクローニングベクターを提供する。核酸配列は、組み換えウイルス、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体内に含まれていてもよい。

【0019】

本発明は、本発明の核酸、例えば、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、配列同一性が、配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される前記の核酸配列、あ

10

20

30

40

50

るいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補体とハイブリダイズする核酸、を含む発現カセットを提供する。

【0020】

本発明は、本発明の核酸、例えば、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される前記の核酸配列、あるいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補体とハイブリダイズする核酸、を含むベクターを提供する。

【0021】

本発明は、二本鎖RNA分子が生成されるように転写制御エレメントに動作可能に連結された本発明の核酸、例えば、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有し、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される核酸、あるいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補体とハイブリダイズする核酸、を含むベクター系であって、二本鎖RNA分子が、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有し、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される核酸配列と相補的であるか、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができ、あるいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補体とハイブリダイズする核酸である、前記のベクター系を提供する。1つの態様において、当該ベクター系および転写制御エレメントによって細胞内二本鎖RNA分子が生成する。

【0022】

本発明は、本発明の核酸、例えば、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、配列同一性が、配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される前記の核酸配列、あるいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補体とハイブリダイズする核酸、を含むクローニングベクターを提供する。1つの態様において、該クローニングベクターは、組み換えウイルス、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージまたは人工染色体を含む。該ウイルスは、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターを含むことができる。該クローニングベクターは、大腸菌人工染色体 (BAC)、プラスミド、バクテリオファージP1由来ベクター (PAC)、酵母人工染色体 (YAC)、哺乳類人工染色体 (MAC) を含むことができる。

【0023】

本発明は、ベクターを含む形質転換された細胞を提供し、前記ベクターは、本発明の核酸、例えば、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される前記の核酸配列、あるいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補体とハイブリダイズする核酸、を含む。別の態様において、前記細胞は細菌性細胞、哺乳類細胞、真菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または植物細胞である。

【0024】

別の態様において、本発明は、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列と相補的であるかまたはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、および、このアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて細胞中のNFκBを阻害する方法を提供する。

【0025】

本発明は、本発明の核酸、例えば、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって

10

20

30

40

50

少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される前記の核酸配列と相補的であるかまたはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列、あるいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補配列とハイブリダイズする核酸、を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約10～50、約20～60、約30～70、約40～80または約60～100塩基の長さでよい。

【0026】

本発明は、本発明の核酸、例えば、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される前記の核酸配列と相補的であるかまたはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列、あるいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補配列とハイブリダイズする核酸、を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に投与するか、または細胞中に発現させることを含む、細胞中のNFκB活性を阻害する方法を提供する。

【0027】

別の態様において、本発明は、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列と相補的であるかまたはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含む、二本鎖RNAオリゴヌクレオチドを提供する。本発明はさらに、二本鎖RNA分子、または二本鎖形態に折りたたまれると予測される分子、またはハイブリダイズすることにより二本鎖RNA分子を形成できる2本の相補的なRNA分子を細胞に投与するか、または細胞中に発現させることを含む、細胞におけるメッセージのRNA干渉による分解を誘導する方法であって、二本鎖RNAが、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列と相補的であるか、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列を含む、前記の誘導方法を提供する。

【0028】

本発明は、本発明の核酸、例えば、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される前記の核酸配列と相補的であるかまたはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列、あるいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補配列とハイブリダイズする核酸、を含む二本鎖RNAオリゴヌクレオチドを提供する。二本鎖RNAオリゴヌクレオチドは、約10～50、約20～60、約30～70、約40～80または約60～100塩基の長さでよい。

【0029】

本発明は、二本鎖RNA分子、または二本鎖形態に折りたたまれると予測される分子、またはハイブリダイズすることにより二本鎖RNA分子を形成できる2本の相補的なRNA分子を細胞に投与するか、細胞中に発現させることを含む、細胞におけるメッセージのRNA干渉による分解を誘導する方法であって、二本鎖RNA分子が、本発明の核酸、例えば、配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される前記の核酸配列と相補的であるかまたはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる核酸配列、あるいは、ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸配列もしくはそのサブ配列またはこれらのいずれかの相補配列とハイブリダイズする核酸、を含む前記の誘導方法を提供する。

【0030】

別の態様において、本発明は、(i) 配列番号2と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(ii) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む核酸によりコードされるアミノ酸配列、を含み、NFκB阻害活性を有する単離または組み換

10

20

30

40

50

えポリペプチドを提供する。

【0031】

本発明は、配列番号2と少なくとも約30、40、50、60、70、80、90またはそれ以上の残基の領域にわたって少なくとも95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離または組み換えポリペプチドまたは完全長のポリペプチド、あるいは、本発明の核酸、例えば以下の配列：

(i) 配列番号1と少なくとも約100残基の領域にわたって少なくとも90%の配列同一性を有し、配列同一性が配列比較アルゴリズムを用いる解析によってまたは目視での確認によって決定される配列、または

(ii) ストリンジェントな条件下で配列番号1に記載の核酸またはその相補体とハイブリダイズする配列、

を含む核酸によってコードされるポリペプチドを提供する。

【0032】

1つの態様において、ポリペプチドはNFκB阻害活性を有する。本発明は、細胞を本発明のポリペプチドまたはその断片と接触させる段階を含む、細胞中におけるNFκB阻害を活性する方法を提供する。

【0033】

本発明は、本発明の固定化されたポリペプチドを提供する。1つの態様において、ポリペプチドはNFκB阻害活性を有し、前記のポリペプチドは本発明の配列を含む。1つの態様において、ポリペプチドは本発明の抗体を含む。ポリペプチドは細胞、金属、樹脂、ポリマー、セラミック、ガラス、微小電極、黒鉛粒子、ビーズ、ゲル、プレートまたはキャピラリーチューブ上に固定化することができる。

【0034】

本発明は、固定化された本発明のポリペプチド、例えば、本発明の抗体または本発明のPOP2ポリペプチドを含むアレイを提供する。本発明は、固定化された本発明の核酸を含むアレイを提供する。

【0035】

本発明は、本発明のポリペプチドに特異的に結合する、単離または組み換え抗体を提供する。抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体であってもよい。本発明は、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を含むハイブリドーマを提供する。

【0036】

本発明は、以下の段階：

(a) プロモーターに動作可能に連結した核酸を提供すること（該核酸は本発明の配列を含む）；および

(b) ポリペプチドが発現し、従って組み換えポリペプチドが産生される条件下で、段階(a)の核酸を発現させること、

を含む、組み換えポリペプチドの製造方法を提供する。さらに、前記方法は、宿主を段階(a)の核酸で形質転換し、段階(a)の核酸を発現させ、それによって組み換えポリペプチドを形質転換させた細胞中に産生させることを含むことができる。

【0037】

別の態様において、本発明は、NFκB阻害活性を有するポリペプチドの同定方法を提供する。この方法は、本発明のポリペプチドまたはその断片を、NFκB阻害ポリペプチドの存在下で多量体化するかまたは特異的に会合する2個またはそれ以上の分子と接触させること；および、前記分子の多量体化または特異的な会合を検出することを含み、前記の分子の多量体化または特異的な会合により、NFκB阻害活性を有するとしてポリペプチドが同定される。

【0038】

別の態様において、本発明は、NFκB阻害活性を有するポリペプチドを同定するための別の方法を提供する。この方法は、本発明のポリペプチドまたはその断片を、レポーター遺伝子に動作可能に連結されたNFκB応答プロモーターを含む構造体と接触させること；およ

10

20

30

40

50

び產生されたレポーター遺伝子産物の量を検出することを含み、前記レポーター遺伝子産物の量の減少により、NFκB阻害活性を有するとしてポリペプチドが同定される。

【0039】

本発明は、以下の段階：

(a) 本発明のポリペプチドまたは本発明の核酸によりコードされるポリペプチドを提供すること；

(b) レポーター遺伝子と動作可能に連結されたNFκB応答プロモーターを含む構造体を提供すること；および

(c) 段階(a)のポリペプチドを段階(b)の構造体を接触させ、產生されたレポーター遺伝子産物の量を検出すること、

を含む、NFκB阻害活性を有するポリペプチドを同定する方法を提供し、産物の減少量により、NFκB阻害活性を有するとしてポリペプチドが同定される。1つの態様において、產生されたレポーター遺伝子産物量の検出には、レポーター遺伝子転写量、レポーター遺伝子によりコードされるポリペプチドの量の検出、または、レポーター遺伝子が酵素をコードする場合には酵素の生成物または基質の量の検出が含まれる。

【0040】

別の態様において、本発明は、試験化合物が本発明のポリペプチドまたはその断片に特異的に結合するかどうかを測定する方法を提供する。この方法には、ポリペプチドまたはその断片を試験化合物と接触させること；および該試験化合物がポリペプチドに特異的に結合するかどうかを測定し、それによって、試験化合物がポリペプチドに特異的に結合するかどうかを決定することが含まれる。

【0041】

別の態様において、本発明は、NFκB阻害活性のモジュレーターを同定する方法を提供する。この方法は、本発明のポリペプチドまたはその断片を試験化合物と接触させること；およびNFκB阻害ポリペプチドの活性を測定することを含み、試験化合物の非存在下におけるNFκB阻害活性と比較した場合の、試験化合物の存在下で測定されるNFκB阻害活性の変化によって、該試験化合物がNFκB阻害ポリペプチドの活性を調節すると判定される。この方法はさらに、NFκB阻害ポリペプチドの存在下で多量体化するかまたは特異的に会合する2個またはそれ以上の分子を含むことができ、分子の多量体化または特異的会合の量の増加または減少を検出することによってNFκB阻害活性が測定される。

【0042】

前記の方法はさらに、NFκB阻害ポリペプチドの存在下で多量体化するかまたは特異的に会合する分子を含むことができ、NFκB阻害活性は分子の多量体化または特異的会合の量の増加または減少を検出することによって測定される。1つの態様において、試験化合物なしでの多量体化または特異的会合の量と比較した場合の、試験化合物を用いた多量体化または特異的会合の量の減少によって、試験化合物がNFκB阻害ポリペプチド活性の阻害剤として同定される。試験化合物なしでの多量体化または特異的会合の量と比較した場合の、試験化合物を用いた多量体化または特異的会合の量の増加によって、試験化合物がNFκB阻害ポリペプチド活性のアクチベーターとして同定される。

【0043】

1つの態様において、試験化合物は小分子を含む。試験化合物はRNAを含むことができる。RNAは、低分子干渉RNA(sirRNA)またはアンチセンスRNAを含むことができる。

【0044】

本発明はさらに、NFκBの活性をダウンレギュレートさせることができるポリペプチドの同定方法であって、以下：本発明のポリペプチドまたはその断片を、NFκBの活性状態により決定される活性を有するレポーター遺伝子と接触させること；およびレポーター遺伝子活性の減少を検出すること、

を含む、前記の同定方法を提供し、レポーター遺伝子活性の量の減少により、NFκBの活性をダウンレギュレートすることができるポリペプチドが同定される。1つの態様において、レポーター遺伝子活性の量の検出には、レポーター遺伝子転写量、レポーター遺伝子に

10

20

30

40

50

よりコードされるポリペプチドの量の検出、または、レポーター遺伝子が酵素をコードする場合には酵素の生成物または基質の量の検出が含まれる。

【0045】

本発明はさらに、NFκB阻害ポリペプチドの機能的断片を決定する方法を含む。この方法には、本発明のポリペプチドから複数個のアミノ酸残基を欠失させ、そのサブ配列を作成すること、および、NFκB阻害活性に関してそのサブ配列の試験を行い、それによってNFκB阻害ポリペプチドの機能的断片を決定することを含む。

【0046】

本発明はさらに、癌、神経変性障害、関節炎または慢性炎症を治療する方法であって、(i) 配列番号2と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(ii) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む核酸によりコードされるアミノ酸配列を含む化合物を投与することを含む、前記の治療方法を提供する。

10

【0047】

本発明はさらに、癌、神経変性障害、関節炎または慢性炎症を治療する方法であって、(i) 配列番号2と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または(ii) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む核酸によりコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合するか、または前記ポリペプチドを調節する化合物を投与することによってNFκB阻害活性を有するポリペプチドを調節することを含み、前記ポリペプチドがNFκB阻害活性を有する、前記の治療方法を提供する。

【0048】

20

本発明の1つまたはそれ以上の態様の詳細を以下の図および記載において説明する。本発明のその他の特徴、目的および利点は、明細書および図および特許請求の範囲から理解されるだろう。

【0049】

ここで引用される全ての刊行物、特許、特許出願およびGenBank配列は、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0050】

< 図面の簡単な説明 >

本発明のさらなる理解のために、以下の詳細な説明と図によって本発明をさらに説明する。

30

【0051】

図1は、POP2の位置を示すヒト3番染色体の図である。POP2はヒト3番染色体上でコードされる(3q28)。

【0052】

図2は、POP2を含むコンティグNT_152138の一部分のダイアグラムであって、C3orf6、POP2およびFgf12の相対位置を黒色のボックスで示し、距離はおよそであり、矢印は転写の方向を表す。

【0053】

図3は、POP2のcDNAおよび蛋白質配列を示す。3'非翻訳領域(3'UTR)の配列はポリアデニル化シグナル配列(実線)のまま示す。

40

【0054】

図4は、ヒト、マウスまたはウイルス蛋白質由来の22のpyrinドメインを有するPOP2蛋白質配列のアライメントである。100アミノ酸より長い配列については省略した。陰付きは、アライメントを行った配列の50%以上において、特定の位置で保存されている(同一(黒)または機能的に類似(グレー))ことを表す。太字の数字(POP2に対する)は、オリゴマー化に寄与することが示されている保存残基の位置(残基11、15、18、43、68および84)、またはpyrinドメインに特有の保存された塩基性パッチの位置(XLKKFK; 残基22~27)を表す。本文中にない略語: MV(粘液腫ウイルス)、YLDV(ヤバ様疾患ウイルス: yaba-like disease virus)、SPV(豚痘ウイルス)、SFV(シヨープ線維腫ウイルス)

50

【 0 0 5 5 】

図5は、ASC（上のパネル）またはNALP1（下のパネル）pyrinドメインに基づくPOP2構造予測の骨格構造ダイアグラムを示す。構造は、POP2の一次配列から、インペリアル・カレッジ・ロンドン（Imperial College of Science, Technology, and Medicine、ロンドン）（www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/index2.html）における3D-PSSMアルゴリズムを用いて作製した。両構造は、高信頼性モデルである（>90%）。Nはアミノ末端を表す。Cはカルボキシ末端を表す。

【 0 0 5 6 】

図6は、POP2蛋白質および図4に示されるpyrin配列間の系統関係を示す。数字は、クラスター化された配列間の近縁度を反映したブートストラップ値（1000回の複製における%）を表す。ウイルスのpyrin蛋白質は外群としてクラスター化される。

10

【 0 0 5 7 】

図7は、POP2の発現を示す。（A）示したヒト細胞株から、DNase処理を行ったトータルRNAを調製し、POP2特異的プライマーを用いるRT-PCRに付した。GAPDH特異的プライマーで増幅したコントロールを示す。（B）POP2およびGAPDH cDNAを正常組織のパネルから増幅させた。K562 cDNAをポジティブコントロールとして示す。鋳型cDNAを用いない増幅をネガティブコントロールとして使用した。（C）ヒト血液フラクションパネルからのPOP2およびGAPDH cDNAをBのように増幅した。（D）HEK293細胞を1 μ gのMycタグ付きASC（コントロール）またはPOP2（表示されるレーン）を用いて一過性にトランスフェクトし、抗Myc抗体およびヤギ抗マウスHRPでイムノプロットを行った。

20

【 0 0 5 8 】

図8は、核および細胞質画分両方へのPOP2の局在化を示す。（A）～（D）COS-7細胞を2 μ g FLAGタグ付きPOP2でトランスフェクトし、抗FLAG(M5)およびヤギ抗マウスFITCを用いる蛍光顕微鏡法により可視化した。A、CおよびDは代表的な領域を示す。Bは、AのDAPI対比染色図である。（E）示されるような染色パターンを有する細胞の割合を定量化するために、2回の独立したトランスフェクションにより得られた100個以上の細胞（POP2⁺）を測定した。「細胞質」には、限定的な細胞質の染色、または核および細胞質が組み合わせて染色された細胞が含まれる。「核」には、核POP2が主に見られる細胞のみが含まれる。

【 0 0 5 9 】

図9は、TNF- α 誘導性および外因性p65誘導性NF- κ B活性のPOP2による阻害を示す。（A）～（C）はHEK-293T（A）HeLa（B）およびCOS-7（C）であり、細胞を1 μ g pcDNA3または1 μ g POP2のいずれかで一過性にトランスフェクトし、p65（0.1 μ g）でコトランスフェクトするか、または24時間後にTNF- α （10 ng/ml；30分）で処理した。NF- κ B-Lucレポーターの活性化を測定した（相対的な活性化倍率（pcDNA3コントロールに対する）+/-SEM、代表的な3回の実験による）。（E）COS-7細胞をpcDNA3または100 ng NF- κ B-p65のいずれかで一過性にトランスフェクトし、POP2の増加量（全DNA= 1.1 μ g）およびNF- κ B-Lucレポーターの活性化を測定した（pcDNA3に対する活性化倍率+/-SEM、代表的な3回の同一実験による）。（C）HEK-293細胞のPOP2（1 μ g）でのトランスフェクションは、CMVプロモーター駆動性pGL3コントロールルシフェラーゼレポーターを阻害しない。

