

(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2006-510570

(P2006-510570A)

(43) 公表日 平成18年3月30日(2006.3.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 14/705 (2006.01)	CO7K 14/705 ZNA	2GO45
CO7K 14/47 (2006.01)	CO7K 14/47	4BO63
CO7K 19/00 (2006.01)	CO7K 19/00	4HO45
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-566185 (P2003-566185)
 (86) (22) 出願日 平成15年2月10日 (2003.2.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年8月5日 (2004.8.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/003923
 (87) 国際公開番号 W02003/066834
 (87) 国際公開日 平成15年8月14日 (2003.8.14)
 (31) 優先権主張番号 60/355,183
 (32) 優先日 平成14年2月8日 (2002.2.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

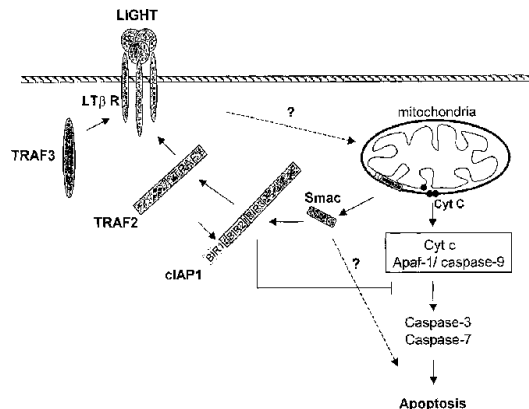
(71) 出願人 504299748
 ワイエス
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 140, ケンブリッジ, ケンブリッジ
 パーク ドライブ 87
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 クアイ, ジュン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 421, レキシントン, ファームクレ
 スト アベニュー 15

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性応答を調節するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、LT Rシグナル伝達を活性化または阻害するリンフォトキシン - レセプター (LT R) 調節因子を含む組成物および方法に関する。LT R調節因子は、リンパ球媒介性免疫疾患および癌を処置するため、より具体的には、ミトコンドリア媒介性アポトーシスを調節するために有用である。本発明は、LT R活性化因子またはLT R阻害因子として作用するLT R複合体タンパク質の可溶性形態に関する。本発明はまた、LT R、そのリガンド、LIGHTおよびLT 1 2、またはその細胞間結合パートナーのいずれかに特異的な、LT Rシグナル伝達を調節するように機能する可溶性分子の使用に関する。LT Rシグナル伝達を調節する可溶性レセプター、抗体および他の因子を選択するための新規のスクリーニング方法が提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リンフォトキシン レセプター (L T R) ポリペプチドおよび S m a s c ポリペプチドを含む、精製された複合体。

【請求項 2】

前記 L T R ポリペプチドが、L T R リガンドに結合されている、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 3】

前記 L T R リガンドが、L I G H T ポリペプチド複合体である、請求項 2 に記載の複合体。

10

【請求項 4】

前記 L T R リガンドが、L t 1 2 である、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 5】

c I A P 1 ポリペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 6】

前記 c I A P 1 ポリペプチドが、ヒト c I A P 1 ポリペプチドのアミノ酸配列を有する、請求項 5 に記載の複合体。

【請求項 7】

T R A F 2 ポリペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 8】

前記 T R A F 2 ポリペプチドが、ヒト T R A F 2 ポリペプチドのアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載の複合体。

20

【請求項 9】

T R A F 3 ポリペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 10】

前記 T R A F 3 ポリペプチドが、ヒト T R A F 3 ポリペプチドのアミノ酸配列を有する、請求項 9 に記載の複合体。

【請求項 11】

原始的なホモログのエンハンサー (E R H) ポリペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の複合体。

30

【請求項 12】

前記 T R A F 2 ポリペプチドが、ヒト T R A F 2 ポリペプチドのアミノ酸配列を有する請求項 11 に記載の複合体。

【請求項 13】

以下：

リンフォトキシン レセプター (L T R) ポリペプチド；

L T R リガンド；

T R A F 2 ポリペプチド；

T R A F 3 ポリペプチド；

c I A P 1 ポリペプチド；および

S m a c ポリペプチド；

E R H ポリペプチド

を含む、精製された複合体。

40

【請求項 14】

前記 L T R リガンドが、L I G H T ポリペプチド複合体である、請求項 13 に記載の複合体。

【請求項 15】

前記 L T R リガンドが、L t 1 2 ポリペプチド複合体である、請求項 14 に記載の複合体。

【請求項 16】

50

腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）ファミリーメンバーシグナル伝達経路の調節因子を同定する方法であって、該方法は、以下：

TNFRファミリーメンバーを発現している細胞と試験因子とを接触させる工程、および

該細胞において該試験因子がミトコンドリア媒介性アポトーシスを調節するか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項 17】

前記TNFRファミリーメンバーが、デスドメインを含まない、請求項16に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記TNFRファミリーメンバーが、リンフォトキシンレセプター（LTR）ポリペプチドである、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

前記LTRが、LTRリガンドに結合されている、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記LTRリガンドが、LIGHTポリペプチド複合体である、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

前記LTRリガンドが、Lt₁₋₂ポリペプチド複合体である、請求項19に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記LTR複合体が、LTRポリペプチド、TRAF3ポリペプチド、TRAF2ポリペプチド、cIAP1ポリペプチド、およびSmacポリペプチドを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 23】

前記調節が、LTR複合体シグナル伝達経路の阻害である、請求項17に記載の方法。

【請求項 24】

前記調節が、LTR複合体シグナル伝達経路の増強である、請求項17に記載の方法。

【請求項 25】

前記細胞におけるSmacポリペプチドの活性を決定する工程を包含する、請求項17に記載の方法。

30

【請求項 26】

前記細胞におけるSmacポリペプチドの発現を決定する工程を包含する、請求項17に記載の方法。

【請求項 27】

cIAP1ポリペプチドまたはTRAF2ポリペプチドと、Smacポリペプチドとの相互作用を決定する工程を包含する、請求項17に記載の方法。

【請求項 28】

請求項16に記載の方法に従って同定された、調節因子。

40

【請求項 29】

リンフォカインレセプター（LTR）複合体シグナル伝達経路の調節因子を同定する方法であって、該方法は、以下：

LTRポリペプチドを発現している細胞と試験因子とを接触させる工程、ならびに
該細胞において該試験因子がSmacポリペプチドの活性または発現を調節するか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項 30】

リンフォカインレセプター（LTR）複合体シグナル伝達経路の調節因子を同定する方法であって、該方法は、以下：

50

L T Rを発現している細胞と試験因子とを接触させる工程、ならびに
 該細胞において該試験因子がc I A P 1ポリペプチドの活性または発現を調節するか否
 かを決定する工程、
 を包含する、方法。

【請求項31】

リンフォカイン レセプター(L T R)複合体シグナル伝達経路の調節因子を同定する
 方法であって、該方法は、以下：

L T Rポリペプチドを発現している細胞と試験因子とを接触させる工程、ならびに
 該細胞において該試験因子がT R A F 2ポリペプチドの活性または発現を調節するか否
 かを決定する工程、
 を包含する、方法。

10

【請求項32】

L T R活性の調節因子を同定する工程であって、該方法は、以下：

T R A F 2ポリペプチド、c I A P 1ポリペプチド、S m a cポリペプチドまたはE R
 Hポリペプチドと試験因子とを接触させる工程、および

該試験因子が該ポリペプチドの活性を調節するか否かを決定し、それによってL T R
 活性の調節因子を同定する工程、
 を包含する、方法。

【請求項33】

前記試験因子が、前記ポリペプチドに直接結合するか否かを決定する工程をさらに包含す
 る、請求項32に記載の方法。

20

【請求項34】

前記試験因子が前記ポリペプチドの活性または発現に影響するか否かを決定する工程をさ
 らに包含する、請求項32に記載の方法。

【請求項35】

L T R複合体シグナル伝達経路の調節因子を同定するための方法であって、該方法は、
 以下：

S m a cポリペプチドと試験因子とを接触させる工程；および

該試験因子が、該S m a cポリペプチドの活性を阻害するか否かを決定し、それによっ
 てL T R複合体シグナル伝達経路のインヒビターを同定する工程、
 を包含する、方法。

30

【請求項36】

免疫障害を処置または予防するための因子を同定する方法であって、該方法は、以下：

腫瘍壊死因子レセプター(T N F R)ファミリーメンバーを発現している細胞と試験因
 子とを接触させる工程、および

該細胞において該試験因子がミトコンドリア媒介性アポトーシスを調節するか否かを決
 定し、それによって免疫障害を処置または予防するための因子を同定する工程、
 を包含する、方法。