30

【 0 0 6 0 】

図10は、核周辺スペックにおけるPOP2のASCとの共局在化を示す。HeLa細胞を一過性にGFP-POP2もしくはMyc-ASCのいずれか、または両方を用いてトランスフェクトし、48時間で固定し、マウス抗Myc抗体を用いて染色した。局在化をヤギ抗マウスIgG PE標識二次抗体を用いる間接免疫蛍光法により測定した。核をDAPI対比染色により検出した。

40

【 0 0 6 1 】

図11は、NF- κ B核局在化におけるPOP2の影響を示す。（A）HeLa細胞を1 μ gのGFP-POP2で一過性にトランスフェクトし、TNF α （20 ng/ml）で30分間処理した。細胞をその後固定し、ウサギ抗ヒトNF- κ B-p65およびヤギ抗ウサギIgG-PEを用いて染色した。GFP-POP2、NF- κ B-p65およびDNA（DAPI）を検出するために蛍光顕微鏡法を実施した。（C）p65の局在化を、ほとんどが核（NまたはNuc.）、核および細胞質（N/CまたはNuc./Cyto.）および

50

ほとんどが細胞質（CまたはCyto.）として数えた。データは、代表的な2回の類似の実験による。

【0062】

図12は、CIAS1:ASCスベック形成のPOP2による遮断を示す。HeLa細胞をMyc-ASC単独で、またはCIAS1-PYDもしくはCIAS-PYDおよびGFP-POP2と一緒に、一過性にトランスフェクトした。細胞を抗Mycおよびヤギ抗マウスIgG-PEで染色した。全部で3回のトランスフェクションの各条件において、500個を超えるASCポジティブ細胞を計測した。各条件下でのASC発現細胞含有スベックの平均パーセンテージを+/-SEMで示す。ASC単独の発現ではスベック.Nは生じない。

【0063】

< 好ましい態様の詳細な説明 >

本発明は、転写因子NF-カッパB（NF- κ BまたはNF-kBとも呼ぶ）を阻害する新規な遺伝子産物POP2に関する。NF-kBは、細胞増殖、細胞死ならびにサイトカインおよびその他の発現蛋白質の産生を含む生物学的過程において幅広い役割を果たしている。本明細書において記載される技術は、NF-カッパBの生物学的活性を阻害および/または減少する手段を提供する。該技術はまた、CATERPILLER、NOD、NALP、Pypaf、PANおよびNACHTという名称によってまとめて知られている幅広いクラスのヒトおよびマウス蛋白質の機能を改変することもできる。可能性のある用途としては、癌の化学療法、遺伝子治療、細菌、ウイルス、真菌および原虫感染等に対する免疫応答の増強または改変が含まれる。

【0064】

Pyrindメイン（PYD）含有蛋白質は、情報伝達および炎症における役割がますます評価されてきている。CLR（NLR、NALP）ファミリーのメンバーであるNALP1およびCIAS1/NALP3は、種々の癌においてプロモーターのメチル化によって抑制されるアダプター蛋白質であるASC（TMS1、PyCARD）に依存するインフラマソームの形成に明らかに関与しており、炎症性カスパーゼをリクルートする。これらのCLR類は、CLR PYDとASCのPYDとの相互作用によりASCをリクルートする。同様に、カスパーゼ1は、ASCのCARDドメインとカスパーゼ1との間の相互作用によりリクルートされる。PYDまたはCARD相互作用を妨げる単独の競合ドメインをコードする蛋白質は、これらの相互作用のレギュレーターとして魅力的であり、最近、Pyrin蛋白質自身がASC：カスパーゼ1相互作用のレギュレーターとして提唱されている。CARD-only蛋白質（COP）およびいくつかのPyrin-only蛋白質（POP）が述べられている。COPは、他の2個のCARD-only蛋白質ICEBERGおよび偽ICEの役割と類似した役割であるカスパーゼ-1のオリゴマー化の遮断によりIL-1bの産生を阻害する。多くのPOPはポックスウイルスのゲノムに含まれるウイルス蛋白質である。最近、これらのうちの1つであるM13Lが、IL-1bの産生を阻害することができる毒性遺伝子として示唆されている。ヒトゲノムは少なくとも2個のpyrin-only蛋白質（POP）、すなわちASC依存性のNF-kB活性を阻害するPOP1、および本研究の対象であるPOP2を含んでいる。

【0065】

本発明者により、BLAST検索によるヒトゲノムの使用によって、ヒトゲノムの3番染色体におけるPYPAF2/NALP2 pyrinドメイン関連遺伝子が示され、本発明者はこれをPOP2と命名した。単一のエキソンである274 bpの遺伝子は、97個のアミノ酸の蛋白質をコードし、pyrinドメインとほぼ一致する配列同一性および予測構造を有する。Pop2メッセージは主に末梢血白血球および精巣において発現している。精製した白血球サブpopulationにおける発現は検出可能であるが弱く（データは示していない）、これはPop2が免疫細胞において広く発現していることを示唆するものである。Pop2はまた、単球様細胞株THP-1、BおよびT細胞性リンパ腫細胞株においては低いレベルで検出され、赤白血病株K562においてはより多く発現していた。この発現パターンは、免疫細胞中のCLR依存的事象の制御におけるPOP2の役割とほぼ一致する。CLR蛋白質はまた、受精卵における細胞分裂に必要な非pyrin CLRファミリーのメンバーであるMATERにより示されるように、胚形成においても役割を果たす。同様に、マウスNALP14もまた発生機能を有すると考えられる。精巣におけるPOP2の発現は、発生中のCLR依存的事象の制御におけるPOP2の役割を反映しているのか

10

20

30

40

50

もしれない。

【 0 0 6 6 】

予想通り、POP2は他のpyrinドメイン蛋白質と高度の類似性を有し、構造予測に基づく、類似の構造を有する可能性が高い。POP1蛋白質配列を用いた検索ではPop2を検出できなかった。同様に、PYPAF2/NALP2 pyrinを用いた検索ではPop1遺伝子を検出できず（データは示していない）、このことは、ヒトPOPの完全な相補体を列挙するためには、他のPYDを用いる広範にわたる検索を行う必要があることを示唆するものである。POP1はASC pyrinドメインに密接に関連し、ASCのPyrinまたはCIAS1との共発現において見られるNF-κB活性の増加を阻害するが、構造的に類似するPOP2は、POP1よりも距離を置いてASC PYDと関連し、より密接にCLR PYDと類似している。この相違を考えると、POP2はCLR PYDの特異的な競合者である可能性があり、POP1はASCにより特異的である。しかしながら、異なるPYD：PYDの組み合わせの結合親和性に関する研究はまだ行われていない。

10

【 0 0 6 7 】

比較的小さいサイズ（～12 kDa）を考慮すると、POP2がすべての細胞にわたって発現していることは驚くべきことではない。不思議なことに、POP2は発現している細胞のほぼ4分の1においては核に集中している。この理由は不明であるが、このことはPOP2が核局在化配列（NLS）を含み得ることを示唆するものである。不思議なことに、pyrinドメインの一貫した特徴は、SV40 NLSと類似するN末端付近の塩基性パッチ（KKFK）である。しかしながら、CLR蛋白質CIAS1およびMonarch、ならびにPOP1およびASCは全て、pyrinドメイン中にSV40 NLS様配列（KKFK）を有するのに対し、POP2がNLS配列（SKFK）を有する可能性は低い。それにもかかわらず、CIAS1およびMonarchは専ら細胞質性であり、このことはこの配列がNLSではないことを示唆するものである。同様に、原型のPYD蛋白質であり、地中海熱において突然変異が生じているPyrin（マレノストリン）は、最初は核において機能すると考えられていた。興味深いことに、Pyrinの核局在化はレプトマイシンB非感受性であり、2つの推定NLS配列は可欠であった。その後、Pyrinの潜在的な核での役割は、ASCと相互作用する能力により影が薄くなっている。これらの問題にもかかわらず、一部のpyrinドメイン蛋白質は明らかに核蛋白質である。インターフェロン誘導蛋白質IFI16、およびメラノーマ細胞で活性化されるAIM2 は、両方ともHIN-200 DNA結合ドメインを含み、転写において役割を果たす。

20

【 0 0 6 8 】

Pyrin含有蛋白質は、NF-κBの機能に多様な効果を有することが報告されている。CLR蛋白質による病原体の認識は、RIP2およびIKKを経てNF-κBを活性化させると考えられている。この機能はさらに、トランケーションとして発現した場合に、NF-κBを協調的に活性化させる一部のCLR pyrinドメインの能力によって支持される。しかしながら、他のCLR pyrinドメイン、例えば、PAN2/PYPAF4およびPYPAF2/PAN1のCLR pyrinドメインはNF-κBを阻害し、このことはCLRが炎症性および抗炎症性の両方の役割を果たしていることを示唆するものである。さらに、PAN1/2に合わせてPOP1およびPOP2の両方がNF-κB阻害特性を有すると考えられる。POP2は、種々の細胞においてTNFα誘導性のNF-κB活性および一過性にトランスフェクトされたp65の転写活性を阻害する。NF-κB阻害を引き起こすメカニズムは不明であるが、PAN2およびPOP1の両方が、下流のIκBaのリン酸化に影響を及ぼし得るIKKαと相互作用することが報告されている。これらの研究では、IKK活性の欠失がTNFα誘導性NF-κB活性のPOP1またはPAN2阻害と関連していた。POP2はTNFα誘導性NF-κB活性を阻害できるが、これはまた、活性p65サブユニットのトランスフェクションに続いて見られる活性化も阻害する。さらに、本発明者によって、POP2発現は必ずしもNF-κBの核内輸送を妨げないが、少ないかまたは再分布した核NF-κBを有するPOP2発現細胞からも明らかのように、核分布または蓄積を変えることができることが観察される。これらの実験からは、阻害が核レベルにおいてIKKの下流で起こっていることが示唆される。これらのパターンがp65の比較的直接的な阻害から生じるのか、または何らかの方法でIKKに關与しているのかは未だわかっていない。

30

40

【 0 0 6 9 】

50

Pyrinドメインはまた、pyrin-CARD蛋白質ASCと複合体を形成することができる。PyrinのASCとの相互作用により、プロアポトーシス細胞と関連し得る核周辺スペックへの再分布が起こる。さらに、CLR蛋白質NALP1、NALP2およびNALP3のPYDは、ASCおよびカスパーゼ-1をリクルートすることにより、プロIL-1bおよびプロIL-18変換インフラマソーム複合体を形成する。従って、多くのCLR蛋白質（全てとは限らないが）が、最初に記載したpyrinスペックと区別ができない核周辺スペックにおいてASCと会合する。POP1および特定のpyrin含有CLR蛋白質のように、POP2もまたASCと共発現させた場合にスペックを形成する（図12）。なぜ一部のpyrinドメインがASCと会合でき、その他のものではないかは明確にはわからないままである。しかし、これらのPYD相互作用からは、スペックおよび/またはインフラマソーム形成が単ドメイン蛋白質、例えばCOP、POP1およびPOP2により制御されている可能性が再び浮上する。CIAS1/NALP3のpyrinドメインを用いるスペック形成アッセイでは、POP2は、CIAS1およびASCの相互作用をほぼ止めることができる。このことは、ASC構造、例えばスペックおよびインフラマソームが、pyrinまたはCARD-only蛋白質による制御の標的であるという仮説を強く支持するものである。

10

20

30

40

50

【0070】

pyrin-only蛋白質が仲介するASC相互作用の制御に関する示唆は注目に値するものである。ASCのpyrin蛋白質との相互作用は、NF- κ B依存的なサイトカイン転写の活性化、および先に形成したIL-1bおよびIL-18前駆体のCLR含有インフラマソームによる切断の両方を通して、プロアポトーシス状態（スペック形成）に、および病原体に伴う分子パターン（例えばムラーミルジペプチドおよびdsRNA）に対する炎症反応に関連する。これらの過程を崩壊させるか、さもなければ妨げることができる蛋白質、例えばPOP2は、アポトーシスプログラムの制御に寄与することにより、細胞の発達、生存、またはホメオスタシスに幅広い影響を及ぼし得る。先天性免疫応答に関して、炎症反応を軽減するメカニズムについては理解が限定されている。Pyrin-only蛋白質は、炎症性活性化事象がインフラマソーム形成を遅らせることにより抑制されるメカニズム、インフラマソームの存続期間を限定することにより炎症シグナルおよび炎症過程が終了するメカニズム、またはこれらの両方を示し得るものである。CIAS1/NALP3における突然変異は、多種多様の炎症性疾患を引き起こす。ASC:CIAS1/NALP3相互作用のPOP2による妨げは、これらの個体における炎症の改善に使用することができる。さらに、POP2は、独立してNF- κ Bを阻害する能力を示す。このことにより、遺伝子発現を誘導または遮断するため、アポトーシスを妨げるまたは支持するため等に、NF- κ B活性を制御することが広く示唆される。このようなNF- κ Bを調節できる分子の機械的特性をよく理解することにより、最終的には、アルツハイマー病、自己免疫疾患および癌を含み、NF- κ B活性の維持を伴う疾患の広いスペクトルに関して、代替的な治療ストラテジーを得ることができる。

【実施例】

【0071】

< POP2の発見およびクローニング >

TBLASTN検索において上述のPYD（例えば、PYPAF1/Monarch、PYPAF2/NALP2から）のアミノ酸配列を用いることにより、新規配列（第3染色体の末端テロメア（3q28）におけるヒトゲノムのコンティグ配列LOC152138に対応し、97アミノ酸をコードする274塩基対で単一エキソンの遺伝子）が明らかになった（図1）。推定アミノ酸配列は、PYPAF2のPYDと78%の類似性（67%の同一性、そして $1e-25$ のE値）を有する（データは示していない）。本発明者は、インフレイム終止コドンの存在にもかかわらず、この単一エキソンは大きな遺伝子に属すると考えた。このエキソンに対して追加的な、理論的に近接する予測エキソンまたは発現配列タグ（ESTs）を決定するためのゲノム解析は情報価値がないものであった。最も近くで同定された上流遺伝子（68.9 kbps離れている）は、C3orf6（異なった形でスプライシングを受ける12個のエキソンを有する遺伝子であり、痙性対麻痺に関連している可能性のある306および482アミノ酸の蛋白質を産生する）である（図2）。下流に関しては、繊維芽細胞増殖因子12遺伝子（Fgf12）は630 kbps以上離れている。DNase処理したトータルRNAから遺伝子を単離し、FLAGまたはMyc-エピトープタグのいずれかを含むpcDNA3

にクローニングした。得られたcDNAの配列は、NCBIデータベースにおける配列と同一であった(図3)。polyA⁺ mRNAから遺伝子の3'末端を決定しても、下流エクソンへのスプライシングの証拠、およびコード領域がインフレーム終止コドンで終結している証拠は示されていない。マウスおよびラットゲノムのBLAST検索からは、C3orf6の等価物(equivalents)は両データベースにおいて検出されたが、類似のマウス遺伝子は得られなかった(データは示していない)。予測されたように、293細胞のMycタグを付した構造体でのトランスフェクションにより、約12キロダルトンの蛋白質が産生された(示していない)。PYPAF2 PYDとの高い類似性を考慮し、本発明者はpyrin-only protein 2 (POP2) という名称を付けた。

【0072】

< POP2は、CLR pyrinと最も類似したpyrinドメインを有する >

PYPAF2 PYDと高い同一性を有することと一致して、POP2蛋白質配列を用いたマルチプルアライメントにより他のPYDとの高い相同性が明らかとなった(図4)。ホモ型のPYDオリゴマー化において重要な役割を果たすと考えられるL11、L15、L18、P43、A50、A68およびL84残基、ならびに配列モチーフXLXKFKは、通常PYDにおいて保存されている。これらの残基および配列は同様にPOP2において保存されている。3D-PSSMアルゴリズムを用いたPOP2蛋白質配列のスレッディング解析からは、ASCおよびNALP1のpyrinドメインに基づく2つの信頼性の高い(>90%)モデルが得られる(図5)。系統発生解析からは、POP2が、POP1またはASC PYDに対してよりもCLRファミリーのPYDにより類似していることが示唆される(図6)。このことは、この遺伝子がCLR-PYD遺伝子重複事象に由来し、POP1のパラログではないことを強く示すものである。これらの発見はともに、POP2が単一の真正なpyrinドメインをコードすること、第二に、この遺伝子がヒトゲノム中にあることを実証するものである。