【請求項37】

前記T N F Rファミリーメンバーが、デスドメインを含まない、請求項36に記載の方法
 。

40

【請求項38】

前記T N F Rファミリーメンバーが、リンフォトキシン レセプター(L T R)ポリペ
 プチドである、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記免疫障害が、自己免疫障害である、請求項36に記載の方法。

【請求項40】

前記免疫障害が、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群
 、グレーヴズ病、橋本甲状腺炎、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、強皮症、自己免疫性溶血
 性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、多発性筋炎および皮膚筋炎、悪性貧血、シェー

50

グレン症候群、強直性脊椎炎、脈管炎またはⅠ型真性糖尿病である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

癌を処置または予防するための因子を同定する方法であって、該方法は、以下：

腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）ファミリーメンバーを発現している細胞と試験因子とを接触させる工程、および

該細胞において該試験因子がミトコンドリア媒介性アポトーシスを調節するか否かを決定し、それによって癌を処置または予防するための因子を同定する工程、を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

（発明の分野）

本発明は、免疫応答の調節因子を同定するための組成物および方法に関し、より詳細には、リンフォトキシン - レセプター（LTR）複合体のメンバーを使用して、免疫応答の調節因子を同定するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

（発明の背景）

リンフォトキシン - レセプター（LTR）（腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）ファミリーの非デスドメイン含有レセプター）は、二次的リンパ様組織の器官発生において重要な役割を果たすことが報告される。LTR に対する 2 つのレセプターの型が、記載される。これらは、ヘテロトリマー（LT 1 2）およびホモトリマー（LIGHT）として同定された。

20

【0003】

LTR シグナル伝達は、リガンドの結合の際に、レセプターの細胞内ドメインに入れられるシグナル伝達分子によって媒介されると考えられる。TNFR ファミリーの他のメンバーと同様に、複数のシグナル伝達経路（アポトーシス、NF B および JNK 経路の活性化を含む）は、リガンド - LTR 複合体によって活性化される。

【0004】

30

アポトーシス、またはプログラム細胞死は、正常な細胞自殺機能である。アポトーシスの 2 つの主要なシグナル伝達経路（デスレセプター経路およびミトコンドリア経路）が存在する。両方の経路からのシグナルは、カスパーゼの共通のカスケードの活性化を導き、これは、続いて、膨大な数の細胞性タンパク質を切断し、細胞死を導く。デスドメイン含有レセプターのほとんどは、FADD のリクルートおよびカスパーゼ 8 の活性化によってアポトーシスを誘導する。対照的に、LTR は、デスドメイン配列を欠損し、従って、FADD と相互作用しない。さらに、LTR によって誘導される細胞死は、遅いアポトーシスプロセスの特徴を有し、インターフェロン に依存性である。従って、LTR 誘発アポトーシスは、デスドメイン依存性機構と異なる機構によって活性化されると考えられる。

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

（発明の要旨）

本発明は、リンフォトキシン - レセプター（LTR）複合体シグナル伝達経路に関連するポリペプチドの発見に一部基づく。ポリペプチド Smac、cIAP1、および TRAF2、ならびに原始的なホモログのエンハンサー（enhancer of rudimentary homologue: ERH）は、これらの新規に同定された LTR の成分に含まれる。LTR 複合体と結合することが以前に示された TRAF3 もまた、同定される。Smac は、ミトコンドリア媒介性アポトーシス経路に関与することが報告

50

された。

【0006】

従って、1つの局面において、本発明は、(L T R)ポリペプチドおよびS m a cポリペプチドを含む精製された複合体を提供する。好ましい実施形態において、L T Rポリペプチドは、L T Rリガンドに結合される。L T Rリガンドは、L I G H TポリペプチドまたはL t 1 2ポリペプチドのいずれかであり得る。複合体はまた、c I A P 1ポリペプチド、T R A F 3ポリペプチド、およびT R A F 2ポリペプチドを含み得る。これらのポリペプチド由来のアミノ酸配列は、哺乳動物(例えば、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類、または別の真核生物(例えば、D r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e r))由来のアミノ酸配列であり得る。好ましい実施形態において、これらのポリペプチドは、ヒトアミノ酸配列を有する。

10

【0007】

別の局面において、本発明は、L T Rポリペプチド、L T Rリガンド、T R A F 2ポリペプチド、T R A F 3ポリペプチド、c I A P 1ポリペプチド、およびS m a cポリペプチドを含む精製複合体を含む。

【0008】

別の局面において、本発明は、T N F Rファミリーメンバーを発現する細胞を、試験薬剤と接触させ、そしてこの試験薬剤が細胞中のミトコンドリア媒介性アポトーシスを調節するかどうかを決定することによって、腫瘍壊死因子レセプター(T N F R)ファミリーメンバーシグナル伝達経路の調節因子を同定する方法を包含する。好ましい実施形態において、T N F Rファミリーメンバーは、デスドメインを含まない。別の実施形態において、T N F Rファミリーメンバーは、L T Rポリペプチドである。別の好ましい実施形態において、L T R複合体は、L T R、T R A F 3、T R A F 2、c I A P 1、およびS m a cポリペプチドを含む。試験薬剤は、L T Rシグナル伝達活性を阻害するか、または活性化するかのいずれかであり得る。好ましい実施形態において、調節因子は、細胞内のS m a cポリペプチドの活性または発現を決定することによって、あるいは、c I A P 1ポリペプチドまたはT R A F 2ポリペプチドのS m a cポリペプチドとの相互作用を決定することによって同定される。

20

【0009】

本発明は、L T Rポリペプチドを発現する細胞を試験薬剤と接触させ、この試験薬剤が、細胞中におけるS m a cポリペプチドの活性または発現を調節するかどうかを決定することによって、リンフォトキシンレセプター(L T R)複合体のシグナル伝達経路の調節因子を同定する方法をさらに提供する。

30

【0010】

別の局面において、本発明は、L T Rを発現する細胞を試験薬剤と接触させ、この試験薬剤が、細胞中におけるc I A P 1ポリペプチドの活性または発現を調節するかどうかを決定することによって、L T R複合体のシグナル伝達経路の調節因子を同定する方法を提供する。

【0011】

別の局面において、本発明は、L T Rを発現する細胞を試験薬剤と接触させ、試験薬剤が、細胞中におけるT R A F 2ポリペプチドの活性または発現を調節するかどうかを決定することによって、L T R複合体のシグナル伝達経路の調節因子を同定する方法を提供する。

40

【0012】

別の局面において、本発明は、試験薬剤をT R A F 2ポリペプチド、c I A Pポリペプチド、またはS m a cポリペプチドと接触させ、この試験薬剤が、ポリペプチドの活性を調節するかどうかを決定し、それによって、L T R活性の調節因子を同定することによって、L T R活性の調節因子を同定する方法を提供する。好ましい実施形態において、本方法は、試験薬剤がポリペプチドに直接結合するかどうか、および試験薬剤がポリペプチドの活性または発現に影響するかどうかを決定する工程をさらに包含する。

50

【0013】

別の局面において、本発明は、Smacポリペプチドを試験薬剤と接触させ；そして、この試験薬剤がSmacポリペプチドの活性を阻害するかどうかを決定し、それによってLT_R複合体のシグナル伝達経路のインヒビターを同定することによって、LT_R複合体のシグナル伝達経路の調節因子を同定する方法を提供する。

【0014】

別の局面において、本発明は、腫瘍壊死因子レセプター(TNFR)TNFRファミリーメンバーを発現する細胞を試験薬剤と接触させ、そしてこの試験薬剤が細胞におけるミトコンドリア-媒介性アポトーシスを調節するかどうかを決定し、それによって、免疫障害を処置するかまたは予防するための薬剤を同定することによって免疫障害を処置するかまたは予防するための薬剤を同定するための方法を包含する。好ましい実施形態において、TNFRファミリーメンバーは、デスドメインを含まず、リンフォトキシンレセプター(LT_R)ポリペプチドである。本発明は、免疫障害を処置するために有用な薬剤を同定するために使用され得、この免疫障害は、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、グレーヴズ病、橋本甲状腺炎、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、強皮症、自己免疫溶血性貧血、自己免疫特発性血小板減少性紫斑病、多発性筋炎および皮膚筋炎、悪性貧血、シェーグレン症候群、強直性脊椎炎、脈管炎またはI型糖尿病から選択されるが、これらに限定されない。

10

【0015】

さらなる局面において、本発明は、TNFRファミリーメンバーを発現する細胞を試験薬剤と接触させ、この試験薬剤が、細胞におけるミトコンドリア媒介性アポトーシスを調節するかどうかを決定し、それによって癌を処置または予防するための薬剤を同定することによって、癌を処置または予防するための薬剤を同定するための方法を提供する。

20

【0016】

上記スクリーニング法によって同定される調節因子もまた、本発明の範囲内であり、そしてこれらのインヒビターを使用して、免疫応答を調節する方法は、本発明の範囲内である。

【0017】

他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術的用語および科学的用語は、本発明の属する当該分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似するかまたは等価である方法および材料は、本発明の実施および試験において使用され得、適切な方法および材料は、以下に記載される。本明細書中に記載される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参考として援用される。矛盾する場合において、定義を含む本明細書が、制御する。さらに、材料、方法および実施例は、例示のみであり限定することを意図しない。

30

【0018】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【0019】

(発明の詳細な説明)

本発明は、リンフォトキシンレセプター(LT_R)調節因子を同定するための方法を提供し、この調節因子は、LT_Rシグナル伝達を活性化または阻害し得る。LT_Rまたは複合体のメンバー(本明細書中で新規に同定されたメンバーを含む)は、薬剤として使用され得るか、または薬剤に対する標的として働き、これは、ミトコンドリアアポトーシスを阻害するかまたはミトコンドリアアポトーシスのLT_R媒介性阻害を刺激するために使用され得、例えば、異常な細胞増殖をブロックするかまたは培養中の細胞増殖を継続する。本明細書中で同定される調節因子は、免疫状態および癌を含む種々の徴候を処置するために使用され得る。好ましい徴候は、慢性関節リウマチである。

40

【0020】

以下の用語は、これらが本明細書中で使用される以下の一般的な意味を有することが意

50

図される。

【0021】

用語「アポトーシス」は、プログラム細胞死のプロセスをいう。

【0022】

用語「サイトカイン」は、細胞間の相互作用を媒介する分子をいう。「リンフォカイン」は、リンパ球によって放出されるサイトカインである。

【0023】

用語「L T R調節因子」は、L T Rに対するリガンド結合、細胞表面L T Rクラスター化またはL T Rシグナル伝達を活性化または阻害し得る任意の薬剤あるいはL T Rシグナルが細胞内で解釈される方法に影響し得る任意の薬剤をいう。L T R活性化剤の例としては、I F N - α 、I F N - γ 、T N F、可溶性抗 - L T R抗体、架橋された抗L T R抗体および多価抗 - L T R抗体、可溶性L I G H Tポリペプチドまたは可溶性L t 1 2ポリペプチドが挙げられる。

10

【0024】

用語「L T Rシグナル伝達」は、L T R経路およびそこから生じる続いての分子反応に関連する分子反応をいう。

【0025】

用語「実質的に純粋な」ポリペプチドは、天然にそれと共に存在する成分から分離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を意味する。代表的には、天然に関連するタンパク質および天然に存在する有機分子を、少なくとも60重量%含まない場合、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、実質的に純粋である。好ましくは、調製物の純度は、少なくとも75重量%であり、より好ましくは少なくとも90重量%であり、そして最も好ましくは少なくとも99重量%である。

20

【0026】

(リンフォトキシン - レセプター関連ポリペプチド)

本発明は、リンフォトキシン - レセプター複合体の成分として同定されたポリペプチドを包含する。L T b R複合体のこれらに新たに同定されたメンバーとしては、T R A F 2、c I A P 1、およびS m a cが挙げられる。

【0027】

S m a cは、ミトコンドリアタンパク質であるが、アポトーシスの間に、シトクロム c の放出と同時に細胞質ゾルに放出される。次いで、細胞質ゾルS m a cは、c I A P 1との相互作用を介してレセプターに動員され、そしてc I A P 1によるアポトーシスの阻害を軽減する。c I A P 1は、カスパーゼの活性を阻害することによって、アポトーシスを阻害すると報告されている。

30

【0028】

これらのポリペプチドのアミノ酸配列が、以下に提供される。T R A F 2およびS m a cの核酸配列については、さらに提供される。

【0029】

T R A F 2ポリペプチドのアミノ酸配列が、以下に提供される：

【0030】

40

【化1】

MAAASVTPPGSLELLQPGFSKTLGLGKLEAKYLCSACRNVLRRPFQAQCGHRYCSFCLASILSSGPQNCA
ACVHEGIYEYEGISILESSAFPDNAARREVESLPAVCPDGDGCTWKGTLKEYESCHEGRCPLMLTECPACK
GLVRLGKERHLEHECPERSLSRHCRAPCCGADVKAHHEVC PKFPLTCDGCGKKKI PREKFQDHVKTCG
KCRVFCRFHAIGCLETVEGEKQEHEVQWLREHLAMLSSVLEAKPLLGDQSHAGSELLQRCESLEKKT
TFENIVCVLNREVERVAMTAEACSRQHRLDQDKIEALSSKVQQLERSIGLKDLAMADLEQVRRPFQAQCG
HRYCSFCLASILRKLQEAVAGRI PAIFSPAFYTSRYGKMLRIYLNQDGTGRGTHLSLFFVVMKGPND
LLRWPFNQKVTMLLDQNNREHVIDAFRDPVTS SSSQRPVNDMNIASGCPLEFCPVSKMEAKNSYVRDDAI
FIKAIVDLTGL (配列番号 1)

開示されるT R A F 2アミノ酸配列をコードする核酸配列が、以下に提供される：

【0031】

【化2】

atggctgcagctagcgtgacccccctggctccctggagttgctacagcccggcttctccaagaccctcctggg
 accaagctggaagccaagtagcctgtgctccgcctgcagaaacgtcctccgagggccttccaggcgcagtgtggc
 caccggtaactgctccttctgctggccagcatcctcagctctgggctcagaactgtgctgctgtgttcacgag
 ggcatatatagaagaaggcatttctattttagaaagcagttcggccttcccagataatgctgcccgcaggggaggtg
 gagagcctgcccggcctgtgctccagtgatggatgcacctggaaggggacccctgaaagaatagagagctgccac
 gaagggcctgcccgtcatgctgaccgaatgtcccgggtgtaaaggcctggctccgccttgggtaaaggagcgc
 cacctggagcacgagtgcccggagagaagcctgagctgccggcattgccgggacccctgctgaggagcagacgtg
 aaggcgcaccacgaggtotgcccccaagttccccttaacttggacggctgcccgaagaagaatccccgggag
 aagtttcaggagccagctcaagacttgggcaagtgctgagctcccttgagattccacgccatcggctgctcgag
 acggttagagggtagaacaacagcaggagcagaggtgagtggtgcccgggagcactggccatgctactgagctcg
 gtgctggaggcaagcccctctgggagaccagagccacgggggtcagagctcctgcagaggtgcgagagcctg
 gagaagaagacggccacttttgagaacattgtctgctcctgaaccgggaggtggagaggggtggccatgactgcc
 gaggcctgcagccggcagcaccggctggaccaagacaagattgaagccctgagtagcaaggtgcagcagctggag
 aggagcattggcctcaaggacctggcgatggctgacttggagcagaaggtcaggcccttccaggcgcagtgtggc
 caccggtaactgctccttctgctggccagcatcctcaggaagctccaggaagctgtggctggccgcatacccgc
 atcttctccccagcctctacaccagcaggtacggctacaagatgtgtctgctatctacctgaaccggcagcggc
 accgggagcaggaacaacactgtccctctctttgtggtgatgaagggcccgaatgacgccctgctgcccgtggccc
 tcaaccagaaggtgacctaatgctgctgaccagaataaccgggagcagctgattgacgccttccaggcccagc
 gtgacttcatcctctttcagaggccagtaacagacatgaacatcgcaagcggctgccccctcttctgcccgtc
 tccaagatggaggcaagaattcctacgtgcccggagcagtgccatcttcatcaaggccattgtggacctgacaggg
 ctctaa (配列番号 2)

10

I A P 1 ポリペプチドのアミノ酸配列が、以下に示される：

【0032】

【化3】

MHKTASQRLFPGPSYQNIKISIMEDSTILSDWTNSNKQKMKYDFSCELYRMSTYSTFPAGVPSERSLARA
 GFYYTGVNDKVKCFCCGLMLDNWKLGDSPIQKHQQLYPSCSFIQNLVVSASLGSTSKNTSPMRNSFAHSL
 PTLHSSLSFSGSYSSLSPNPLNSRAVEDISSRTNPYSYAMSTEEARFLTYHMWPLTFLSPSELARAGFY
 YIGPGDRVACFACGGKLSNWEPKDDAMSEHRRHFNCPFLENSLETLRFSISNLSMOTHAARMRTFMYWP
 SSVVPQPEQLASAGFYVGRNDDVKCFCCDGLRCWESGDDPWVEHAKWFPRCEFLIRMKGQEFVDEIQG
 RYPHLLLEQLLSTSDTTGEENADPPIIHFPGESSSEDAVMMNTPVVKSALEMGFNRDLVKQTVQSKILTT
 GENYKTVNDIVSALLNAEDEKREEEKEKQAEEMASDDLRLKRNRMALFQQLTCLVLPILDNLLKANVINK
 QEHDIIKQKTQIPLQARELIDTILVKGNAAANIFKNCLKEIDSTLYKNLFVDKMKYIPTEDVSGLSLEE
 QLRLRQEERTCKVKCMDKEVSVVFI PCGHLVVCQECAPSLRKCPICRGLIKGTVRTFLS (配列番号 3)