【0073】

< POP2は主にPBLにおいて発現する >

POP2の発現パターンを測定するために、種々の細胞株から単離したmRNAを用いてRT-PCRを行った(図7A)。POP2 mRNAは、K562(ヒト赤芽球様白血病)細胞株において容易に検出された。Jurkat T細胞株、Ramos Bリンパ腫、および単球様/マクロファージ株THP-1では低量のPOP2が検出された。GAPDHと比較して、POP2はK562において量が多かった。正常ヒト組織cDNAパネルを用いて、初代培養細胞におけるPOP2 mRNAの発現を調べた。予測される大きさの産物が、精巣でのある程度の発現を伴って(PBLにおける発現の方が多いが)、末梢血白血球(PBL)において容易に検出された(図7B)。精巣で見られるよりも弱い適当な大きさのバンドが、胸腺および脾臓の両方において観察された。続いて、本発明者は、どの特定のPBL細胞ポピュレーションがPOP2を発現するかを測定するために、ヒトの血液画分パネルを調べた(図7C)。該パネルに含まれる全てのサンプルにおいて、POP2 mRNAが低いレベルで検出された。LPS処理によりTHP1細胞におけるPYPAF2の発現が変化するので、THP1をLPS(10 ng/ml; 24時間)で刺激した。POP2の発現は変化しないことが観察された(データは示していない)。該パネルにおいては、顆粒球、マクロファージ、NK細胞および樹状細胞を含む重要な白血球ポピュレーションの多くは示されていない。顆粒球を除いて、これらの白血球は通常、末梢血においては多くの数は存在しない。これらのデータは、血液細胞および免疫細胞株ならびに未成熟な白血球におけるPOP2の広い発現を支持するものである。N末端にMYCタグを有するPOP2のcDNAクローンを作製し、HEK-293細胞のトランスフェクションを行った。抗Mycイムノブロットにより示されるように、一過性のトランスフェクタントから得られた溶解液には、予想された12 kDa以下の蛋白質が産生されていた(図7D)。

【0074】

< POP2の核および細胞質画分への局在化 >

POP2の発現をHeLa細胞における免疫蛍光によっても調べ、POP2の細胞下分布を解析した。POP2は、細胞質および核の両方に存在して(核での発現はほとんど観察されないか、または容易に観察される)細胞質にほとんど存在するか、または主に核に集中していること

10

20

30

40

50

が観察された（図8A～D）。ほとんどのPOP2発現細胞は、細胞質での分布パターンまたはより均一な分布パターンを示すが、少数ではあるが十分な数（20%）が核に集中した発現を示す（図8E）。細胞質および核の両方におけるPOP2の存在は、その大きさと一致し、POP2がどちらかのまたは両方の画分において機能できることを示唆するものである。コード配列中に標準的なNLSは存在しないが、POP2の核における集中は、少なくとも1個の核局在化シグナル配列（NLS）の存在を示すものである。

【0075】

< POP2はNF- κ B活性を阻害する >

POP2が免疫細胞で発現すること、およびPYD含有蛋白質が炎症性障害に関連することから、本発明者はPOP2が先天性免疫応答の制御または悪化において機能していると仮定する。NF- κ Bの炎症性インデューサーとしての役割が認められるので、POP2が正にNF- κ B活性に影響を及ぼすかどうかを調べた。HEK-293細胞について、3X-NF- κ B-LucレポーターおよびPOP2 cDNAを用いて一過性にコトランスフェクションを行った。18時間後に細胞をTNF- α （10ng/mLで30分間）で刺激し、全細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を解析した（図9A）。POP2のトランスフェクタントにおいて、TNF- α で刺激されたNF- κ Bの3倍近い阻害が観察され、これはPOP2がTNFRの下流のNF- κ Bシグナルを妨げること示すものである。これらの結果は、HeLaおよびCOS-7細胞においても極めて一致した結果が確認された（図9BおよびC）。

【0076】

TNF α 介在性NF- κ B活性化を阻害するPOP2の能力により、POP2がNF- κ Bシグナルカスケードのダウンレギュレートに関与することが示唆される。POP2が経路に影響を及ぼす地点を決定するために、カスケードの末端にあるNF- κ Bのp65サブユニットとともに開始するシグナルの活性化の引き金を引くのに関与する因子について試験を行った。増加させた量のPOP2、NF- κ B-Lucレポーターおよび「活性」p65でコトランスフェクションを行ったHEK-293細胞の溶解液を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った（図9D）。最も高い量のPOP2でトランスフェクションが行われた場合に、TNF α を使用した場合の結果に相当する結果であるp65 NF- κ Bの用量依存的な阻害が観察され、これは、POP2がp65に影響を及ぼすことにより末端のNF- κ Bシグナル活性化シグナルを阻害すること示唆するものである。CMVプロモーター駆動性のpGL3コントロール発現プラスミドをPOP2とともにコトランスフェクトした場合には抑制は観察されず、このことは、POP2が転写の全般的なインヒビターではないことを示すものである（図9E）。

【0077】

< POP2は核周辺スペックにおいてASCと共に局在化する >

Pyrinおよび多くのCLRを含むPYDファミリーの一部のメンバーは、ASCと相互作用することにより核周辺構造（スペック）を形成するが、その他のものは形成しない。NF- κ BのCLR活性化は、ASCおよびPAN2/PYPAF4のNF- κ Bを阻害するpyrinドメインと相互作用し、ASCの存在下でスペックを形成させない能力に関連していると考えられる。しかしながら、POP1はASCと相互作用するが、NF- κ Bを阻害する。POP2がスペックにおいてASCと共に局在化するかどうかを調べるために、GFP-POP2およびMyc-ASCでコトランスフェクションを行ったHeLa細胞において免疫蛍光染色を行った（図10）。GFP-POP2を単独で受けた細胞は、FLAG-POP2と一致する核および細胞質染色パターンを示した。GFP-POP2を含むスペックは観察されなかった。ASCを単独で受けた細胞は、細胞質においてASCの集中が見られたが、個々のスペックは見られなかった。しかし、GFP-POP2とASCとのコトランスフェクションにより、ASCおよびGFP-POP2の両方を含む核周辺スペックが形成した。本発明者の結果は、POP2がASCと相互作用し、スペック形成に参加できることを示すものである。

【0078】

< POP2はp65 NF- κ Bの核への蓄積を阻害する >

POP2がPOP1のようにASCと会合し、NF- κ Bを阻害することができたので、POP2がどのようにNF- κ Bを阻害するかを次に検討した。別のpyrin含有蛋白質CIAS1は、p65の核移行を妨げることによってp65 NF- κ Bを阻害する（23）。従って、本発明者はPOP2が同様に機能する

可能性があると考えた。POP2を可視化するために、GFP-POP2融合をHeLa細胞において発現させた。TNF α 処理の後、核p65-NF- κ BはGFP-POP2発現細胞においてほとんど観察されなかった(図11A)。p65-NF- κ Bの細胞位置における再配列(拡散した核から核周辺へ)または核のp65の減少のいずれかが観察された(図11Aおよび11B)。観察された変化を定量化するために、p65の局在化パターンについて100以上の細胞を調べた。図11Cに示されるように、POP2のないTNF処理細胞の90%以上において、p65が核で強く発現していた。POP2の存在下では、POP2発現細胞のうちの40%のみが核p65を有していた。POP2発現細胞の残りの60%では、細胞質および核の両方においてp65染色が見られた。これらの結果は、POP2がp65の蓄積(または分布)を変えるが、p65の核内輸送を単に遮断するのではないことを示唆するものである。

10

【0079】

< POP2はCIAS1 pyrinドメインと競合する >

Pyrin-only蛋白質は、競合物質として作用することによりPYD相互作用を妨げる可能性を有する。POP2はASCと相互作用するので、この相互作用がASCのCLR PYD蛋白質との会合を妨げるのはもっともものことのように思われる。POP2が機能的なASC:CLR相互作用を阻害できるかどうかを調べるために、ASCによるCIAS1 PYDのスペックへのリクルートを阻害する能力について試験を行った(図12)。pyrin only CIAS1構造体(CIAS1-PYD)およびASCのHeLa細胞へのコトランスフェクションにより、ASCを発現する細胞のほぼ50%においてスペックが形成される。ASC単独のトランスフェクションではスペックは形成されない。不思議なことに、POP2の独立してスペックを形成する能力にも拘らず、POP2を共発現させるとASC発現細胞の約10%のみがスペックを有する。CIAS1、POP2およびASCを発現する細胞においてスペック形成が相対的に見られないことは、CIAS1およびPOP2 pyrinドメインが相互作用し、それによってASC含有スペックの形成が妨げられることを示すものである。このような知見は、NF- κ Bを阻害することに加えて、ASCおよびCLR蛋白質を伴う複合体集合、例えばCIAS1およびNALP1 インフラマソームの阻害因子としてPOP2が作用できることを示唆するものである。

20

【0080】

< 材料および方法 >

< バイオインフォマティクス >

ヒトゲノムのTBLASTN検索は、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>) で、PYPAF2 (pyrin含有Apaf-1様蛋白質2) のN末端の100アミノ酸配列をクエリーとして用いて行った。異なるpyrinドメインのマルチプルアライメントおよび系統発生解析は、CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) およびMEGA2 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, <http://www.megasoftware.net/>) を用いて行った。ASCおよびNALP1のpyrinドメインを鋳型として用いる三次構造予測は、インペリアル・カレッジ・ロンドンのウェブサーバーで3D-PSSM (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/>) を用いて行った。

30

【0081】

< 試薬および抗体 >

組み換えヒトTNF α およびヤギ抗マウスIgG1-FITCはBD Pharmingen社(サンディエゴ, CA) から購入した。マウス抗FLAG M5モノクローナル抗体およびヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ標識IgG1抗体はSIGMA社(セントルイス, MO) から購入した。マウス抗mycタグIgG1モノクローナル抗体はUpstate社(Lake Placid, NY) から、ウサギp65ポリクローナルIgGはSanta Cruz Biotechnology社(サンタクルーズ, CA)、そしてAlexa Fluor 594^(R) ヤギ抗ウサギIgG (H+L) はMolecular Probes社(ユージーン, OR) から購入した。

40

【0082】

< クローニングおよびRT-PCR >

制限酵素部位Hind IIIおよびXho Iに挟まれたPOP2 cDNAが得られるように設計したプライマー(フォワード: 5' -aaccgcggatggcatcttctgcagag-3' およびリバース: 5' -aaaagcttatggcatcttctgcagag-3') を用いて、RT One Step Kit (QIAGEN, ヒルデン, 独国) を

50

用いるRT-PCRにより、B細胞株Ramos由来のトータルRNAからPOP2をコードするcDNAを増幅した。引き続き、POP2をN末端FlagまたはMycエピトープを含有するpCDNA 3.1ベクターにクローニングした。POP2 mRNAの検出のために、トータルRNAをDaudi、Ramos (B細胞リンパ腫)、Jurkat (ヒトT細胞白血病)、THP-1 (ヒト単球細胞株) およびK562 (ヒト赤白血病細胞株) からRNeasy RNA Isolation Kit (QIAGEN製) を用いて単離し、逆転写し、そしてOne-Step RT-PCR Kit (QIAGEN製) を用いて増幅した。多様なヒト組織 (MTCCパネルI) およびヒト血液フラクション (MTCパネル) から (両方ともBD Biosciences (パロアルト, CA) 製) のトータルRNAに関しても同一の手順で実施した。グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) のプライマーをコントロールとして使用した。

【0083】

10

<細胞培養、トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッセイ>

HEK 293、HeLaおよびCOS-7細胞 (American Type Culture Collection, マナッサス, VA) を、加熱不活性化した10%ウシ胎仔血清、5% L-グルタミンおよび0.1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) またはRPMI培地で培養した。細胞を3~4日ごとに継代した。細胞数および細胞の生存をトリパンブルー排除法で測定した。一過性のトランスフェクションアッセイのために、細胞を6ウェルプレートに播種し (各ウェルあたり 2×10^5 細胞)、37℃、5% CO₂および95%の湿度で16時間インキュベートした。FLAG-POP2 (種々の量)、100 ngのpNF-kB-Luc (3xNF-kB駆動性ホタルルシフェラーゼレポーター)、および100 ngのNF-kB-p65でFuGene6 (3 µl : 1 µgのDNA、Roche、バーゼル、スイス) を用いてトランスフェクションを行うか、またはトランスフェクションの24時間後に種々の量のTNF-αで刺激した。各トランスフェクションにおけるDNAの全量は、空ベクター (pcDNA3) を添加することにより一定 (1100 ng/ウェル) に維持した。細胞溶解液を200 µlの溶解バッファー (1M Tris pH 7.4、1M NaCl、10mM EDTA、1% Triton X) を用いて調製し、VICTOR™ Light Luminescence Counter (Wallac Co.製、トゥルク、フィンランド) における標準的なプロトコールに従ってルシフェラーゼを定量化した。

20

【0084】

<ウエスタンブロッティング>

Flagタグを付けたおよびMycタグを付けた蛋白質のウエスタンブロッティングを、基本的には「Springer, T. A. 1999. Analysis of proteins. In Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2. I. M. A. R. B. R. E. K. D. D. M. J. G. S. J. A. S. a. K. Struhl, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, p. 10.16.1」に記載されているように行った。トランスフェクションおよび溶解の後に、等しい量の蛋白質をSDS-PAGE (15%ポリアクリルアミド) ゲルにおいて200ボルトで40分間分離し、ニトロセルロース (0.2 µm) に110ボルトで1時間トランスファーし、そしてα-FLAG抗体 (M5, Sigma製; 1:5000) またはα-myc抗体 (1:7500) を用いて免疫プロットを行った。結合したM5またはα-mycをヤギ抗マウスIgG1-西洋ワサビペルオキシダーゼ (SouthernBiotech製; 1:7500) で検出し、Supersignal WestPico HRP Detection Reagents (Pierce Biotechnology製、ロックフォード、イリノイ州) を用いてオートラジオグラフィフィルム (Midwest Scientific製、セントルイス、ミズーリ州) 上で可視化した。

30

40

【0085】

<免疫蛍光顕微鏡検査法>

COS-7およびHeLa細胞を、2穴のチャンバースライド中において1個のチャンバーあたり 8×10^4 個細胞の密度で一晩培養した。1 µgのpcDNA3をネガティブコントロールとして、そして、1 µgのGFP-POP2、1 µgのFLAG-CIITAまたは1 µgのMYC-ASCのうちのいずれかをポジティブコントロールとして用いて、細胞を一過性にトランスフェクトした。1 µgのFLAG-POP2、1 µgのMyc-POP2、1 µgのNF-κB-p65または1 µgのMyc-ASCのうちのいずれかを使用した。18時間後、細胞を3:2のアセトン:PBS溶液で固定し、PBS (1%BSA) で洗浄し、PBS (1%BSA、10%NGS) でブロッキングを行った。その後、細胞をマウス抗FLAGもしくは抗Myc抗体またはウサギ抗p65ポリクローナルIgGとともに室温で1時間インキュベートし、PBS (1%BS

50

A)で洗浄し、ヤギ抗マウスIgG1-FITC、ヤギ抗マウスIgG1-PEまたはヤギ抗ウサギIgG-PEのうちのいずれかとともにインキュベート(1時間、室温)した。最後に、細胞をPBSで3回洗浄し、DAPIで染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【0086】

<全般的な技術>

本発明を実施するために使用される核酸(RNA、iRNA、アンチセンス核酸、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルスまたはこれらのハイブリッド)は、種々の起源から単離し、遺伝子操作を施し、増幅し、そして/または組み換え技術により発現/生成させることができる。これらの核酸から生成する組み換えポリペプチドは、個々に単離またはクローニングすることでき、そして所望の活性に関して試験を行うことができる。細菌、哺乳類、酵母、昆虫または植物細胞発現系を含むいずれの組み換え発現系を使用してもよい。

10

【0087】

本発明は、本発明の配列を含むオリゴヌクレオチド、例えば、本発明の代表的な配列のサブ配列を提供する。オリゴヌクレオチドには、一本鎖ポリデオキシヌクレオチド、または化学的に合成できる2本の相補的ポリデオキシヌクレオチド鎖が含まれ得る。

【0088】

核酸の操作に関する技術、例えば、サブクローニング、ラベリングプローブ(例えば、Klenowポリメラーゼ、ニックトランスレーション、増幅を用いるランダムプライマーラベリング)、配列決定、ハイブリダイゼーション等は、科学文献および特許文献に記載されている。例えば、「Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)」;「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997)」;「LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)」を参照のこと。