20

S m a c ポリペプチドのアミノ酸配列が、以下に示される：

【0033】

【化4】

MAALKSWLSRSVTSFFRYRQCLCVPVVANFKKRCFSELIRPWHRTVTIGFVTLCAVPIAQKSEPHSLSS
 EALMRRRAVSLVTDSTSTFLSQTTYALIEAITEYTKAVYTLTSLYRQYTSLLGKMNSEEEDEVWQVILGAR
 AEMTSKHQEYLKLETTWMTAVGLSEMAAEAAAYQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAETKLA
 AQIEELRQKTQEEGERAESEQAYLRED (配列番号 4)

30

開示される S m a c ポリペプチドをコードする核酸配列が、以下に示される：

【0034】

【化5】

Atggcggctctgaagagttggctgtcgcgacagcgttaacttattcttccaggtacagacagtgcttggctgctcct
 gttgtggctaaactttaagaagcgggtgttctcagaattgataagaccatggcacagaactgtgacgattggcttt
 ggagtaacctgtgtgcccgttctattgacagaaaatcagagcctcattcccttagtagtgaaagcattgatgagg
 agagcagtgcttgggtaacagatagcacctctaccttctctcagaccacatagcgttgattgaagctatt
 actgaataactaaggctgtttataccttaacttctcttaccgacaatatacaagtttacttgggaaaatgaat
 tcagaggaggaagatgaagtgtggcaggtgatcataggagccagagctgagatgacttcaaaacaccaagatc
 ttgaagctggaaaccacttggatgactgcagttggctcttcagagatggcagcagaagctgcatcaaaactggc
 gcagatcaggcctctataaccgcccaggaatcacattcagctgggtaaactgcaggtggaagaggtgcaccagctc
 tcccggaaaagcagaaccaagctggcagaagcacagatagaagagctccgtcagaaaacacaggaggaaggggag
 gagcgggctgagtcggagcaggaggcctacctgctgaggattga (配列番号 5)

40

見出された原始的なホモログのエンハンサー (E R H) ポリペプチドのアミノ酸配列が、以下に示される：

【0035】

【化6】

MSHTILLVQPTKRPEGRTYADYESVNECMGVCKMYEEHLKRMNPNSPSITYDISQLFDFIDDLADLSCL
 VYRADTQTYQPNKDWIKEKIYVLLRRQAQQAGK (配列番号 6)

50

開示される E R H ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、以下に示される：

【0036】

【化7】

```
atgtctcacaccatTTTgctggtacagcctaccaagaggccagaaggcagaacttatgctgactacgaatctgtg
aatgaatgcatggaaggtgtttgtaaaatgtatgaagaacatctgaaaagaatgaatcccaacagtcctctatc
acatatgacatcagtcagttgtttgatttcacatcgatgatctggcagacotcagctgcttggtttaccgagctgat
accagacataaccagccttataacaaagactggattaaagagaagatctacgtgctccttcgtcggcaggcccaa
caggctgggaataa ( 配列番号 7)
```

本発明のタンパク質複合体は、上で開示した2つ以上のポリペプチドを、種々の実施形態において、L T R レセプター、L T R リガンド(例えば、L I G H T)、および T R A F 3 ポリペプチドと共に含む。好ましい L T R 複合体としては、L T R レセプター、L I G H T、T R A F 2、c I A P 1、E R H、および T R A F 3 が挙げられる。複合体は、例えば、天然の供給源からの抽出によってか、この複合体のメンバーをコードする組換え核酸の発現によってか、ポリペプチドフラグメント融合タンパク質の発現によってか、またはキメラ合成によって得られ得る。化学的に合成されたポリペプチド、または天然に存在する細胞とは異なる細胞系において産生されたポリペプチドは、定義によれば、そのポリペプチドが天然に付随する成分を実質的に含まない。従って、実質的に純粋なポリペプチドとしては、真核生物由来であるが E . c o l i または他の原核生物の組換え細胞内で合成されたポリペプチドが挙げられる。純度は、任意の適切な方法(例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、または H P L C 分析)によって測定され得る。

【0037】

(L T R シグナル伝達の調節)

本発明は、リンフォトキシン (l y m p h o x i n) レセプターシグナル伝達を調節する薬剤を同定する方法をさらに提供する。この方法としては、上で開示される1つ以上の L T R 複合体ポリペプチドの存在およびまたは活性に依存する方法が挙げられる。

【0038】

L T R 複合体は、腫瘍壊死因子 (T N F) - レセプターのメンバーである。T N F 関連サイトカインは、宿主の防御および免疫調節の多面発現性媒介物質の大きいファミリーとして出現した。このファミリーのメンバーは、細胞 - 細胞接触を介して局所的に作用する、膜結合形態で存在するか、または離れた標的に作用し得る分泌タンパク質として存在する。T N F 関連レセプターの平行なファミリーは、これらのサイトカインと反応し、そして種々の経路(細胞死、細胞増殖、組織分化および炎症誘発応答が挙げられる)を誘発する。

【0039】

非腫瘍形成性細胞において、T N F および T N F ファミリーリガンド - レセプター相互作用の多くは、免疫系の発達および種々の免疫チャレンジに対する応答に影響を与える。L T R (レセプターの T N F ファミリーのメンバー)は、表面 L T R リガンドに特異的に結合する。L T R によるシグナル伝達は、末梢リンパ様器官の発達および体液性免疫応答において、役割を果たし得る。L T R シグナル伝達もまた、T N F - R シグナル伝達と同様に、抗増殖効果を有し、そして腫瘍細胞に対して細胞傷害性であり得る。L T R m R N A は、ヒトの脾臓、胸腺および他の主要な器官において見出され、L T R 発現パターンは、L T R が、末梢血 T 細胞および T 細胞株を欠くことを示す。従って、本明細書中に記載されるスクリーニング方法において同定される薬剤は、種々の適応症を処置するために使用され得る。

【0040】

1つの局面において、L T R シグナル伝達を調節し得る薬剤は、ミトコンドリア媒介性アポトーシスのブロックによって、それらの能力に基づいて選択される。L T R シグナル伝達経路の調節因子は、L T R を発現する細胞を試験薬剤と接触させ、そしてこの試験薬剤がこの細胞においてミトコンドリア媒介性アポトーシスを媒介するか否かを決定することによって、同定される。あるいは、薬剤は、この薬剤が細胞において c I A P 1

10

20

30

40

50

、T R A F 2、またはS m a c ポリペプチドの活性または発現を調節するか否かを決定することによって、選択され得る。

【0041】

一般に、任意の化合物が、試験薬剤として使用され得る。適切な試験薬剤としては、例えば、タンパク質、核酸、炭水化物、または低分子が挙げられる。例えば、試験薬剤は、当該分野において公知であるコンビナトリアルライブラリー方法における多数のアプローチのいずれかを使用して、得られ得る。このライブラリーとしては、生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行な固相もしくは溶液相のライブラリー；逆重畳を必要とする合成ライブラリー方法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー方法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー方法が挙げられる。生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、一方で他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは低分子の化合物のライブラリーに適用可能である(Lam(1997)Anticancer Drug Des 12:145)。

10

【0042】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば、以下において見出され得る：DeWittら(1993)Proc Natl Acad Sci U.S.A. 90:6909；Erbら(1994)Proc Natl Acad Sci U.S.A. 91:11422；Zuckermannら(1994)J Med Chem 37:2678；Chorら(1993)Science 261:1303；Carrellら(1994)Angew Chem Int Ed Engl 33:2059；Carellら(1994)Angew Chem Int Ed Engl 33:2061；およびGallopら(1994)J Med Chem 37:1233。

20

【0043】

化合物のライブラリーは、溶液中(例えば、Houghten(1992)BioTechniques 13:412-421)、またはビーズ上(Lam(1991)Nature 354:82-84)、チップ上(Fodor(1993)Nature 364:555-556)、細菌上(Ladner 米国特許第5,223,409号)、胞子上(Ladner USP'409)、プラスミド上(Cullら(1992)Proc Natl Acad Sci USA 89:1865-1869)もしくはファージ上(ScottおよびSmith(1990)Science 249:386-390；Devlin(1990)Science 249:404-406；Cwirllaら(1990)Proc Natl Acad Sci U.S.A. 87:6378-6382；Felicci(1991)J Mol Biol 222:301-310；Ladner、上記)に存在し得る。

30

【0044】

一般に、当該分野において認識されるアッセイは、ミトコンドリア媒介性アポトーシスを評価するために使用され得る。このようなアッセイは、例えば、米国特許第5,935,937号に記載されている。1つの例は、以下である：(1)腫瘍細胞(例えば、HT29細胞またはMCF-7細胞)が、3~4日間、培地および少なくとも1つのL T R 活性化剤を含む一連の組織培養ウェル中で、試験される薬剤の一連の希釈物の存在下または非存在下で培養される；(2)ミトコンドリア機能(例えば、MTT)を測定するウィルス色素染色が腫瘍細胞混合物に添加され、そして数時間反応される；(3)各ウェル中の混合物の光学密度が定量される。光学密度は、L T R 活性化剤および試験L T R ブロッキング剤の存在下で各ウェル内に残っている腫瘍細胞の数に比例する。

40

【0045】

本発明は、既知または推定のL T R 調節活性化薬剤をさらに使用し得る。L T R シグナル伝達(例えば、可溶性L T R フラグメントまたは抗L T R モノクローナル抗体、およびその改変形態の活性化)を誘導する薬剤は、上記腫瘍細胞アッセイを使用して、

50

ミトコンドリア媒介性アポトーシスを介して腫瘍細胞細胞傷害性を相乗する、単独でかまたは他の薬剤（例えば、c I A P 1とのS m a cの相互作用）と組み合わせたそれらの能力に基づいて選択され得る。

【0046】

L T R調節薬剤を選択するための別の方法は、推定薬剤がL T R - リガンド結合に直接する能力をモニタリングすることである。リガンド - レセプター結合の強度を測定する多数のアッセイのいずれかを使用して、推定L T Rブロック剤との競合アッセイを実施し得る。レセプターとリガンドとの間の結合の強度は、酵素結合免疫吸収アッセイ（E L I S A）またはラジオイムノアッセイ（R I A）を使用して、測定され得る。特異的結合はまた、抗体 - 抗原複合体を蛍光標識し、そして蛍光活性化細胞選別（F A C S）分析を実施することによって、または他のこのような免疫検出方法を実施することによって測定され得る。これらの全ては、当該分野において周知の技術である。

10

【0047】

リガンド - レセプター結合相互作用はまた、プラスモン共鳴検出を利用する、B I A C O R E ^{T M} 機器（Pharmacia Biosensor）を用いて測定され得る（Zhouら、Biochemistry, 32, 8193 - 98頁（1993）；FaegerstramおよびO'Shannessy「Surface plasmon resonance detection in affinity technologies」、Handbook of Affinity Chromatography, 229 - 52頁、Marcel Dekker, Inc., New York（1993））。

20

【0048】

レセプター - リガンド相互作用を測定するための、これらまたは他の技術のいずれかを用いて、L T Rブロック剤が、単独でかまたは他の薬剤と組み合わせて、表面L T Rリガンドまたは可溶性L T Rリガンドの、表面L T R分子または可溶性L T R分子への結合を阻害する能力を評価し得る。このようなアッセイはまた、L T Rブロック剤またはこのような薬剤の誘導体（例えば、融合物、キメラ、変異体、および化学的に変更された形態）を、単独でかまたは組み合わせて試験し、その変更された薬剤がL T R活性化をブロックする能力を最適にするために使用され得る。

【0049】

本発明は、以下の非限定的な実施例にさらに記載される。

30

【実施例】

【0050】

（実施例1 材料および方法）

以下の実施例において使用される材料および方法は、以下を含んだ。

【0051】

（細胞培養、抗体および試薬）

U 9 3 7細胞、H E K 2 9 3細胞およびM C F 7細胞を、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n（A T C C）から入手し、そしてそれぞれ0.01%のインスリンを含有する、R P M I 1 6 4 0（G i b c o B R L）、D M E（G i b c o B R L）、およびE M E M（A T C C）中で培養した。全ての培地に、10% F B Sを補充した。T R A F 2抗体およびT R A F 3抗体を、S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g yから購入した。c I A P 1抗体を、R & D S y s t e m sから入手した。抗F l a g（M 2）抗体およびアフィニティービーズを、S i g m aから入手した。H A抗体（3 F 1 0）を、R o c h e M o l e c u l a r C h e m i c a l sから購入した。S m a c抗体を、A l e x i s B i o c h e m i c a l s a n d C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g yから購入した。全ての化学試薬は、他に特定されない限り、S i g m aから購入した。

40

【0052】

（プラスミド構築物）

50

pFLAG-CMV2ベクター(Eastman Kodak, Co.)中のN末端FLAGタグ化全長LTRは、Shie-Liang Hsieh博士から親切にも提供された(Wuら、J. Biol. Chem. 274:11868-73、1999もまた参照のこと)。C末端HAタグを有するSmacの全長および76欠失変異体を、ヒト卵巣cDNAライブラリーからPCR反応によって増幅した。次いで、PCRフラグメントを、pcDNA3.1(+)に、NdeI部位およびXhoI部位においてクローニングした。

【0053】

(内因性LIGHTレセプター複合体の精製)

1×10^{10} 個のU937細胞を、加温したPBS(37)で2回洗浄し、そして 1×10^7 細胞/mlの濃度で再懸濁した。細胞を、20ng/mlのFlag-LIGHT(Alexis)で、37で10分間処理するか、または未処理のままにした。次いで、細胞を、50mlの溶解緩衝液(20mM Tris.HCl、pH7.2、150mM NaCl、1% Triton X-100、1mM EDTA、30mM NaF、1mM NaVO₄およびプロテアーゼインヒビターカクテル(Roche))中に溶解し、そして4で30分間穏やかに振盪した。細胞細片を、10,000gで30分間、2回遠心分離することによって除去した。溶解物を、Gamma Bindingビーズ(Pharmacia)と共に1時間インキュベートすることによって予備浄化した。得られた溶解物を、0.2mlのM2-アフィニティービーズ(Sigma)のミニカラム(BioRad)に2回適用した。このビーズを、高塩(1M NaCl)溶解緩衝液で2回洗浄し、溶解緩衝液でさらに3回洗浄し、次いで、エペンドルフチューブに移した。免疫複合体を、初めに、2mg/mlの濃度のFlagペプチド(Sigma)で溶出した。残留している結合タンパク質を、次いで、8M 尿素でさらに溶出した。2分の1のペプチドで溶出したタンパク質または1/10の8M 尿素で溶出したタンパク質を、4~12%のSDS-PAGEゲルで分離し、そしてTRAF3抗体を使用して、ウエスタンブロットのためのニトロセルロース膜に移した。これらのサンプルをまた、4~12%のSDS-PAGEゲルで分離し、そして銀染色によって可視化した。

【0054】

(質量分析法およびタンパク質の同定)

目的のタンパク質バンドを、ゲルから手で切り出し、ヨードアセトアミドで還元しそしてアルキル化し、次いで、Houthaeveら、J. Protein Chemistry 16:343-48、1997に記載されるように、自動化消化ロボット(ABIMED, Germany)を使用してトリプシンでインサイチュで消化した。次いで、このペプチド消化物を、マイクロエレクトロスプレー逆相液体クロマトグラフィーインターフェースを備えるハイスループットタンデム質量分光計(ThermoQuest LCQ-DECA, San Jose CA)を使用して、配列決定した。データを、LCQを備えるデータ取得ソフトウェアを使用して自動化MS/MSモードで取得し、ペプチドがカラムから溶出されると、各ペプチドを検出しそして配列決定した。動的除去機能および同位体除去機能を用いて、分析されたペプチドイオンの数を増加させた。LS-MS/MS実行の間、代表的に1000を超える断片化スペクトルを、各サンプルから収集し、そしてSequestソフトウェアパッケージ(ThermoQuest)を使用して、非冗長データベース(NCBI)に対して一致させた。

【0055】

(免疫沈降およびウエスタン分析)

免疫沈降について、 1×10^8 のU937細胞を、異なる時間、20ng/mlのFLAG-LIGHTで処理するか、または未処理のままにした。次いで、細胞を収集し、そして4mlの溶解緩衝液(上記を参照のこと)中に溶解した。細胞細片を、14,000xgで10分間の遠心分離によって除去し、そして得られた溶解物を、Gamma Bindingビーズ(Pharmacia Biotech)を用いて4で1時間予備浄化した。次いで、20mlのM2ビーズを、この細胞溶解物に添加し、そして4で3時