20

【0089】

核酸、ベクター、キャプシド、ポリペプチド等は、当業者に公知の数多くの一般的な方法のうちのいずれかによって解析および定量化することができる。これらには、例えば、分析生化学的方法、例えば、NMR、分光測光、ラジオグラフィー、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、およびハイパーディフュージョンクロマトグラフィー(hyperdiffusion chromatography)、種々の免疫学的方法、例えば、流体またはゲル内沈降反応、免疫拡散法、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、免疫蛍光アッセイ、サザン解析、ノーザン解析、ドットプロット解析、ゲル電気泳動(例えばSDS-PAGE)、核酸またはターゲットまたはシグナル増幅法、ラジオラベリング、シンチレーション計測、およびアフィニティークロマトグラフィーが含まれる。

30

【0090】

本発明の方法の実施に使用される核酸の採取および操作は、ゲノムサンプルからのクローニング、そして場合により、例えばゲノムクローンまたはcDNAクローンから単離または増幅したインサートのスクリーニングおよびリクローニングによって行うことができる。本発明の方法において使用される核酸源には、例えば、哺乳類人工染色体(MAC)、ヒト人工染色体、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、P1人工染色体、コスミド、組み換えウイルス、ファージまたはプラスミドに含まれるゲノムまたはcDNAライブラリーが含まれる。

40

【0091】

本発明は、融合蛋白質およびこれをコードする核酸を提供する。本発明のポリペプチドは、異種ペプチドまたはポリペプチド、例えば、高い安定性または精製の簡易化のような所望の特性を与えるN末端同定ペプチドと融合させることができる。本発明のペプチドおよびポリペプチドは、例えば、より免疫原性であるペプチドの産生のために、組み換え技術により合成されたペプチドをより容易に単離するために、抗体および抗体発現B細胞を

50

同定および単離するために、1種またはそれ以上のそこに連結する追加ドメインとの融合蛋白質として合成および発現させることもできる。検出および精製促進ドメインには、例えば、金属キレートペプチド、例えば固定化された金属上において精製が可能なポリヒスチジン領域およびヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化された免疫グロブリン上での精製が可能なプロテインAドメイン、およびFLAG伸張 / アフィニティー精製系 (Immunix Corp製、シアトル、ワシントン州) において利用できるドメインが含まれる。精製を促進するための、精製ドメインおよびモチーフ含有ペプチドまたはポリペプチドの間の切断可能なリンカー配列、例えばXa因子またはエンテロキナーゼ (Invitrogen製、サンディエゴ、カリフォルニア州) もまた含まれる。

【0092】

10

< 転写制御エレメント >

本発明の核酸は、プロモーターに動作可能に連結することができる。プロモーターは、核酸の転写を指示する1個のモチーフでもまたは一連の核酸制御配列でもよい。プロモーターは、転写の開始部位の近くに必要な核酸配列、例えば、ポリメラーゼII型のプロモーターの場合にはTATAエレメントを含むことができる。プロモーターにはまた、場合により、転写の開始部位から数千塩基対ほどに位置し得る遠位エンハンサーまたはリプレッサーエレメントが含まれる。「構成的」プロモーターは、ほとんどの環境的および発生的条件下で活性なプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、環境的または発生的な制御下にあるプロモーターである。「組織特異的」プロモーターは、生物の特定の型の組織において活性であるが、同一の生物由来の他の型の組織においては活性でない。「動作可能に連結した」という語句は、核酸発現制御配列 (例えば、プロモーター、または一連の転写因子結合部位) と第二の核酸配列との間の機能的連結を表し、前記の発現制御配列が第二の配列に相当する核酸の転写を指示する。

20

【0093】

< 発現ベクターおよびクローニングベークル >

本発明は、本発明の核酸、例えば、本発明の蛋白質をコードする配列を含む発現ベクターおよびクローニングベークルを提供する。本発明の発現ベクターおよびクローニングベークルには、ウイルス粒子、パキウロウイルス、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、フォスミド、細菌人工染色体、ウイルスDNA (例えば、ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ポックスウイルス、シュードラビエス (pseudorabies) およびSV40の誘導体)、P1を基礎とする人工染色体、酵母プラスミド、酵母人工染色体、および、興味のある特定の宿主に対して特異的な任意のベクター (例えば、パチラス、アスペルギルスおよび酵母) が含まれる。

30

本発明のベクターには、染色体、非染色体および合成DNA配列が含まれる。数多くの適当なベクターが当業者に公知であり、市販されている。

【0094】

本発明の核酸は、必要な場合には、分子生物学的方法を用いて、種々のベクターのうちのいずれかにクローニングすることができる。増幅配列のクローニングを促進させるために、制限酵素部位をPCRプライマーペアに「組み込む」ことができる。

【0095】

40

本発明は、本発明のポリペプチドおよびペプチドをコードする発現ベクターのライブラリーを提供する。これらの核酸は、科学文献および特許文献に記載される種々の慣用の技術によって、ゲノムにまたは細胞の細胞質もしくは核に導入することができ、そして発現させることができる。例えば、Sambrook、TijssenまたはAusubelを参照されたい。ベクターは天然源から単離するか、ATCCまたはGenBankライブラリーのような供給源から入手するか、または合成もしくは組み換え法によって製造することができる。

【0096】

1つの態様において、本発明の核酸は、本発明のペプチドまたはポリペプチドのin situ発現のためにインピボで投与することができる。該核酸は、「裸DNA (naked DNA)」として (米国特許第5,580,859号明細書参照)、または発現ベクター、例えば組み換えウイル

50

スの形態で投与することができる。該核酸は、本技術分野で公知の任意の経路で投与することができる。

【0097】

本明細書において使用される場合に「発現カセット」という語句は、ヌクレオチド配列と適合する宿主において構造遺伝子（すなわち、蛋白質のコード配列、例えば本発明のポリペプチド）の発現に影響を及ぼすことができる前記の配列を表す。発現カセットには、少なくとも、ポリペプチドをコードする配列および場合によりその他の配列、例えば転写終結シグナルと動作可能に連結するプロモーターが含まれる。発現に影響を及ぼすのに必要であるかまたは有用である追加的な因子、例えばエンハンサーもまた使用することができる。本明細書において使用される場合に「動作可能に連結した」は、DNA配列から上流のプロモーターの連結を表し、このプロモーターがDNA配列の転写を仲介する。従って、発現カセットには、プラスミド、発現ベクター、組み換えウイルス、任意の形態の組み換え「裸DNA」ベクター等が含まれる。

10

【0098】

「ベクター」には、細胞に感染、トランスフェクト、一過性または恒久的に形質導入することができる核酸が含まれる。ベクターは裸の核酸でも、または蛋白質もしくは脂質と複合体を形成する核酸でもよいことは理解されるだろう。ベクターは場合により、ウイルスまたは細菌の核酸および/または蛋白質、および/または膜（例えば、細胞膜、ウイルス脂質エンベロープ等）を含む。ベクターには、限定はされないが、DNAの断片を連結し、複製することができるレプリコン（例えばRNAレプリコン、バクテリオファージ）が含まれる。従って、ベクターには、限定はされないがRNA、自律的な自己複製環状または直鎖状DNAまたはRNA（例えばプラスミド、ウイルス等）が含まれ、発現または非発現プラスミドの両方が含まれる。組み換え微生物または細胞の培養物を、「発現ベクター」を有するとして記載する場合には、これは染色体外の環状および直鎖状DNA、ならびに宿主染色体に組み込まれたDNAの両方を含むものである。ベクターが宿主細胞により保持される場合には、ベクターは有糸分裂の間に細胞により自律的構造として安定して複製されるか、または宿主のゲノム内に組み込まれる。

20

【0099】

< 宿主細胞および形質転換細胞 >

本発明はまた、本発明の核酸配列、例えば本発明のポリペプチドをコードする配列または本発明のベクターを含む形質転換細胞を提供する。宿主細胞は、原核細胞、真核細胞、例えば、細菌性細胞、真菌細胞、酵母細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞または植物細胞を含む当業者によく知られている宿主細胞のいずれかでよい。典型的な細菌性細胞には、大腸菌、ストレプトマイセス（*Streptomyces*）、バチラス・サブチルス（*Bacillus subtilis*）、サルモネラ・チフィムリウム（*Salmonella typhimurium*）、ならびにシュドモナス（*Pseudomonas*）、ストレプトマイセスおよびスタフィロコッカス（*Staphylococcus*）属内の種々の種が含まれる。典型的な昆虫細胞には、ショウジョウバエS2およびハスモンヨトウSf9が含まれる。典型的な動物細胞には、CHO、COSまたはBowesメラノーマまたは任意のマウスもしくはヒト細胞株が含まれる。好適な宿主を選択することは、当業者の能力の範囲内である。

30

40

【0100】

ベクターは、形質転換、トランスフェクション、形質導入、ウイルス感染、遺伝子銃またはTiによる遺伝子導入を含む種々の技術のうちのいずれかを用いて、宿主細胞に導入することができる。特定の方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストランによるトランスフェクション、リポフェクションまたはエレクトロポレーションが含まれる。

【0101】

処理を施された宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体の選択または本発明遺伝子の増幅のために必要に応じて改変された栄養媒体中において培養することができる。適当な宿主株の形質転換および宿主株の適当な細胞密度への増殖に続いて、選択されたブ

50

ロモーターを適当な方法（例えば、温度シフトまたは化学的誘導）により誘導させ、細胞を追加的に培養することにより、所望のポリペプチドまたはその断片を産生することができる。

【0102】

細胞は、遠心分離によって回収され、物理的または化学的手段によって破碎され、そして得られた粗製抽出物はさらなる精製に付される。蛋白質発現に使用される微生物細胞は、凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破碎、または細胞溶解剤の使用を含むいずれかの慣用の方法で破碎される。このような方法は当業者に公知である。発現させたポリペプチドまたは断片は、硫酸アンモニウムもしくはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む方法によって、組み換え細胞培養液から回収し、そして精製することができる。必要に応じて、ポリペプチドの立体構造を完成させるために蛋白質のリフォールディング法を使用することができる。場合により、最終的な精製段階に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用することができる。

10

【0103】

組み換え蛋白質の発現には、種々の哺乳類細胞培養系もまた使用することができる。哺乳類発現系の例には、サル腎臓線維芽細胞のCOS-7株、および適合するベクターから蛋白質を発現できるその他の細胞株、例えば、C127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株が含まれる。

20

【0104】

組み換え配列によってコードされる遺伝子産物を産生させるためには、宿主細胞における構造体を通常の方法で使用するすることができる。組み換え体の産生方法において使用される宿主に応じて、ベクターを含有する宿主細胞によって産生されるポリペプチドは、グリコシル化されるかまたはグリコシル化されない。本発明のポリペプチドは、開始のメチオニンアミノ酸残基を含んでいてもよく、または含んでいなくてもよい。

【0105】

細胞フリーの翻訳系もまた、本発明のポリペプチドの作製に使用することができる。細胞フリーの翻訳系は、ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸に動作可能に連結したプロモーターを含むDNA構造体からのmRNA転写物を使用することができる。一部の態様においては、DNA構造体は、インビトロ転写反応を行う前に直鎖化してもよい。転写されたmRNAをその後、適当な細胞フリー翻訳用抽出物、例えばウサギ網状赤血球抽出物と一緒にインキュベートし、所望のポリペプチドまたはその断片を作製する。

30

【0106】

発現ベクターは、形質転換された宿主細胞を選択するための表現型の特性、例えば、真核細胞培養におけるジヒドロ葉酸還元酵素もしくはネオマイシン耐性、または例えば、大腸菌におけるテトラサイクリンもしくはアンピシリン耐性を付与するために、1種またはそれ以上の選択可能なマーカー遺伝子を含むことができる。

【0107】

< 核酸の増幅 >

本発明の実施において、本発明のポリペプチドをコードする核酸または改変された核酸は、例えば増幅により複製することができる。本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸を増幅するための増幅プライマーペア、例えば、代表的な配列番号1またはそのサブ配列を含む核酸配列を増幅できるプライマーペアを提供する。

40

【0108】

増幅方法には、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応PCR（PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) and PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y.）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、転写増幅、および他のRNAポリメラーゼによる技術（例えばNASBA, Cangene, ミシサーガ, オン

50

タリオ州)が含まれる。「Sambrook; Ausubel」も参照のこと。

【0109】

< 核酸のハイブリダイゼーション >

本発明は、ストリンジェントな条件下で本発明の典型的な配列、例えば、配列番号1に記載される配列とハイブリダイズする単離または組み換え核酸、またはそのうちのいずれかの相補体、または本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供する。別の態様において、ストリンジェントな条件は、当業者において公知の、そして本明細書に記載されるような高度にストリンジェントな条件、中程度にストリンジェントな条件または低度ストリンジェントな条件である。これらの方法は、本発明の核酸を単離するために使用することができる。

10

【0110】

別の態様において、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイズ能力によって定義される本発明の核酸は、約5残基から完全長までの本発明核酸であり、例えば、これらは少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、90、100、150、200、250残基またはそれ以上の長さであるか、または完全長の遺伝子またはコード配列、例えば、cDNAである。完全長より短い核酸もまた包含される。これらの核酸は、例えば、ハイブリダイゼーションプローブ、ラベリングプローブ、PCRオリゴヌクレオチドプローブ、iRNA、アンチセンス、または抗体結合ペプチド(エピトープ)をコードする配列、モチーフ、活性部位等として有用である。

【0111】

「ハイブリダイゼーション」は、核酸が塩基対により相補鎖と結合する過程を表す。ハイブリダイゼーション反応は、興味ある特定の配列が低濃度で存在するサンプルにおいてでさえもそれが同定できるように、感受性であり、そして選択的であることができる。ストリンジェントな条件は、例えば、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション溶液における塩またはホルムアミドの濃度によって、またはハイブリダイゼーション温度によって定義することができ、そして当業者に公知である。例えば、ストリンジェンシーは、以下に詳細に記載するように、塩の濃度を減少させることにより、ホルムアミド濃度を増加させることにより、またはハイブリダイゼーション濃度を上げることにより、ハイブリダイゼーションの時間を変えることにより、増加させることができる。別の態様において、本発明の核酸は、本明細書に記載されるような種々のストリンジェンシー条件(例えば、高度、中程度および低度)下でのハイブリダイズ能力によって定義される。

20

30

【0112】

1つの態様において、本発明の核酸は、約37 ~ 42 での約50%ホルムアミドの条件を含む高度ストリンジェンシー下でのハイブリダイズ能力によって定義される。1つの態様において、本発明の核酸は、約30 ~ 35 での約35~25%ホルムアミドの条件を含む低度ストリンジェンシー下でのハイブリダイズ能力によって定義される。あるいは、本発明の核酸は、約42 での50%ホルムアミド、5xSSPE、0.3% SDS、および核酸をブロッキングする反復配列、例えばcot-1またはサケ精子DNA(例えば、200 ng/mlの剪断および変性サケ精子DNA)における条件を含む高度ストリンジェンシー下でのハイブリダイズ能力によって定義される。1つの態様において、本発明の核酸は、約35 の低温で35%ホルムアミドを含む低度ストリンジェンシー条件下でのハイブリダイズ能力によって定義される。

40

【0113】

ハイブリダイゼーションの後に、フィルターを50 において6×SSC、0.5% SDSを用いて洗浄することができる。これらの条件は、25%を超えるホルムアミドで「穏やかな」条件であり、25%以下のホルムアミドで「低度」の条件であるとされる。「穏やかな」のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、前記のハイブリダイゼーションが30%ホルムアミドで行われる場合である。「低度ストリンジェンシー」のハイブリダイゼーション条件の具体的な例は、前記のハイブリダイゼーションが10%ホルムアミドで行われる場合である。

【0114】

50

特定のレベルのストリンジェンシーに対応する温度範囲は、興味ある核酸のプリン/ピリミジン比を計算し、それに従って温度を調節することでさらに狭くすることができる。本発明の核酸はまた、AusubelおよびSambrookに示されるような高度、中程度および低度ストリンジェンシー条件下でのハイブリダイズ能力によっても定義することができる。前記の範囲および条件のバリエーションは当技術分野において公知である。

【0115】

<オリゴヌクレオチドプローブおよびそれを使用する方法>

本発明はまた、NFκB阻害活性を有するポリペプチドをコードする核酸を同定するための核酸プローブも提供する。1つの態様において、プローブは本発明の核酸のうちの少なくとも10個の連続した塩基を含む。あるいは、本発明のプローブは、本発明の核酸において示される配列のうちの少なくとも約5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、200、250、300個または約10~50個、約20~60個、約30~70個の連続した塩基であってもよい。プローブにより、結合および/またはハイブリダイゼーションによって核酸が同定される。プローブは本発明のアレイにおいて使用することができる。本発明のプローブはまた、その他の核酸またはポリペプチドを単離するために使用することもできる。

10

【0116】

<配列同一性の程度の決定>

本発明は、配列番号1と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有する核酸を提供する。本発明は、配列番号2と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドを提供する。配列同一性は、配列比較アルゴリズムを用いる解析によって、または目視での確認によって決定することができる。