間インキュベートした。結合後、ビーズを、溶解緩衝液で5回洗浄した。このビーズに結合した免疫複合体を、サンプル緩衝液で溶出し、4～12%のSDS-PAGEゲルで分離し、PVDF膜に移し、そしてTRAF2、TRAF3またはcIAP1抗体でプロブした。シグナルを、HRP結合体二次抗体およびECL検出キット(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて検出した。HEK 293細胞の免疫沈降について、4 μ gのpFlag-CMV2-LTR、pcDNA3-Smac-HAまたはpcDNA3-76Smac-HAを、Fugene 6(Roche Molecular Biochemicals)を使用し、製造者の指示書に従って、100mmディッシュ上で細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を、細胞リフターを用いて収集し、そして0.5mlの溶解緩衝液中に溶解した。LTRについてM2ビーズを用いて、またはSmacまたは76SmacについてHAモノクローナル抗体を用いてのいずれかで、U937細胞と同じ様式で、免疫沈降を実施した。次いで、免疫複合体中のSmac、LTR、TRAF2およびcIAP1の存在を、ウエスタンブロットによって分析した。

10

【0056】

(アポトーシスアッセイ)

MCF7細胞(5 \times 10⁵細胞/ウェル)を、トランスフェクションの1日前に、6ウェルプレート中のカバーガラス上に播種した。各ウェル中の細胞を、Fugene 6(Roche Molecular Chemicals)を使用して、1 μ gのpcDNA3ベクター、pcDNA3-Smac-HAまたはpcDNA3-76Smac-HA発現構築物を、pEMC-Galと共に用いて、トランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞を、PBS(コントロール)、LIGHT(20ng/ml)またはLTR1-2(20ng/ml)で6時間処理し、次いで、固定し、そしてX-gal(Sigma)で染色した。アポトーシスを、形態学分析によって評価し、そしてトランスフェクトされた全ての青色細胞中のアポトーシス(丸く、かつ分離されている)細胞の割合として表した。

20

【0057】

(実施例2:LTR複合体におけるポリペプチドの同定)

LIGHTは、LTRおよびTR2/HVEMの両方に結合する。U937細胞において、LTRは、構成的に発現され、一方、TR2/HVEMの発現は、分化因子によって誘導される。この現象は、特異的リガンド-LTR複合体を形成するために開発された。未分化のU937細胞を、Flagタグ化LIGHTで10分間処理して、LIGHT-LTR複合体を形成した。内因性レセプター複合体を、抗Flag抗体(M2)結合体化ビーズでアフィニティー精製し、次いで、Flagペプチドで溶出した。溶出したタンパク質を、4～12%のSDS-PAGEゲルで分離し、そして銀染色によって可視化した。

30

【0058】

約8のタンパク質バンドは、LIGHTで処理したサンプルにおいてのみ存在し、コントロールには存在しないことが見出された。TRAF3は、TRAF3に対するポリクローナル抗体を使用して、LIGHTで処理したサンプルにおいて検出された。

40

【0059】

この複合体中のさらなるタンパク質を同定するために、8つのバンド(これらを、1～8番と割り当てた)を、ゲルから切り出し、そして液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化質量分析法(LC-ESI-MS)によって分析した。予想通り、LIGHTが、バンド6において検出された(表1もまた参照のこと)。ポリペプチドTRAF2由来のいくつかのペプチドが、バンド3において検出された。他のバンドのいずれかのタンパク質は、スペクトルの質の悪さに起因して検出できなかったか、または後に、非特異的結合タンパク質(例えば、バンド1におけるHsp90およびバンド4におけるアクチン)であることが分かった。

【0060】

50

バンド3の推定位置におけるTRAF3に対応するペプチドも、レセプターポリペプチドに対応するペプチドも検出できなかった。1つの可能性は、TRAF3およびレセプター（存在する場合）の量が、質量分析法の検出限界より下であるということであった。TRAF3のウエスタンブロットによって示されるように、Flagペプチドは、ビーズ上の全TRAF3タンパク質の10分の1しか溶出しなかった。この低効率は、おそらく、抗体とリガンドレセプター複合体との間の多量体の高親和性相互作用に起因していた。

【0061】

これらのビーズからのタンパク質の回収を増加させるために、これらのビーズを、8 M 尿素で処理した。次いで、サンプルを、SDS-PAGEゲルで分離し、そしてTRAF3の推定位置におけるバンドを切り出し、そして質量分析法によって分析した。TRAF3由来の3つのペプチド（表1）が、LIGHTで処理したサンプルにおいて検出された。これらのペプチドは、LIGHT処理をしていないサンプルには存在しなかった。

10

【0062】

（表1．LIGHT-LTR複合体において同定されたタンパク質のリスト。表に列挙されるタンパク質は、LIGHTで処理したサンプルにおいてのみ検出され、コントロールサンプルでは検出されなかった。* Fは、FLAGで溶出したサンプルにおけるバンドを表し、そしてUは、8 Mの尿素で溶出したサンプルにおけるバンドを表す。数字は、図1に示される数字に対応する。

【0063】

【表1】

20

タンパク質	バンド*	検出されたペプチド
LIGHT	F6/U6	AGYYYYIYSK (SEQ ID NO:6) ASTITHGLYK (SEQ ID NO:7) SYHDGALVVTK (SEQ ID NO:8)
LTβR	U2	EYYEPQHR (SEQ ID NO:9) DQEKEYYEPQHR (SEQ ID NO:10) NQFITHD (SEQ ID NO:11)

TRAF3	U2	YGCVFQGTNQQIK (SEQ ID NO:12) NTGLLESQLSR (SEQ ID NO:13) TSLYSQPFYTG YFGYK (SEQ ID NO:14)
TRAF2	F3/U3	YLCSACR (SEQ ID NO:15) RPFQAQCGHR (SEQ ID NO:16) CPLMLTECPACK (SEQ ID NO:17) FPLTCDGCGKK (SEQ ID NO:18) FHAIGCLETVEGEK (SEQ ID NO:19) VAMTAEACSR (SEQ ID NO:20) VQQLER (SEQ ID NO:21) DLAMADLEQK (SEQ ID NO:22) RPFQAQCGHR (SEQ ID NO:23) IPAI FSPAFYTSR (SEQ ID NO:24) IYLNGDGTGR (SEQ ID NO:25) WPFNQK (SEQ ID NO:26) NSYVRDDAIFIK (SEQ ID NO:27)
cIAP1	U2	AVEDISSSR (SEQ ID NO:28) AGFYIYIGPGDR (SEQ ID NO:29) VACFACGGK (SEQ ID NO:30) SALEMGFNR (SEQ ID NO:31)
Smac	U6	AVYTLTSLYR (SEQ ID NO:32) LAEAQIEELR (SEQ ID NO:33)

10

20

30

40

50

次いで、LIGHTで処理したサンプルおよびコントロールサンプルの両方におけるバンドの全てを、8Mの尿素で処理したが、8Mの尿素もまた、ビーズに非特異的に結合したタンパク質を溶出し、LIGHTで処理したサンプルとコントロールサンプルとの間の、SDS-PAGEゲルにおける識別不可能なパターンを生じた。タンパク質の同定後、コントロールサンプル中の非特異的結合タンパク質を、LIGHTで処理したサンプル中の非特異的結合タンパク質から引き、LIGHT-レセプター複合体に特異的に結合するタンパク質を生成した。表1は、検出されたペプチドおよびその帰属されたタンパク質を要約する。合計5種のタンパク質を同定し、このタンパク質は、上で列挙した4つのタンパク質およびERHを含んだ。

【0064】

予測されるように、LTRは、複合体中のレセプターとして検出された(表1)。複合体中のLIGHTおよびlt

Rの検出は、LIGHT-LTR複合体の首尾良い単離をさらに確証した。TRAF2およびTRAF3もまた、検出された(表1)。さらに、バンド2の位置におけるcIAP1由来の4種のペプチド、およびバンド6の位置におけるSmac由来の2種のペプチドが、検出された(表1)。図2Aおよび2Bは、それぞれ、cIAP1由来ペプチドおよびSMAC由来ペプチドの2つの代表的な質量スペクトルを示す。

【0065】

TRAF4ポリペプチドも、TRAF5ポリペプチドも、NIKポリペプチドも、質量分析法またはウエスタンブロット分析のいずれによっても検出されなかったが、その役割は、LTRシグナル伝達において示唆されている。このことは、タンパク質の少ない存在量およびサンプルの高い複雑性に起因し得る。

【0066】

これらのタンパク質とLIGHT-LTR複合体との会合を確認するために、U937細胞を、種々の時間にわたって、Flag-LIGHTで処理した。次いで、細胞を、Flag抗体で免疫沈降し、続いてTRAF2、TRAF3またはcIAP1に対する抗