20

【0117】

蛋白質および/または核酸の配列同一性（相同性）は、本技術分野で公知の種々の配列比較アルゴリズムおよびプログラムのうちのいずれかを使用して評価することができる。核酸配列同一性（相同性）の程度は、例えば米国特許出願公開第2004/0072228号明細書に記載されるような任意のコンピュータプログラムおよび関連パラメーター、例えばBLAST 2.2.2.またはFASTAバージョン3.0t78をデフォルトのパラメーターで用いることにより決定することができる。

30

【0118】

2個またはそれ以上の核酸またはポリペプチド配列に関連して「相同性」および「同一性」という語句は、多くの配列比較アルゴリズムを用いて、またはマニュアルでのアライメントおよび目視での確認によって評価した場合に、同一であるか、または、比較ウィンドウまたは指定領域にわたって最大の一致を示すように比較およびアライメントを行った場合に同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドを特定のパーセンテージ有する、2個またはそれ以上の配列またはサブ配列を表す。配列比較においては、1個の配列を、試験配列に対して比較させる参照配列として作用させることができる。配列比較アルゴリズムを用いる場合には、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、サブ配列コーディネート（subsequence coordinates）を指定し、そして必要な場合にはアルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。デフォルトのプログラムパラメーターを使用することができ、別のパラメーターを指定することもできる。その後、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性のパーセントを計算する。

40

【0119】

本明細書で使用される場合に、「比較ウィンドウ」は、多くの連続した残基のうちのいずれか1つのセグメントへの参照を含む。例えば、本発明の別の態様においては、本発明の代表的なポリペプチドまたは核酸配列、例えば、配列番号1、配列番号2のいずれかの領域における20~完全長の連続した残基を、2個の配列を最適に配列した後に、参照配列のうちの同一の数の連続領域と比較する。参照配列が、本発明の代表的なポリペプチドまた

50

は核酸配列に対して、必要とされる配列同一性、例えば、配列番号1、配列番号2に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有する場合には、その配列は本発明の範囲内に含まれる。

【0120】

2個の核酸またはポリペプチドに関連して「実質的に同一」という語句は、以下に詳細を示すような公知の配列比較アルゴリズムのうちの1つを用いるか、または目視での確認により評価を行った場合に、最大の一致を示すように比較およびアライメントを行った場合には、例えば、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性またはヌクレオチドもしくはアミノ酸残基（配列）同一性を有する2個またはそれ以上の配列を表す。別の態様において、本発明は、本発明の代表的な配列、例えば配列番号1、配列番号2と、少なくとも約10、20、30、40、50残基またはそれ以上の領域にわたって、または、核酸またはポリペプチドの約50残基～完全長の領域にわたって実質的な同一性を有する核酸およびポリペプチド配列を提供する。本発明の核酸配列どうしは、ポリペプチドコード領域の全長にわたって実質的に同一であってもよい。

10

【0121】

< ポリペプチドおよび転写産物の発現の阻害 >

本発明はさらに、本発明の核酸配列に相補的な核酸（例えば、アンチセンス配列）を提供する。アンチセンス配列は、蛋白質をコードする遺伝子、例えば、本発明のPOP2ポリペプチドをコードする核酸のトランスポート、スプライシングまたは転写を阻害することができる。ゲノムDNAまたはメッセンジャーRNAをターゲットすることにより、阻害は達成される。例えば、ハイブリダイゼーションおよび/または切断によって、ターゲットである核酸の転写または機能を阻害することができる。本発明によって提供される特定の連続の有用なインヒビターには、遺伝子またはメッセージのいずれかに結合できるオリゴヌクレオチドが含まれ、いずれの場合にも蛋白質の産生または機能が妨げられるかまたは阻害される。会合は配列特異的なハイブリダイゼーションを通してなされ得る。別の有用な群のインヒビターには、蛋白質メッセージの不活化または切断を引き起こすオリゴヌクレオチドが含まれる。例えばリボザイムのようなオリゴヌクレオチドは、前記の切断を引き起こす酵素活性を有し得る。オリゴヌクレオチドは、化学的に修飾されていても、または相補的核酸を切断できる酵素もしくは組成物に結合していてもよい。多くの異なるこのようなオリゴヌクレオチドのプールを所望の活性に関してスクリーニングすることができる。

20

30

【0122】

遺伝子発現を制御するためのアンチセンス、リボザイム技術およびRNAi技術を用いる方法、または、外因性遺伝子の発現のための遺伝子治療の全般的な方法は、本技術分野において公知である。これらの各方法は、本発明のホスファターゼポリペプチドのアンチセンスまたはリボザイム転写産物のどちらかをコードするベクターのような系を利用する。「RNAi」という語句は、RNA干渉を表す。この語句は、遺伝子を抑えることができるRNA分子を用いる技術を含めると本技術分野において理解されている。「RNAi」という語句には、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、一過性低分子RNA（small temporal RNA：stRNA）のような分子が含まれる。一般的には、RNA干渉は二本鎖RNAと遺伝子との相互作用から生じる。

40

【0123】

< アンチセンスオリゴヌクレオチド >

本発明は、ポリペプチドのメッセージに結合できるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、これは、mRNAをターゲットにすることによってポリペプチド活性を阻害することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法は、科学文献および特許文献に記載されており、当業者は、本発明の新規な試薬を用いてこのようなオリゴヌクレオチドを設計することができる。例えば、効果的なアンチセンスオリゴヌクレオチドをスクリーニングするための遺伝子ウォーキング/RNAマッピングのプロトコルは本技術分野において公知であり（例えば、RNAマッピングアッセイが記載されている「Ho（2000）Methods Enzymol. 314:168-183」参照）、これは、強力なアンチセンス配列選択のための容易かつ

50

確実な方法を提供するための、標準的な分子技術に基づくものである。「Smith (2000) Eur. J. Pharm. Sci. 11:191-198」も参照のこと。

【0124】

天然に存在する核酸を、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして使用することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは任意の長さでよく、例えば、別の態様においては、アンチセンスオリゴヌクレオチドは約5~100、約10~80、約15~60、約18~40である。最適な長さは、日常的なスクリーニングによって決定することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは任意の濃度で存在することができる。最適濃度は日常的なスクリーニングによって決定することができる。膨大な数のオリゴヌクレオチドを製造するために、コンビナトリアルケミストリーの方法を使用することができ、これにより、ターゲットに対して適当な結合アフィニティーおよび特異性を有する特異的オリゴヌクレオチド、例えば本発明のセンスおよびアンチセンスポリペプチド配列に関して迅速にスクリーニングを行うことができる。

10

【0125】

< siRNA >

「低分子干渉RNA」(siRNA)は約10~30ヌクレオチド長の二本鎖RNA分子を表し、RNA干渉(RNAi)により蛋白質の発現を特異的に妨げる能力に由来する。好ましくはsiRNA分子は12~28ヌクレオチド長、より好ましくは15~25ヌクレオチド長、さらに好ましくは19~23ヌクレオチド長、そして最も好ましくは21~23ヌクレオチド長である。従って、好ましいsiRNA分子の長さは12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29ヌクレオチドである。

20

【0126】

RNAiは2段階のメカニズムである。最初に、長いdsRNAはDicerとして知られる酵素によって21~23リボヌクレオチド(nt)断片(small interfering RNA (siRNA)と呼ばれる)に切断される。その後、siRNAはリボヌクレアーゼ複合体(RISC: RNA Induced Silencing Complexと呼ばれる)と会合し、この複合体が相補的なmRNAを標的とする。その後、RISCが相補siRNAの反対側にあるターゲットmRNAを切断し、これによりmRNAが他のRNA分解経路に付される。

【0127】

本発明のsiRNAは、ターゲットリボヌクレオチド配列と相互作用するように設計され、すなわち、これらはターゲット配列と十分に結合するためにターゲット配列と相補的である。ヌクレアーゼ分解に対する安定性を増加させるために化学的に修飾されているが、存在し得るターゲット核酸に結合する能力を維持しているsiRNA分子もまた、本発明に含まれる。

30

【0128】

< 抑制リボザイム >

本発明は、メッセージに結合でき、ターゲットmRNAによるポリペプチド活性を阻害できるリボザイムを提供する(例えば、POP2活性、例えばNFkB阻害活性を有するポリペプチドの阻害)。ターゲットに対するリボザイムの設計および蛋白質特異的なアンチセンス配列の選択の方法は、科学文献および特許文献に記載されており、当業者であれば本発明の新規な試薬を用いてこのようなリボザイムを設計することができる。

40

【0129】

リボザイムは、リボザイムのターゲットRNA結合部分(ターゲットRNAを切断するRNAの酵素部分に非常に近接している)を通してターゲットRNAに結合することによって作用する。従って、リボザイムは相補塩基対を通してターゲットRNAを認識して、ターゲットRNAに結合し、そして、正しい部位に結合するとすぐに酵素的に作用してターゲットRNAを切断し、不活化する。このように行われるターゲットRNAの切断により、切断がコーディング配列において起こった場合には、コードされる蛋白質を直接合成する能力が破壊される。リボザイムがそのRNAターゲットに結合し切断した後は、通常、RNAから離れ、新しい標的に結合および切断を繰り返すことができる。

50

【0130】

ある環境においては、治療的処置に影響を及ぼすのに必要なリボザイムの有効濃度は、アンチセンスオリゴヌクレオチドよりも低くてよいので、リボザイムの酵素的性質は、その他の技術、例えばアンチセンス技術（核酸分子が核酸ターゲットに単に結合することにより、その転写、翻訳または他の分子との会合を遮断する）以上に有利であり得る。この潜在的な利点は、酵素的に作用するリボザイムの能力を示している。従って、1つのリボザイム分子がターゲットRNA分子を数多く切断することができる。さらに、リボザイムは通常特異性の高いインヒビターであり、阻害の特異性は、結合の塩基対合メカニズムだけでなく、文意sが自身が結合するRNAの発現を阻害するメカニズムにも依存する。すなわち、阻害はRNAターゲットの切断により生じ、特異性はターゲットでないRNAの切断速度に対するターゲットRNAの切断速度の比率として定義される。この切断メカニズムは、塩基対合に關与する因子に付加的な因子に依存する。従って、リボザイムの作用の特異性は、同じRNA部位に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドの特異性よりも大きくなり得る。

10

【0131】

酵素的リボザイムRNA分子は、ハンマーヘッド型モチーフで形成され得るが、ヘアピンのモチーフ、デルタ肝炎ウイルス、グループIイントロンまたはRNaseP様RNA（RNAガイド配列に関連して）のモチーフにおいても形成され得る。これらの特異的なモチーフの記載はそれに限定することを意図するものではなく；本発明の酵素的RNA分子がターゲット遺伝子RNA領域のうちの1個またはそれ以上と相補的な特異的基質結合部位を有し、そして、この基質結合部位内またはその周辺に、RNAに分子切断活性を付与するヌクレオチド配列を有することは、当業者であれば理解できることである。

20

【0132】

< ペプチドおよびポリペプチド >

本発明は、少なくとも約40、50、60、70、80、90残基またはそれ以上の領域にわたって、配列番号2と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離または組み換えポリペプチド、または完全長のポリペプチド、または本発明の核酸によってコードされるポリペプチドを提供する。1つの態様において、ポリペプチドは配列番号2に記載される配列を含む。本発明は、POP2ポリペプチド、例えば本発明のポリペプチドの活性を阻害する方法を提供する。本発明はまた、POP2ポリペプチド、例えば本発明のポリペプチドの活性を阻害するかまたはポリペプチドに結合する（例えば、活性部位に結合する）組成物のスクリーニング方法を提供する。

30

【0133】

本発明のペプチドおよびポリペプチドは、上述のような核酸の投与後に、インピボで組み換え技術によって発現させることができ、または、これらは直接、例えば医薬組成物として投与することができる。これらは、POP2活性のモジュレーターに関してスクリーニングを行うために、インピトロまたはインピボで発現させることができる。

【0134】

本発明のポリペプチドおよびペプチドは、天然源から単離されてもよく、合成によりまたは組み換え技術により作製されたポリペプチドでもよい。ペプチドおよび蛋白質は、インピトロおよびインピボで組み換え技術により発現される。本発明のペプチドおよびポリペプチドは、当業者に公知の方法のいずれを用いて作製および単離することができる。本発明のポリペプチドおよびペプチドは、当業者に公知の化学的方法を用いて、全体を、または部分的に合成することができる。例えば、ペプチド合成は、種々の固相技術を用いて行うことができ、例えば、ABI 431Aペプチドシンセサイザー（Perkin Elmer製）を用いて、製造元の説明者に従うことにより自動合成を行うこともできる。

40

【0135】

本発明はまた、本発明の代表的なポリペプチドと「実質的に同一」であるポリペプチドを提供する。「実質的に同一」なアミノ酸配列とは、1個またはそれ以上の保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失または挿入によって参照配列とは相違する配列であり、特にこのような置換は分子の活性部位ではない部位で生じ、そして、ポリペプチドが実質的に

50

その機能特性を保持することを条件とする。保存的アミノ酸置換では、例えば、1個のアミノ酸が別の同一クラスのアミノ酸に置換される（例えば、1個の疎水性アミノ酸、例えばイソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンの別のものへの置換、または、極性アミノ酸の別のものへの置換、例えばアルギニンのリジンへの置換、グルタミン酸のアスパラギン酸への置換またはグルタミンのアスパラギンへの置換）。1個またはそれ以上のアミノ酸を、例えば本発明のPOP2ポリペプチドから欠失させることができ、その結果として、その生物学的活性が著しく変化することなくポリペプチドの構造の改変が起こる。例えば、NFκB阻害活性に必要なアミノ末端またはカルボキシル末端のまたは内部のアミノ酸を除去することができる。

【0136】

当業者には、個々の合成残基およびポリペプチド（これらの模倣体を含む）が科学文献および特許文献（例えば、「Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman, et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY」）に記載される種々の手順および方法を用いて合成できることが理解される。本発明のペプチドおよびペプチド模倣体もまた、コンビナトリアル法を用いて合成することができる。ペプチドおよびペプチド模倣体ライブラリーの作製のための種々の技術はよく知られており、そこには例えば、マルチピン、ティーバッグおよびsplit-couple-mix技術が含まれる。例えば、「al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9:205-223」、「Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:114-119」、「Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27」、「Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267:220-234」参照。本発明の修飾ペプチドを化学修飾法によりさらに製造することができる。例えば、「Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444」、「Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380」、「Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896」参照。

【0137】

本発明のペプチドおよびポリペプチドは、組み換えにより合成したペプチドをより簡単に単離するために、抗体および抗体発現B細胞等を単離し同定するために、融合蛋白質として合成しそして発現させることができ、これは、例えば免疫原性の高いペプチドを産生するように結合させた1種またはそれ以上の追加的ドメインを有する。融合蛋白質をコードするベクターに関する技術および融合蛋白質の利用に関しては、科学文献および特許文献に記載されている（例えば、「Kroll (1993) DNA Cell. Biol., 12:441-53」参照）。

【0138】

本明細書において使用される場合に「ポリペプチド」および「蛋白質」という語句は、ペプチド結合により互いに結合しているアミノ酸を表す。「ポリペプチド」という語句には、ペプチドおよびポリペプチド断片、モチーフ等も含まれる。この語句にはまた、グリコシル化ポリペプチドも含まれる。本発明のペプチドおよびポリペプチドにはまた、全ての「模倣体」および「ペプチド模倣体」形態が含まれる。

【0139】

本明細書において使用される場合に「単離された」という語句は、物質がその元々の環境（例えば、天然に存在するものである場合には天然の環境）から取り出されることを意味する。例えば、生きている動物中に存在する天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然系における一部のまたは全ての共存物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されている。このようなポリヌクレオチドはベクターの一部であり得、そして/またはこのようなポリヌクレオチドもしくはポリペプチドは組成物の一部であり得、そしてこのようなベクターまたは組成物がその天然環境の一部ではないという点においてやはり単離されている。本明細書において使用される場合に、単離された物質または組成物はまた、「精製された」組成物であるかまたは「実質的に純粋」であることができ、すなわち、完全な純度は必要とされず、むしろこれは相対的な定義を意図するものである。ライブラリーから得られる個々の核酸は、電気泳動における均質性のために慣用の方法で精製することができる。別の態様において、本発明は、ゲノムDNAからあるいはライブラリーまたはその他の環境中のその他の配列から、少なくとも1、2、3、4、5回またはそれ以上の増幅によって精製された核酸を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 0 】

代表的なPOP2を以下に記載する；配列番号1は核酸配列であり、配列番号2はそのアミノ酸翻訳である：

配列番号1

atg gca tct tct gca gag ctg gac ttc aac ctg cag gct ctt ctg gag cag ct
c agc cag gat gag ttg agc aag ttc aag tct ctg atc aga aca atc tcc
ctg gga aag gag cta cag acc gtc ccc cag aca gag gta gac aag gct aat ggg aa
g caa ctg gta gaa atc ttc acc agc cac tcc tgc agc tac tgg gca ggg atg gc
a gcc atc cag gtc ttt gaa aag atg aat caa acg cat ctg tct ggg ag
a gct gat gaa cac tgt gtg atg ccc cca cct taa