体を使用してウェスタンブロット分析した。

【0067】

内因性TRAF2、TRAF3およびcIAP1のLIGHT-LTR複合体へのリクルートが、時間依存的であることが見出された。cIAP1のリクルートは、15分以内に徐々に増加した。類似のパターンが、TRAF3について観察された。TRAF2のリクルートは、より迅速であるようであり、そして5分と10分との間にピークに達するようである。リクルートの反応速度は、TRAF2がTRAF3およびcIAP1より先にレセプターにリクルートされることを示唆する。TRAF3のLTRの細胞内ドメインとの直接的な相互作用は、精製タンパク質を使用して証明され(Forceら, J. Biol. Chem. 272:30835-40, 1997)、そしてTRAF2とTRAF3との間の相互作用の証拠は存在しない(例えば、Wajantら、Cytokine Growth Factor 10:15-26, 1999を参照のこと)。従って、TRAF3は、LIGHTの処理の際に、LTRに直接リクルートする可能性が高い。逆に、cIAP1からLTRへのリクルートは、おそらく、TRAF2とのその相互作用を介して生じる。なぜなら、cIAP1-TRAF2相互作用は、インビトロで示されており、そしてcIAP1とレセプターまたはTRAF3との間の相互作用の証拠が存在しないからである。

10

【0068】

興味深いことに、cIAP1のC末端に対するポリクローナル抗体(R&D systems, AF818)により認識される複合体中のcIAP1は、約60kDaであり、これは細胞溶解物中の全長cIAP1(約70kDa)より小さい。この60kDaバンドは、cIAP1のBIR1ドメインにおけるペプチドに対する別の抗体(sc-1867, Santa Cruz, これは細胞溶解物中の70kDa-cIAP1を認識する)によって検出されなかった。これらの観察は、複合体中のcIAP1のN末端が切断されることを示す。

20

【0069】

LIGHT-LTR複合体におけるSmac由来の2つのペプチドを、質量分析によって検出したが、内因性の結合は、Smac抗体(Alexis BiochemicalsまたはCell Signaling Technology)を使用しても検出されなかった。この結果は、Smac抗体の低感受性に起因するものであり得る。従って、SmacとLTRとの結合は、内因性LTRおよびHVEMを有さないHEK293細胞において、過剰発現によって調査された(Zhaiら, Clin. Invest. 102:1142~51, 1998)。Smacは、C末端HAタグ化融合タンパク質として発現し、ウェスタンブロットでは28kDaおよび23kDaの二重線として現われた。これらのサイズは、N末端ミトコンドリア局在化シグナルペプチド(アミノ酸1~55)を有する全長Smacおよびそのシグナルペプチドを有さない成熟Smacに一致した(Duら, Cell 102:33~42, 2000)。両方の形態を、Flagタグ化LTRにより共免疫沈降した。細胞質ゾルおよびミトコンドリアを分画した場合、全ての全長Smacが、ミトコンドリア画分中に存在することを見出し、成熟Smacのかなりの量(約3分の1)は、細胞質ゾル画分中であつた。従って、これらのデータは、Smacの細胞質ゾル成熟形態が、LTRと相互作用するSmacの生理学的形態であることを示唆する。全長Smacが、LTRとともに共免疫沈降されたという観察は、アーティフィシャルなものであり得、これは、Triton X-100によるミトコンドリア膜の破壊に起因する。

30

40

【0070】

LIGHTにより刺激された場合、Smacリクルートはさらに増加しなかった(データは示さず)。これは、過剰発現から生じるLTRの凝集および活性化に起因する可能性がある。HA抗体を使用するSmacの相互免疫沈降において、LTRが検出され、このことにより、結合をさらに確認する。U937細胞(上述)における観察によると、内因性TRAF2、cIAP1(60kDa)およびTRAF3はまた、HEK293細

50

胞において過剰発現されたLT₁Rに対してリクルートされたことが見出された。さらに、内因性TRAF2およびcIAP1を、Smacの相互免疫沈降において検出した。このことは、LT₁R-TRAF2-cIAP1-Smacの複合体の形成を示す。まとめると、これらのデータは、TRAF2、TRAF3、cIAP1、およびSmacと、LT₁Rとの生理学的結合を強く支持する。

【0071】

全長Smacとは対照的に、cIAP1結合部位(アミノ酸56~75)およびミトコンドリア局在化シグナルの両方を欠くSmacの欠失変異体(Δ76Smac)は、LT₁Rに結合する能力を喪失している。このことは、SmacのcIAP1結合部位が、そのレセプターへのリクルートに重要であることを示唆する。SmacのN末端とXIAPのBIR3ドメインとの間の相互作用は、X線結晶構造分析および突然変異分析によって実証された(Chaiら, Nature 406:855~862, 2000; Wuら, Nature 408:1008~12, 2000)。公知のIAPポリペプチドは、高度に相同性であるので、Smacのリクルートは、そのcIAP1のBIR3ドメインとの相互作用によって媒介されている可能性がある。全長SmacとSmacの欠失変異体との間の相違にも関わらず、LT₁Rに対するcIAP1、TRAF2、およびTRAF3のレベルは、同じレベルのままであり、このことは、Smacのリクルートが、TRAF2、TRAF3およびcIAP1のリクルート後に生じることを示唆する。

10

【0072】

(実施例3. SmacはLT₁R誘発アポトーシスを増強する)

20

Smacは、UV照射のようないくつかの刺激(ミトコンドリア媒介性アポトーシス経路を引き起こす)に应答してアポトーシスを促進することが示されている(Duら, Cell 102:33~42, 2000)。MCF7細胞を、γ-ガラクトシダーゼ(pEMC-gal)およびSmac-HA、Δ76Smac-HAまたは空のベクターを発現するプラスミドを用いて同時トランスフェクトした。24時間後、細胞を、PBS、LIGHT(20ng/ml)、またはLT₁2(20ng/ml)を用いて、それぞれ6時間処理し、次いで固定して、X-galで染色した。アポトーシスを、gal発現細胞の形態学的分析によって評価した(詳細については、実施例1を参照のこと)。

【0073】

これらの結果を、図2に示す。アポトーシスを、形態学的分析によって評価し、トランスフェクトされた青い細胞の全てにおけるアポトーシス細胞(丸みを帯びた細胞および剥離した細胞)の割合として示した。バーは、3回の別個の実験において繰り返したサンプルの平均を示す。各実験において、1000個より多くの細胞を計数した。

30

【0074】

全長Smacの過剰発現は、MCF7細胞においてアポトーシスを増強し、そしてLIGHTの刺激はさらにアポトーシスを増加させる。同様の効果が、LT₁2刺激細胞において観察された。興味深いことに、変異体Δ76Smac(これは、レセプターへのリクルートする能力を喪失している)は、依然として、全長Smacと同じ程度までLT₁R媒介性アポトーシスを増強する。この結果は、SmacのC末端がまた、アポトーシス促進活性も保持し、かつcIAP1との相互作用から独立していることを示唆する。

40

【0075】

理論に束縛されることを意図しないが、LT₁R誘発アポトーシスについてのモデルを、図3に図示する。LIGHTがLT₁Rへ結合する際、TRAF2はまず、レセプターにリクルートされ、次いでcIAP1のBIR1ドメインが切断される間、TRAF3およびcIAP1にリクルートされる。レセプター上のcIAP1は、カスパーゼと直接相互作用することによってアポトーシスを阻害する。最初のLIGHT-LT₁R複合体はまた、ミトコンドリアからのSmacの放出を誘導する未知のメカニズムによって、ミトコンドリア媒介性アポトーシス経路を引き起こす。細胞質ゾルのSmac(これは、N末端ミトコンドリア局在化シグナルを欠く)は、次いで、cIAP1との相互作用を介してレセプターにリクルートされる。SmacのN末端とcIAP1との相互作用は、カスバ

50

ーゼに関する c I A P 1 の阻害を開放し、一方、S m a c の C 末端は、N 末端と共同して作用し、未だ同定されていないメカニズムによってアポトーシスを促進する。L T R 誘発アポトーシスは、I F N の付加を必要とすることが報告されている (B r o w n i n g ら、J . E x p . M e d . 1 8 3 : 8 6 7 ~ 7 8、1 9 9 6)。このモデルにおいて提案された S m a c の役割と一致して、I F N は、W E H I 2 7 9 細胞において S m a c のデノボ合成を誘導することが示された (Y o s h i k a w a ら、1 6 7 : 2 4 8 7 ~ 9 5、2 0 0 1)。T R A F 3 は、ミトコンドリアからの S m a c の放出を引き起こすことによって c I A P 1 - S m a c 経路を促進することが可能である。