10

配列番号2

MAS SAE LDF NLQ ALL EQL SQD ELS KFK SLI RTI SLG KEL QTV PQT EVD KAN GKQ LVE IFT
SHS CSY WAG MAA IQV FEK MNQ THL SGR ADE HCV MPP P*

<スクリーニング方法>

本発明の方法の実施においては、例えば、NFκB阻害活性に関してポリペプチドをスクリーニングするために、POP2活性、例えばNFκB阻害活性の潜在的なモジュレーター（例えば、インヒビターまたはアクチベーター）としての化合物、本発明のポリペプチドに結合する抗体、本発明の核酸とハイブリダイズする核酸をスクリーニングするために、本発明のポリペプチド等を発現する細胞をスクリーニングするために、本発明のポリペプチドおよび核酸と併せて、種々の装置および方法を使用することができる。

20

【 0 1 4 1 】

1つの態様において、本発明のペプチドおよびポリペプチドは固体の支持体に結合させることができる。固体の支持体には、例えばメンブレン（ニトロセルロースまたはナイロン）、マイクロタイターディッシュ（例えば、PVC、ポリプロピレンまたはポリスチレン）、試験管（ガラスまたはプラスチック）、ディップスティック（例えば、ガラス、PVC、ポリプロピレン、ポリスチレン、ラテックス等）、マイクロフュージチューブ、または、ガラス、シリカ、プラスチック、金属もしくはポリマービーズ、またはその他の基体、例えば紙、が含まれる。固体の支持体の1つには、ペプチドに付けられたヒスチジンタグと特異的に結合する金属（例えば、コバルトまたはニッケル）含有カラムが使用される。

30

【 0 1 4 2 】

固体支持体へのペプチドの接着は、直接的（すなわち、蛋白質が固体支持体と接触する）でも間接的（特定の化合物が支持体と結合し、ターゲット蛋白質が固体支持体よりもむしろこの化合物に結合する）でもよい。ペプチドは共有結合で（例えば、システイン残基の反応性チオール基を利用する（例えば「Colliuod (1993) Bioconjugate Chem. 4:528-536」参照））、または非共有結合であるが特異的に（例えば、固定化した抗体（例えば、「Schuhmann (1991) Adv. Mater. 3:388-391」；「Lu (1995) Anal. Chem. 67:83-87」参照）；ピオチン/スト렙トアビジン系（例えば、「Iwane (1997) Biophys. Biochem. Res. Comm. 230:76-」参照）；金属キレート、例えばラングミュア・プロジェクト膜（例えば、「Ng (1995) Langmuir 11:4048-55」参照）；ポリヒスチジン融合の結合のための金属キレーティング自己組織化単分子膜（例えば、「Sigal (1996) Anal. Chem. 68:490-497」参照）により）、固定化することができる。

40

【 0 1 4 3 】

間接的結合は、市販されている種々のリンカーを用いることにより得られる。反応性末端は、限定はされないが、アミノ反応性末端、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NH S）活性エステル、イミドエステル、アルデヒド、エポキシド、スルホニルハライド、イソシアネート、イソチオシアネートおよびニトロアリールハライド；およびチオール反応性末端、例えば、ピリジルスルフィド、マレイミド、チオフタルイミドおよび活性ハロゲン、を含む種々の官能基のうちのいずれかでよい。ヘテロ二官能性架橋試薬が2つの反応性末端、例えば、アミノ反応性末端およびチオール反応性末端を有するのに対して、ホモ二官能性試薬は2つの類似の反応性末端、例えば、スルフィドリル含有化合物の架橋を

50

可能にするビスマレイミドヘキサシ（BMH）を有する。スペーサーは様々な長さでよく、脂肪族でも芳香族でもよい。市販されているホモ二官能性架橋試薬の例には、限定はされないが、イミドエステル、例えばアジピイミド酸ジメチル二塩酸塩（DMA）、ピメルイミド酸ジメチル二塩酸塩（DMP）、およびスベリイミド酸ジメチル二塩酸塩（DMS）が含まれる。ヘテロ二官能性試薬には、市販されている活性ハロゲン-NHS活性エステルカップリング剤、例えば、N-スクシンイミジルプロモアセテートおよびN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート（SLAB）およびスルホスクシンイミジル誘導体、例えば、スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート（スルホ-SLAB）（Pierce製）が含まれる。カップリング剤の別の群としては、ヘテロ二官能性およびチオール切断性試薬、例えば、N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）（Pierce Chemicals, Rockford, Ill.）が挙げられる。

10

【0144】

本発明のポリペプチドおよびペプチドを固体の支持体に結合するために抗体を使用することができる。これは、カラムにペプチド特異的抗体を結合させることにより直接行うことができ、または、例えば、公知のエピトープ（例えば、タグ（FLAG、myc））または適当な免疫グロブリンの定常領域ドメイン配列（「イムノアドヘシン」、例えば「Capon (1989) Nature 377:525-531 (1989)」参照）に連結するモチーフ含有ペプチドを含む融合蛋白質キメラを作製することにより行うことができる。

【0145】

<アレイまたは「バイオチップ」>

20

本発明は、POP2活性、例えばNFκB阻害活性のモジュレーター（例えばインヒビターまたはアクチベーター）をアレイを用いて同定/スクリーニングする方法を提供する。低分子、核酸、ポリペプチド（抗体を含む）を含む潜在的なモジュレーターをアレイに固定化することができる。本発明の核酸またはポリペプチドをアレイに固定化またはアブライすることができる。アレイは、本発明の核酸もしくはポリペプチドへの結合、またはこれらの活性、例えばPOP2活性を調節する能力に関して、組成物（例えば、低分子、抗体、核酸等）のライブラリーをスクリーニングまたはモニターするために使用することができる。例えば、本発明の1つの態様において、モニターされるパラメーターは、本発明の核酸を含む遺伝子の転写物発現である。細胞の1種またはそれ以上あるいは全ての転写産物を、細胞の転写産物、または細胞の代表的なもしくは細胞の転写産物に相補的な核酸を含むサンプルのハイブリダイゼーションによって、あるいは、アレイもしくは「バイオチップ」上に固定化された核酸へのハイブリダイゼーションによって測定することができる。マイクロチップ上の核酸の「アレイ」を用いることにより、細胞の転写産物の一部または全てを同時に定量化することができる。あるいは、本発明の方法により新しく作製された株の遺伝子型を決定するためにも、ゲノムの核酸を含むアレイを使用することもできる。ポリペプチドアレイは、複数の蛋白質を同時に定量化するために使用することができる。低分子アレイは、複数のPOP2調節活性または結合活性を同時に解析するために使用することができる。

30

【0146】

本発明は、公知の「アレイ」（「マイクロアレイ」または「核酸アレイ」または「ポリペプチドアレイ」または「抗体アレイ」または「バイオチップ」とも呼ばれる）またはその変法を用いて実施することができる。アレイは通常、複数の「スポット」または「ターゲットエレメント」であり、それぞれのターゲットエレメントは、サンプル分子、例えばmRNA転写産物に特異的に結合するための、基体表面の所定の領域に固定化された所定量の1個またはそれ以上の生物学的分子、例えばオリゴヌクレオチドを含む。本明細書において使用される場合に、「アレイ」または「マイクロアレイ」または「バイオチップ」または「チップ」という語句は、複数のターゲットエレメントであり、それぞれのターゲットエレメントは、基体表面の所定の領域に固定化された所定量の1個またはそれ以上のポリペプチド（抗体を含む）または核酸を含む。

40

【0147】

50

< 抗体および抗体に基づくスクリーニング方法 >

本発明は、本発明のポリペプチドまたは核酸に特異的に結合する単離または組み換え抗体を提供する。これらの抗体は、本発明のポリペプチドまたは関連ポリペプチドを単離、同定または定量化するために使用することができる。これらの抗体は、本発明の範囲内にあるその他のポリペプチドまたはその他の関連するNFκB阻害ポリペプチドを単離するために使用することができる。

【 0 1 4 8 】

「抗体」という語句には、免疫グロブリン遺伝子に由来し、該遺伝子から作製され、または該遺伝子によって実質的にコードされるペプチドまたはポリペプチド、またはこれらの断片が含まれ、これらは抗原またはエピトープに特異的に結合することができる（例えば、「Fundamental Immunology, Third Edition, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)」；「Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273」；「Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97」参照）。抗体という語句には、抗原に結合する能力を保持する抗原結合部分、すなわち「抗原結合部位」（例えば、断片、サブ配列、相補性決定領域（CDRs））が含まれ、これには、（i）VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価の断片であるFab断片；（ii）ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結されている2個のFab断片を含む二価の断片であるF(ab')₂断片；（iii）VHおよびCH1ドメインからなるFd断片；（iv）抗体の1つの腕のVLおよびVHドメインからなるFv断片；（v）VHドメインからなるdAb断片（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546）；および（vi）単離された相補性決定領域（CDRs）が含まれる。一本鎖の抗体もまた「抗体」という語句において参照されることによって含まれる。

10

20

【 0 1 4 9 】

抗体は、免疫沈降、染色（例えば、FACS）、イムノアフィニティークラム等を使用することができる。必要な場合には、特定の抗原をコードする核酸配列を免疫化によって生成させ、それに続いてポリペプチドまたは核酸の単離、増幅またはクローニング、およびポリペプチドの本発明のアレイへの固定化を行うことができる。あるいは、本発明の方法は、細胞によって製造される抗体の構造の改変に使用することができ、改変により、例えば、抗体の親和性を増加または減少させることができる。さらに、抗体を作製または改変する能力は、本発明の方法による細胞への表現型導入であってもよい。

30

【 0 1 5 0 】

免疫化、抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル）の産生および単離の方法は当業者に公知であり、科学文献および特許文献に記載されている。例えば、「Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991)」；「Stites (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (7th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, Calif. ("Stites")」；「Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York, N.Y. (1986)；Kohler (1975) Nature 256:495」；「Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York」参照。抗体はまた、動物を用いる伝統的なインビボでの方法に加え、例えば、組み換え抗体結合部位発現ファージディスプレイライブラリーを用いることにより、インビトロでも生成させることができる。例えば、「Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70；Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45」参照。

40

【 0 1 5 1 】

ポリペプチドまたはペプチドを、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を作製するために使用することができる。得られた抗体は、ポリペプチドを単離または精製するために、またはポリペプチドが生物学的サンプル中に存在するかどうかを測定するために、イムノアフィニティークロマトグラフィー法において使用することができる。このような方法においては、蛋白質調製物、例えば抽出物、または生物学的サンプルを、本発明のポリペプチドのうちの1種に特異的に結合できる抗体と接触させる。

【 0 1 5 2 】

イムノアフィニティークロマトグラフィー法においては、抗体を固体の支持体、例えばビーズまたはその他

50

のカラムマトリックスに結合させる。抗体が本発明のポリペプチドの1つと特異的に結合する条件下で、蛋白質調製物を抗体と接触させる。非特異的に結合した蛋白質を除去するための洗浄の後に、特異的に結合したポリペプチドを溶出させる。

【0153】

生物学的サンプル中における蛋白質の抗体への結合能力は、当業者に知られている種々の方法のうちのいずれかを用いて測定することができる。例えば、結合は、検出可能なラベル、例えば、蛍光試薬、酵素的ラベルまたはラジオアイソトープを用いて抗体をラベルすることによって測定することができる。あるいは、抗体のサンプルへの結合は、前記の検出可能なラベルを有する二次抗体を用いて検出することができる。特定のアッセイには、ELISAアッセイ、サンドイッチアッセイ、ラジオイムノアッセイおよびウエスタンブロットが含まれる。

10

【0154】

本発明のポリペプチドに対して生成するポリクローナル抗体は、動物へポリペプチドを直接注射することにより、またはヒト以外の動物にポリペプチドを投与することにより得ることができる。従って、このようにして得られた抗体はポリペプチド自身に結合する。この方法では、ポリペプチドの断片のみをコードする配列でも、天然ポリペプチド全体に結合する抗体の作製に使用することができる。従って、このような抗体は、ポリペプチドを発現する細胞からポリペプチドを単離するのに使用することができる。

【0155】

モノクローナル抗体の製造には、継続的な細胞株培養によって産生された抗体を提供する技術のいずれかを使用することができる。例えば、ハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハリブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術が含まれる（例えば、「Cole (1985) in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96」参照）。

20

【0156】

一本鎖抗体の産生に関して記載されている技術（例えば、米国特許第4,946,778号明細書）を、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を作製するのに用いることができる。あるいは、トランスジェニックマウスを、これらのポリペプチドまたはその断片に対するヒト化抗体を発現させるために使用することができる。

【0157】

本発明のポリペプチドに対して作製された抗体は、他の生物およびサンプルからの類似ポリペプチドに関するスクリーニングに使用することができる。このような技術においては、生物からのポリペプチドを抗体に接触させ、抗体に特異的に結合するこれらのポリペプチドを検出する。上述のいずれの方法も抗体結合を検出するために使用することができる。

30

【0158】

< 治療への応用 >

本発明の方法によって同定される化合物およびモジュレーターは、種々の治療方法において使用することができる。従って、本発明は、自己免疫疾患もしくは障害またはリンパ腫、またはNF- κ B活性の維持を伴う広いスペクトルの疾患（アルツハイマー病、自己免疫疾患および癌を含む）を治療するための組成物および方法を提供する。

40

【0159】

自己免疫疾患の例としては、急性特発性血小板減少性紫斑病、慢性特発性血小板減少性紫斑病、皮膚筋炎、シデナム舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、糖尿病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、溶連菌感染後体腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、アジソン病、関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形紅斑、IgA腎症、結節性多発性動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血栓性血管炎、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、甲状腺機能亢進症、強皮症、慢性活動性肝炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡、ヴェグナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎

50

縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎 / 多発筋痛症、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎および線維性肺肺炎が挙げられる。

【0160】

< 医薬組成物の製剤化および投与 >

本発明は、本発明の核酸、ペプチドおよびポリペプチド（抗体を含む）を含む医薬組成物を提供する。上述のように、本発明の核酸、ペプチドおよびポリペプチドは内因性POP2ポリペプチドの発現を阻害または活性化するために使用することができる。

【0161】

本発明の核酸、ペプチドおよびポリペプチドは、薬学的に許容されるキャリアー（賦形剤）と組み合わせて医薬組成物を形成させることができる。薬学的に許容されるキャリアーは、例えば、安定化するためにまたは本発明の医薬組成物の吸収もしくはクリアランス率を増加もしくは減少させるために作用し、生理的に許容される化合物を含むことができる。生理的に許容される化合物は、例えば、炭水化物、例えばグルコース、スクロースまたはデキストラン、酸化防止剤、例えばアスコルビン酸またはグルタチオン、キレート剤、低分子量蛋白質、クリアランスまたはペプチドもしくはポリペプチドの加水分解を減少する組成物、または賦形剤またはその他の安定化剤および / またはバッファーを含むことができる。界面活性剤もまた、安定化するために、またはリボソームのキャリアーを含む医薬組成物の吸収を増加もしくは減少させるために使用することができる。薬学的に許容されるキャリアーおよびペプチドおよびポリペプチドに関する製剤は、当業者に知られており、そして技術文献および特許文献に詳細に記載されている。例えば、「the latest edition of Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, P a. (" Remington's ")」を参照のこと。

10

20

【0162】

その他の生理的に許容される化合物には、湿潤剤、乳化剤、分散剤、または特に微生物の増殖もしくは活動を妨げるのに有用な防腐剤が含まれる。種々の防腐剤がよく知られており、例えばフェノールおよびアスコルビン酸が含まれる。当業者には、生理的に許容される化合物を含む薬学的に許容されるキャリアーの選択が、例えば、本発明のペプチドまたはポリペプチドの投与経路に、そして特にその生理化学的特性に依存することは理解されるだろう。

30

【0163】

1つの態様において、本発明の核酸、ペプチドまたはポリペプチドの溶液は、薬学的に許容されるキャリアー、例えば組成物が水溶性の場合には水溶性キャリアーに溶解される。経腸、非経口または経粘膜によるドラッグデリバリー用の製剤に使用できる水溶液の例には、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、ハンクス溶液、リンガー溶液、デキストロース / 生理食塩水、グルコース溶液等が含まれる。製剤は、適当な生理条件に必要な場合には、薬学的に許容される補助物質、例えば、緩衝剤、等張化剤、湿潤剤、界面活性剤等を含むことができる。添加剤にはまた、追加的な活性成分、例えば、殺菌剤または安定化剤が含まれ得る。例えば、溶液には、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレートまたはトリエタノールアミンオレエートが含まれる。これらの組成物は、慣用のよく知られた滅菌技術によって滅菌することができ、またはろ過滅菌を施すこともできる。得られた水溶液は、そのまま使用するためにパッケージ化するか、または凍結乾燥することができ、凍結乾燥調製物は投与前に滅菌水溶液と混ぜ合わされる。これらの組成物におけるペプチドの濃度は、広く変化し得るものであり、選択された特定の投与形態および患者のニーズに従って、主として液体の体積、粘度、重量等に基づいて選択される。