【 0 0 7 6 】

これらの説明は、例示を意図しているが、本発明の範囲を限定することを意図していな

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 7 】

【 図 1 A 】 図 1 A は、c I A P 1 に由来するとして同定されたペプチドの代表的なフラグメントイオンスペクトルである。

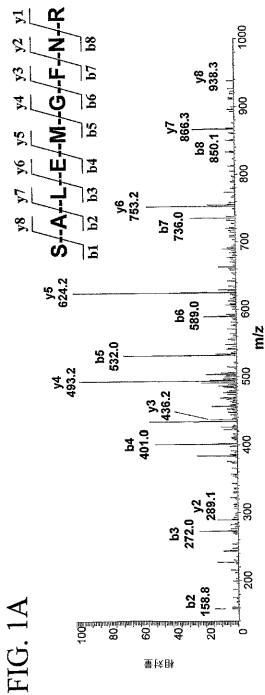
【 図 1 B 】 図 1 B は、S M A C に由来するとして同定されたペプチドの代表的なフラグメントイオンスペクトルである。

【 図 2 】 図 2 は、S m a c および 7 6 S m a c の L I G H T 誘発アポトーシスに対する効果を示すヒストグラムである。

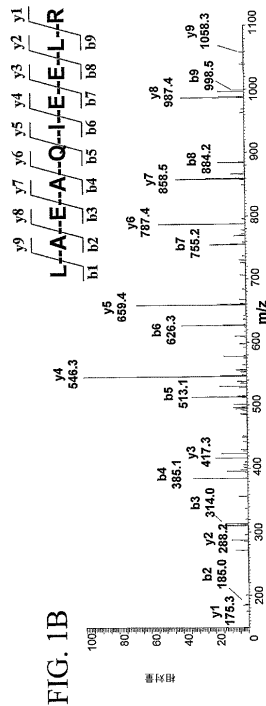
【 図 3 】 図 3 は、L T R 媒介性アポトーシスのモデルである。

20

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



【 図 2 】

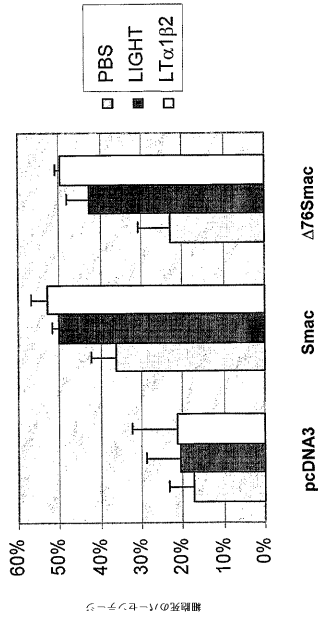


FIG. 2

【 図 3 】

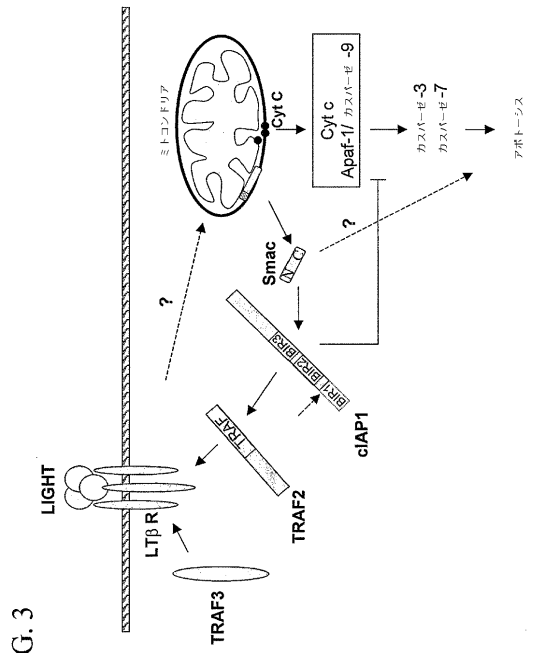


FIG. 3

- 【 手続 補正書 】
- 【 提出日 】 平成 17 年 2 月 21 日 (2005.2.21)
- 【 手続 補正 1 】
- 【 補正 対象 書類 名 】 明細書
- 【 補正 対象 項目 名 】 0 0 6 3
- 【 補正 方法 】 変更
- 【 補正 の 内容 】
- 【 0 0 6 3 】
- 【 表 1 】

タンパク質	バンド*	検出されたペプチド
LIGHT	F6/U6	AGYYYYIYSK (配列番号34) ASTITHGLYK (配列番号35) SYHDGALVVTK (配列番号 8)
LTβR	U2	EYYEPQHR (配列番号 9) DQEKEYYEPQHR (配列番号 10) NQFITHD (配列番号 11)

TRAF3	U2	YGCVFQGTNQQIK (配列番号 12) NTGLLESQLSR (配列番号 13) TSLYSQPFYTG YFGYK (配列番号 14)
TRAF2	F3/U3	YLCSACR (配列番号 15) RPFQAQCGHR (配列番号 16) CPLMLTECPACK (配列番号 17) FPLTCDGCGKK (配列番号 18) FHAIGCLETVEGEK (配列番号 19) VAMTAEACSR (配列番号 20) VQQLER (配列番号 21) DLAMADLEQK (配列番号 22) RPFQAQCGHR (配列番号 23) IPAI FSPAFYTSR (配列番号 24) IYLNGDGTGR (配列番号 25) WPFNQK (配列番号 26) NSYVRDDAIFIK (配列番号 27)
cIAP1	U2	AVEDISSSR (配列番号 28) AGFY YIGPGDR (配列番号 29) VACFACGGK (配列番号 30) SALEMGFNR (配列番号 31)
Smac	U6	AVYTLTSLYR (配列番号 32) LAEAQIEELR (配列番号 33)

次いで、LIGHTで処理したサンプルおよびコントロールサンプルの両方におけるバンドの全てを、8 Mの尿素で処理したが、8 Mの尿素もまた、ビーズに非特異的に結合したタンパク質を溶出し、LIGHTで処理したサンプルとコントロールサンプルとの間の、SDS-PAGEゲルにおける識別不可能なパターンを生じた。タンパク質の同定後、コントロールサンプル中の非特異的結合タンパク質を、LIGHTで処理したサンプル中の非特異的結合タンパク質から引き、LIGHT-レセプター複合体に特異的に結合するタンパク質を生成した。表1は、検出されたペプチドおよびその帰属されたタンパク質を要約する。合計5種のタンパク質を同定し、このタンパク質は、上で列挙した4つのタンパク質およびERHを含んだ。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2006510570000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50		Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		D
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/566		

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ウーターズ, ジョセフ エル.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 5, ブライトン, グレンリー テラス 9

(72) 発明者 ニックバーグ, エリオット ビー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 8, ベルモント, アンドレー ロード 3 2

(72) 発明者 チウ, ヨンチャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 6, アーリントン, オールド コロニー レー
ン 1 0 ナンバー 7

(72) 発明者 リン, リー - リン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 1 0 7 4 2, コンコルド, カレッジ ロード 1 0 7

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA36 FB03 FB05 FB06

4B063 QA18 QR48 QR77 QS33

4H045 AA10 AA30 BA41 CA40 DA50 EA22 EA28 EA50

专利名称(译)	用于调节炎症反应的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2006510570A	公开(公告)日	2006-03-30
申请号	JP2003566185	申请日	2003-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	惠氏		
[标]发明人	クアイジュン ウーターズジョセフエル ニックバーグエリオットビー チウヨンチャン リンリーリン		
发明人	クアイ, ジュン ウーターズ, ジョセフ エル. ニックバーグ, エリオット ビー. チウ, ヨンチャン リン, リー-リン		
IPC分类号	C07K14/705 C07K14/47 C07K19/00 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C07K14/715 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6863 C07K14/7151 G01N33/57492 G01N2333/525 G01N2500/04 G01N2500/10 G01N2510/00		
FI分类号	C07K14/705.ZNA C07K14/47 C07K19/00 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 4B063/QA18 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/355183 2002-02-08 US		
其他公开文献	JP4429726B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及包含能够激活或抑制LTβR信令淋巴毒素-β受体 (LTβR) 调控因子的组合物和方法。LTβR调制器, 对淋巴细胞介导的免疫疾病和癌症, 更具体的治疗可用于调节线粒体介导的凋亡是有用的。本发明涉及LTβR复杂蛋白质充当LTβR活化剂或LTβR抑制剂的可溶形式。本发明还涉及, LTβR, 其配体, 重量轻, LTβ1α2或细胞间的结合合作伙伴的具体之一, 使用该功能来调节LTβR信号可溶性分子。可溶性受体能调节LTβR信令, 用于选择的抗体, 并且提供其他因素新的筛选方法。