40

【0164】

経腸（経口）投与には、固体の製剤を使用することができる。これらは、例えば、丸薬（pills）、錠剤、散剤またはカプセルとして製剤化することができる。固体の調合物には、慣用の非毒性固体キャリアーを使用することができ、これには、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリ

50

ウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、カルボン酸マグネシウム等が含まれる。経口投与には、通常使用される任意の賦形剤、例えば上述のキャリアー、および通常10%~95%の活性成分（例えばペプチド）を組み込むことにより、薬学的に許容される非毒性組成物を形成させる。非固体製剤もまた、経腸投与に使用することができる。キャリアーは、石油、動物、植物または合成起源の油を含む種々の油、例えばピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等から選択される。好適な薬学的賦形剤には、例えば、澱粉、セルロース、タルク、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、胡粉（chalk）、シリカゲル、ステアリンマグネシウム、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールが含まれる。

10

【0165】

本発明の核酸、ペプチドまたはポリペプチドは、経口的に投与された場合に、消化から保護されてもよい。これは、酸および酵素による加水分解に対して抵抗性を付与するために核酸、ペプチドまたはポリペプチドを組成物と複合体にすることによって、あるいは核酸、ペプチドまたはポリペプチドを適当な抵抗性キャリアー、例えばリボソームにパッケージングすることによって達成することができる。化合物を消化から保護する方法は、当技術分野でよく知られている。例えば、「Fix (1996) Pharm Res. 13:1760-1764」、「Samanen (1996) J. Pharm. Pharmacol. 48:119-135」、治療剤の経口デリバリー用の脂質組成物が記載される米国特許第5,391,377号明細書を参照されたい（リボソームによるデリバリーは以下に詳細に記載する）。

20

【0166】

全身投与はまた、経粘膜的または経皮的な方法によることができる。経粘膜または経皮投与には、浸透を受けるバリアーに対して好適な浸透剤を製剤中において使用することができる。このような浸透剤は本技術分野において広く知られており、例えば、経粘膜投与に関しては、胆汁塩およびフシジン酸誘導体が含まれる。さらに、浸透を促進するために界面活性剤を使用することができる。経粘膜投与は、スプレー式点鼻薬によることができ、または坐剤を用いてもよい。例えば、「Sayani (1996) "Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae" Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 13:85-184」参照。局所、経皮投与に関しては、剤を軟膏、クリーム、サンプ（salve）、パウダーおよびゲル中に製剤化することができる。経皮的送達系にはまた、例えばパッチが含まれる。

30

【0167】

本発明の核酸、ペプチドまたはポリペプチドはまた、持続性送達または持続性放出メカニズムによって投与することができ、これにより製剤を内服的に送達することができる。例えば、ペプチドの持続性送達が可能な生分解性マイクロスフィアもしくはカプセルまたはその他の生分解性ポリマー構造が、本発明の製剤に含まれ得る（「Putney (1998) Nat. Biotechnol. 16:153-157」参照）。

【0168】

吸入のために、本発明の核酸、ペプチドまたはポリペプチドを本技術分野において公知である任意の系を使用して送達することができ、これにはドライパウダーエアロゾル、液体送達系、エアジェット噴霧器、推進剤系（propellant system）が含まれる。例えば、「Patton (1998) Biotechniques 16:141-143」；例えばDura Pharmaceuticals（San Diego, Calif.）、Aradigrn（Hayward, Calif.）、Aerogen（Santa Clara, Calif.）、Inhale Therapeutic Systems（San Carlos, Calif.）によるポリペプチド高分子に関する製品および吸入デリバリーシステム等、を参照のこと。例えば、医薬組成物はエアロゾルまたは噴霧の形態で投与することができる。エアロゾル投与においては、組成物は界面活性剤および推進剤と一緒に微粉化形態で供給することができる。別の態様において、製剤を呼吸組織に送達するための装置は、製剤を気化させる吸入器である。その他の液体デリバリーシステムには、例えばエアジェット噴霧器が含まれる。

40

【0169】

50

本発明の医薬の製造においては、薬物動態および生体内分布を変えるために種々の製剤改変を用いることができる。薬物動態および生体内分布を変えるための多くの方法が当業者において知られている。このような方法の例には、脂質（例えばリポソーム）、炭化水素または合成ポリマー（上述した）のような物質からなる小胞中における本発明の調合物の保護が含まれる。薬物動態に関する一般的な事項に関しては、例えば「Remington's, Chapters 37-39」を参照されたい。

【0170】

<投薬計画：薬物動態>

本発明の医薬組成物は、投与方法に応じて種々の単位投薬形態（unit dosage forms）で投与することができる。通常、核酸、ペプチドおよびポリペプチド医薬組成物に関する用量は、当業者によく知られている。このような用量は、通常は、本来助言的なものであり、特に治療的状況、患者の耐容性等に応じて調節される。これを達成するのに適当な核酸、ペプチドまたはポリペプチドの量を「治療的に有効な用量」と定義する。この用途に有効な投薬スケジュールおよび投薬量、すなわち「投薬計画」は、疾患または状態の段階、疾患または状態の重篤度、患者の健康の全般的な状態、患者の身体状態、年齢、医薬組成物および活性成分の濃度等を含む種々の因子に依存する。患者に対する投薬計画の設定においては、投与方法もまた考慮される。投薬計画ではまた、薬物動態、すなわち医薬組成物の吸収速度、バイオアベイラビリティ、代謝、クリアランス等も考慮されなければならない。

【0171】

当業者が製造および使用できるように充分詳細に説明し、例示したが、本発明の主旨および範囲から逸脱することなく種々の変形、修正および改変が可能であることは理解されるであろう。本発明は目的の達成、および上述の結果および利点の獲得に非常に適合したものである。本明細書における実施例は、好ましい実施態様の代表であって典型的なものを示すものであり、本発明の範囲の限定を意図するものではない。ここでの修正、およびその他の用途は、当業者により想到されるものである。これらの修正は本発明の主旨に包含され、特許請求の範囲によって定義される。

【0172】

引用された全ての刊行物は、参照することにより本明細書に組み込まれ、それぞれが参照により個々に組み込まれるように、それぞれが全体として同じ程度で組み込まれる。

【0173】

上述した有利な点および上述の説明から明らかな有利な点は効果的に維持され、そして、一定の変形は本発明の範囲から逸脱しない前記の構成においてなされるので、これまでの説明に含まれるかまたは添付の図において示される全ての事項は、例示的なものとして解釈されるべきであり、限定を意図するものとして解釈されてはならない。

【0174】

特許請求の範囲が、本明細書に記載される発明の一般のおよび特定の特徴のすべて、および、本発明の範囲内に入り得る本発明の範囲に関する全ての記載をカバーすることをもまた理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0175】

【図1】図1は、POP2の位置を示すヒト3番染色体の図である。

【図2】図2は、POP2を含むコンティグNT_152138の一部分のダイアグラムである。

【図3】図3は、POP2のcDNAおよび蛋白質配列を示す。

【図4】図4は、ヒト、マウスまたはウイルス蛋白質由来の22 pyrinのドメインを有するPOP2蛋白質配列のアライメントである。

【図5】図5は、ASC（上のパネル）またはNALP1（下のパネル）pyrinドメインに基づくPOP2構造予測の骨格構造ダイアグラムを示す。

【図6】図6は、POP2蛋白質および図4に示されるpyrin配列間の系統関係を示す。

【図7】図7は、POP2の発現を示す。

10

20

30

40

50

【図 8】図8は、核および細胞質画分両方へのPOP2の局在化を示す。

【図 9】図9は、TNF- α 誘導性および外因性p65誘導性NF- κ B活性のPOP2による阻害を示す

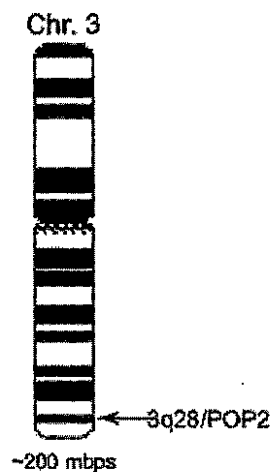
【図 10】図10は、核周辺スペックにおけるPOP2のASCとの共局在化を示す。

【図 1 1】図11は、NF- κ B核局在化におけるPOP2の影響を示す。

【図 1 2】図12は、CIAS1:ASCスベック形成のPOP2による遮断を示す。

【 図 1 】

FIG. 1



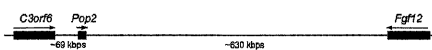
【 図 3 】

FIG. 3

[illegible]

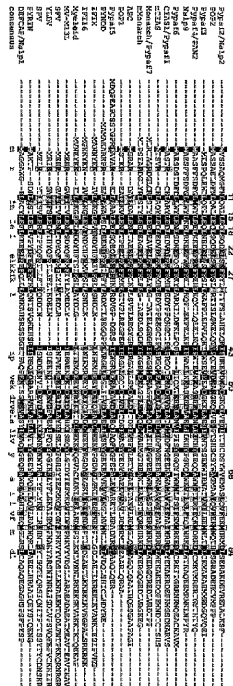
【圖 2】

FIG. 2



【 図 4 】

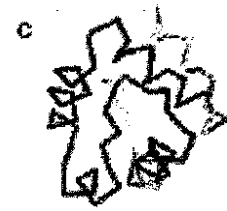
FIG. 4



【 図 5 】

FIG. 5

POP2-ASC Pyp1n model

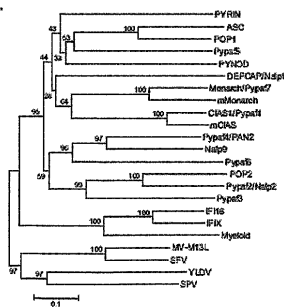


POP2-NALP1 Pyp1n model

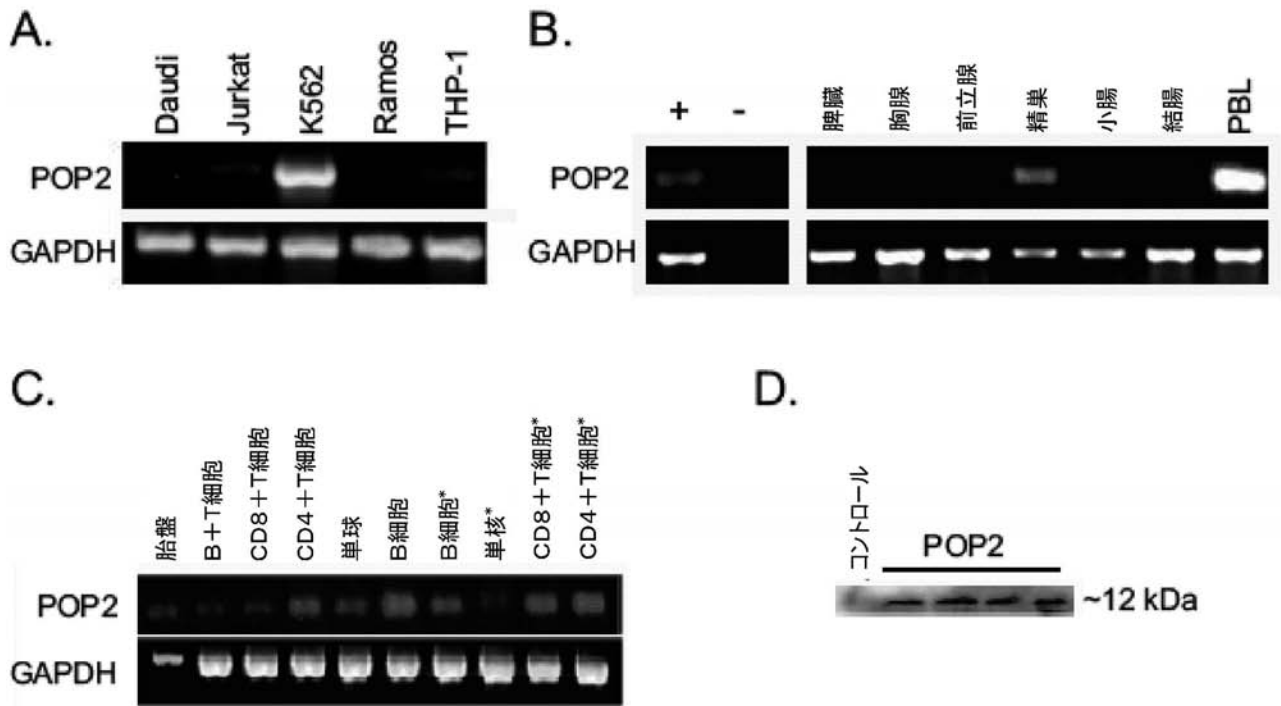


【 図 6 】

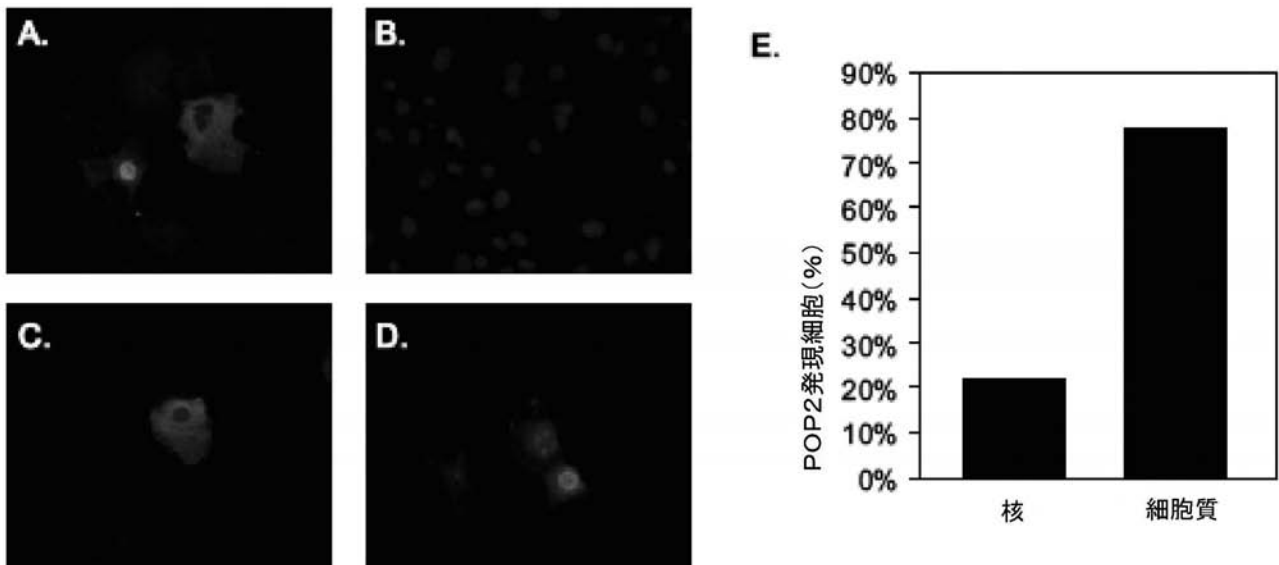
FIG. 6



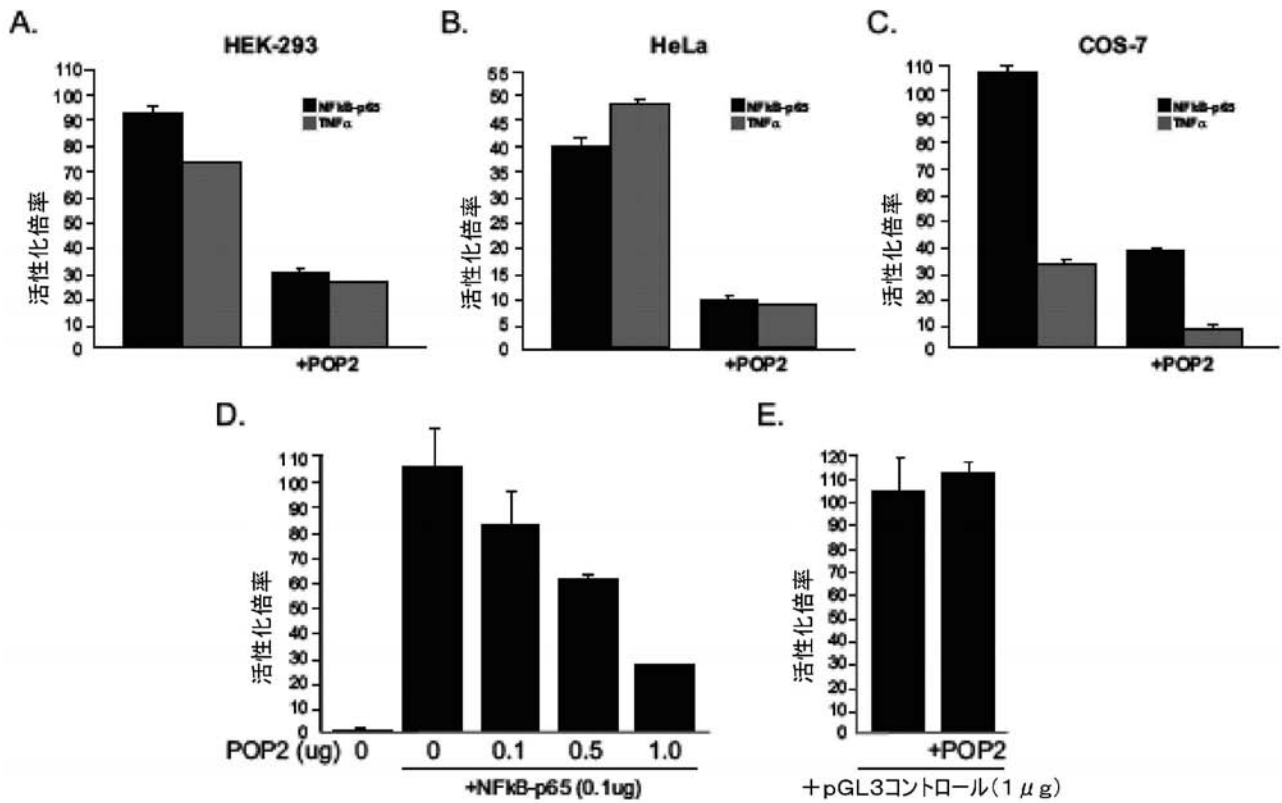
【 図 7 】



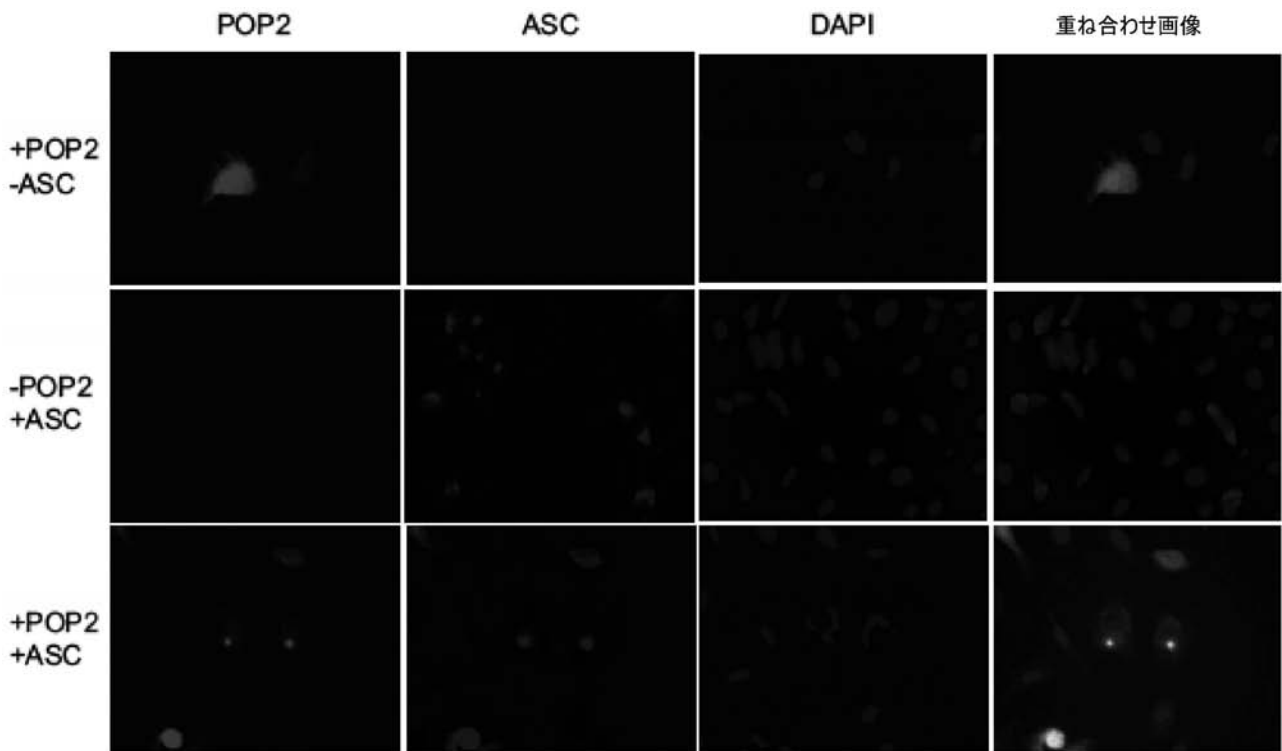
【 図 8 】



【 図 9 】

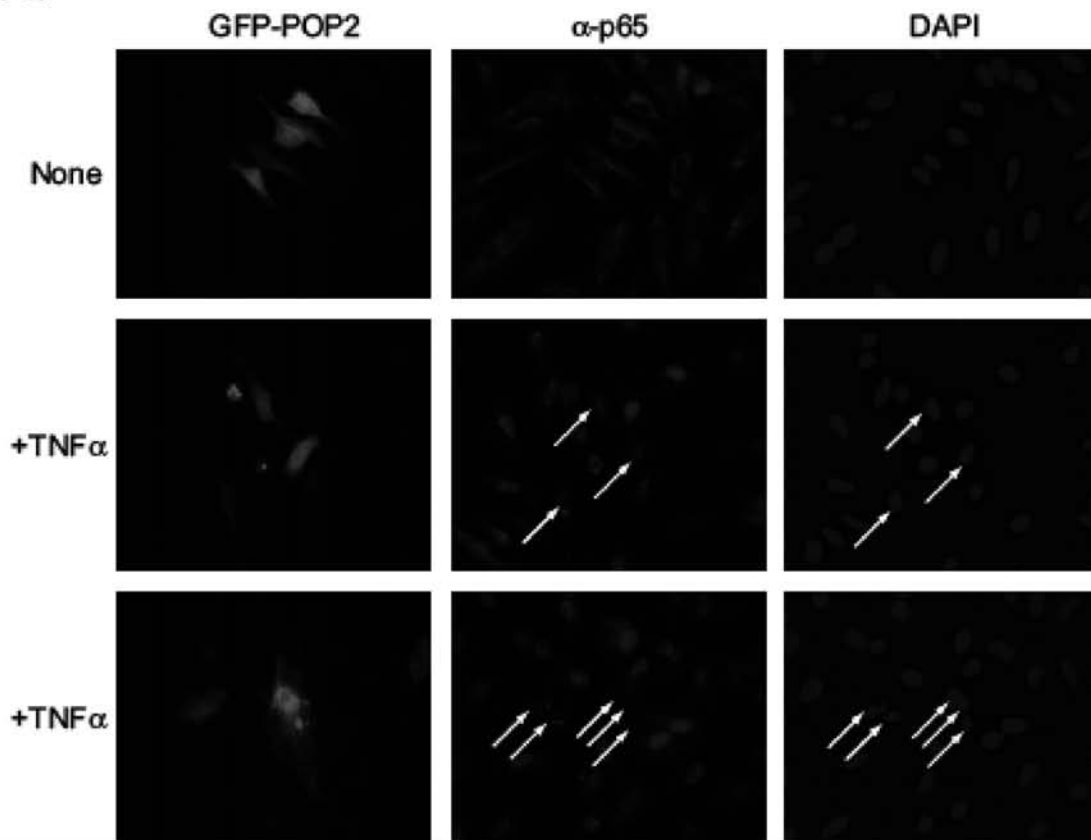


【 図 1 0 】

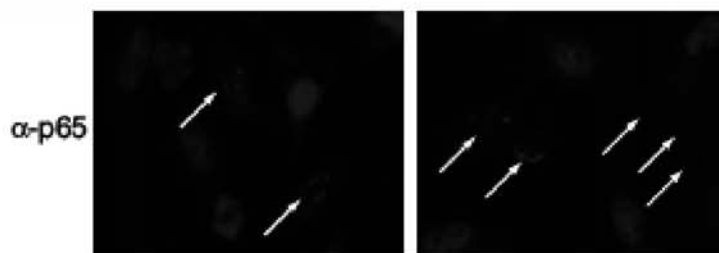


【 図 1 1 】

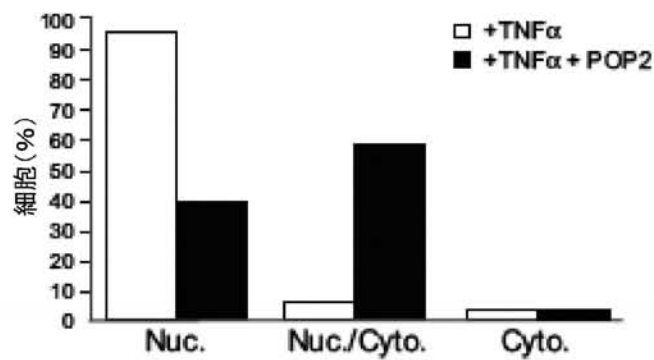
A.



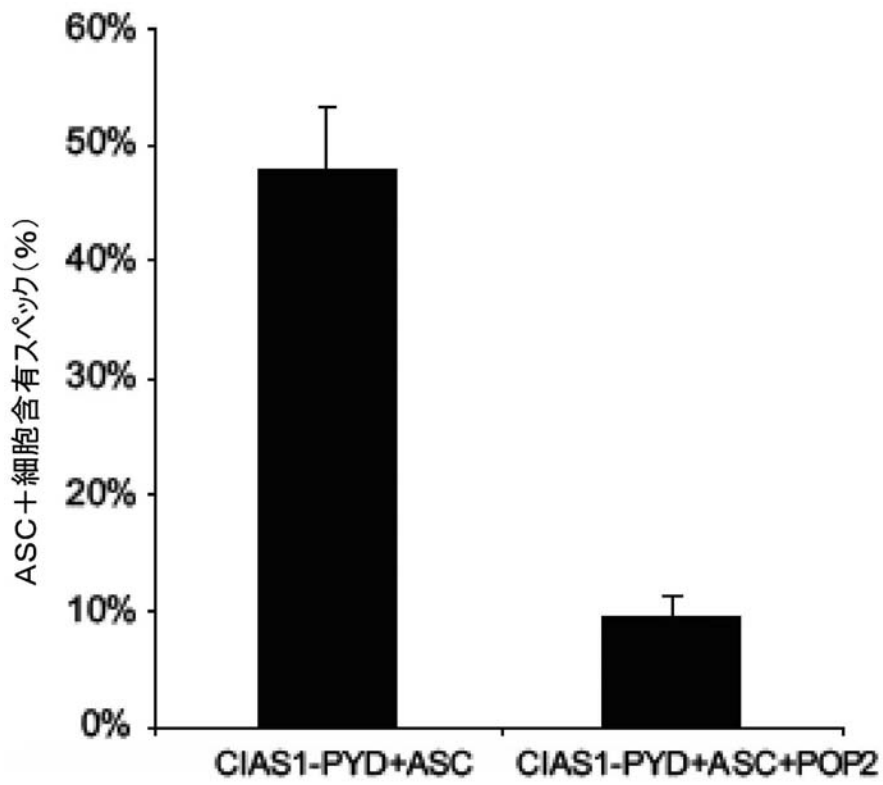
B.



C.



【 図 1 2 】



【 配 列 表 】

2008538285000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/13170										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07H 21/04(2006.01);C07K 1/00(2006.01) USPC: 536/23.5;530/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.5; 530/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, MEDLINE												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	US 2003/0017983 (BERTIN et al) 23 January 2003 (23.01.2003), entire document, especially abstract, claims, and paragraphs 0025, 0090, 0094, 0097-0198, 0229.	1-19										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 08 January 2007 (08.01.2007)		Date of mailing of the international search report 31 JAN 2007										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Gary Nickol, Ph.D. Telephone No. (571) 272-0600										

Form: PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	B	4 C 0 8 6
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	14/47		4 H 0 4 5
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 0 7 K	16/18		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02		
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/14		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	21/04		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/04		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/00		
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	19/08		
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	7/02		
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00		
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	5/14		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/16		
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	A 6 1 P	21/00		
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	A 6 1 P	7/06		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
			G 0 1 N	33/50	Z	
			G 0 1 N	33/15	Z	
			G 0 1 N	33/53	D	
			C 1 2 N	5/00	C	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ベドヤ・フェリペ

アメリカ合衆国、フロリダ州 3 3 6 1 7、タンパ、ベルミード・アベニュー、9 0 5

(72)発明者 サンドラー・ローレル・エル

アメリカ合衆国、フロリダ州 3 3 7 1 0、セント・ピーターズバーグ、イレブンス・アベニュー
・ノース、1 0 4 0

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA02 CA09 CA11 DA02 EA04 GA11
HA12 HA15
4B063 QA18 QQ79 QR32 QR77 QR80 QS05 QS38
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 BD50 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA20 BA23 CA17
MA01 NA14 ZA012 ZA162 ZA182 ZA362 ZA542 ZA552 ZA592 ZA662
ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZB072 ZB112 ZB152 ZB212 ZB262
ZC062 ZC352 ZC412
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA16
ZA18 ZA36 ZA54 ZA55 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94
ZA96 ZB07 ZB11 ZB15 ZB21 ZB26 ZC06 ZC35 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 EA22 EA50 FA72
FA74

【要約の続き】

似性を有すると予測される。CATERPILLER (CLR、NLR、NALP) ファミリー蛋白質中のpyrinドメインに非常に類似しているPOP2は、原型のPyrinおよびASC pyrinドメインではないようである。POP2は主に末梢血白血球において発現しており、トランスフェクションを行った細胞において細胞質および核両方の発現パターンを示す。TNF α 刺激性およびp65 (RelA) 誘導性のNF- κ B依存的遺伝子転写は、NF- κ Bの核内輸送または分布の変化に関連するメカニズムによって、インビトロでPOP2により阻害される。核周辺スペックにおいてASCと一緒に位置するが、POP2はまたCLR蛋白質CIAS1/NALP3によるスペックの形成も阻害する。これらの観察は、POP2が、Pyrinドメイン依存的複合体の集合に影響を及ぼし得るNF- κ B活性の負のレギュレーターであることを示唆するものである。

专利名称(译)	POP2NFkB抑制多肽，核酸和使用方法		
公开(公告)号	JP2008538285A	公开(公告)日	2008-10-23
申请号	JP2008505607	申请日	2006-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	南佛罗里达大学		
申请(专利权)人(译)	南佛罗里达大学		
[标]发明人	ハートンジョナサンエイ ベドヤフェリベ サンドラーローレルエル		
发明人	ハートン・ジョナサン・エイ ベドヤ・フェリベ サンドラー・ローレル・エル		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68 A61K38/00 A61K48/00 A61K31/7105 A61K45/00 A61P43/00 A61P37/02 A61P35/00 A61P25/28 A61P17/00 A61P25/14 A61P21/04 A61P13/12 A61P29/00 A61P17/04 A61P3/10 A61P19/02 A61P25 /00 A61P1/00 A61P9/00 A61P19/08 A61P7/02 A61P7/00 A61P5/14 A61P1/16 A61P21/00 A61P7/06 A61P11/00 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/00 A61P11 /00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/4703 G01N33/6872 G01N2500/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/113 C12Q1/6888 C12Q1/6897 G01N33/5041		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.B C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68.A A61K37/02 A61K48/00 A61K31/7105 A61K45/00 A61P43/00.111 A61P37/02 A61P35/00 A61P25/28 A61P17/00 A61P25/14 A61P21/04 A61P13/12 A61P29/00.101 A61P43/00.105 A61P17/04 A61P3/10 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P1/00 A61P9/00 A61P19/08 A61P7/02 A61P7/00 A61P5/14 A61P1/16 A61P21/00 A61P7/06 A61P11/00 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33 /53.D C12N5/00.C		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024 /AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063 /QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS38 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BD50 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084 /AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA20 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA362 4C084/ZA542 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C084/ZC412 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086 /NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA36 4C086/ZA54 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086 /ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC06 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045 /EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/669283 2005-04-07 US		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明提供了仅含吡啶的新型蛋白质（POP2），多肽和编码它们的核酸，以及制备和使用它们的方法。POP2是位于人类3号染色体上的294 nt单外显子基因，其编码一个97个氨基酸的蛋白质，其序列和与其他吡喃结构域的结构相似性与预测的相似性。POP2与CATERPILLER（CLR，NLR，NALP）家族蛋白中的吡啶结构域高度相似，而它不像原型的Pyrin和ASC吡啶结构域那样。POP2主要在外周血白细胞中表达，并在转染的细胞中显示细胞质和核表达模式。TNF2刺激和p65（RelA）诱导的NF-κB依赖的基因转录在体外受POP2抑制，其机制涉及NF-κB核输入或分布的变化。POP2与ASC在核周斑点中共定位时，还可以抑制CLR蛋白CIAS1 / NALP3形成斑点。POP2是NF-κB活性的负调节剂，可能会影响依赖于吡啶结构域的复合物的组装。

