

(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2005-500825

(P2005-500825A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	Z N A
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 31/12	2 G O 4 5
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/18	4 B O 2 4
A 6 1 P 31/18	C O 7 K 7/06	4 B O 6 3
C O 7 K 7/06	C O 7 K 7/08	4 C O 8 4
		4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-591030 (P2002-591030)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月21日 (2002. 5. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年11月20日 (2003. 11. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/015965
 (87) 国際公開番号 W02002/094314
 (87) 国際公開日 平成14年11月28日 (2002. 11. 28)
 (31) 優先権主張番号 60/292, 761
 (32) 優先日 平成13年5月21日 (2001. 5. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503427072
 ザ リサーチ ファウンデーション オブ
 ザ ステート ユニバーシティー オブ
 ニューヨーク
 アメリカ合衆国 1 2 2 0 1 - 0 0 0 9
 ニューヨーク州, アルバニー, ビー. オ
 ー. ボックス 9
 (71) 出願人 503427201
 コーエン, スタンリー, エヌ.
 アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 5 1 2 0
 カリフォルニア州, スタンフォード, スタ
 ンフォード ユニバーシティー, デパート
 メント オブ ジェネティクス スクール
 オブ メディシン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV産生のインヒビターとしてのTSG101

(57) 【要約】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) のPTAPPモチーフまたはLDメインに結合する哺乳動物Tsg101タンパク質中のペプチドを同定するための方法を提供する。そのようなペプチドは、Tsg101-HIV Gag結合を抑制するために使用することが可能であり、したがって、HIV粒子の産生を減少させるのに有効である。本発明は、本発明の方法により同定されたペプチド、およびHIV感染を治療するための、そのようなペプチドの使用方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

HIV粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、

(a) 哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部分を含む発現構築物を哺乳動物細胞内に導入し、

(b) HIV gag、polおよびrevコード配列を含む1以上の発現構築物を該哺乳動物細胞内に導入し、

(c) 該トランスフェクト哺乳動物細胞を、適当な培地中、約37℃の温度で十分な時間にわたりインキュベートして、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物ならびにHIV gag、polおよびrev遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現する哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞培養物を取得し、

(d) 該哺乳動物細胞培養物において、粒子に結合したp24のレベルを測定し、

(e) 哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部分を含む該発現構築物でトランスフェクトされていない対照の哺乳動物細胞培養物と比較した場合の、粒子に結合したp24のレベルの低下を、HIV粒子の産生を減少させるのに有効なペプチドまたは断片の同定と関連づける、

ことを含んでなる上記方法。

【請求項2】

HIV粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、

(a) 哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部分を含む発現構築物を哺乳動物細胞内に導入し、

(b) HIVを該哺乳動物細胞内に導入し、

(c) トランスフェクトされかつ感染した該哺乳動物細胞を、適当な培地中、約37℃の温度で十分な時間にわたりインキュベートして、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物を発現しかつHIV粒子を産生する哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞培養物を取得し、

(d) 該哺乳動物細胞培養物において、粒子に結合したp24のレベルを測定し、

(e) 哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部分を含む該発現構築物でトランスフェクトされていない対照の哺乳動物細胞培養物と比較した場合の、粒子に結合したp24のレベルの低下を、HIV粒子の産生を減少させるのに有効なペプチドまたは断片の同定と関連づける、

ことを含んでなる上記方法。

【請求項3】

HIV粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、

(a) 哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部分を含む発現構築物を哺乳動物細胞内に導入し、

(b) HIVを該哺乳動物細胞内に導入し、

(c) 該トランスフェクト哺乳動物細胞を、適当な培地中、約37℃の温度で十分な時間にわたりインキュベートして、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物を発現しかつHIV粒子を産生する哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞培養物を取得し、

(d) 該細胞から放出されたHIV粒子を定量し、

(e) 哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部分を含む該発現構築物でトランスフェクトされていない対照の哺乳動物細胞培養物と比較した場合の、HIV粒子の産生の減少を、HIV粒子の産生を減少させるのに有効なペプチドまたは断片の同定と関連づける、

ことを含んでなる上記方法。

【請求項4】

10

20

30

40

50

HIV粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、

(a) HIV gag、polおよびrevコード配列を含む1以上の発現構築物を哺乳動物細胞内に導入し、

(b) 哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を該哺乳動物細胞内に導入し、

(c) 1以上の該発現構築物でトランスフェクトされかつ哺乳動物Tsg101ペプチド由来のペプチドまたは断片を浸透させた該哺乳動物細胞を、適当な培地中、約37℃の温度で十分な時間にわたりインキュベートして細胞培養物を取得し、

(d) 該哺乳動物細胞培養物において、粒子に結合したp24のレベルを測定し、

(e) 哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を浸透させていない対照の哺乳動物細胞培養物と比較した場合の、粒子に結合したp24のレベルの低下を、HIV粒子の産生を減少させるのに有効なペプチドまたは断片の同定と関連づける、

ことを含んでなる上記方法。

10

【請求項5】

HIV粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、

(a) HIVを哺乳動物細胞内に導入し、

(b) 哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を該哺乳動物細胞内に導入し、

(c) HIVでトランスフェクトされかつ哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を浸透させた該哺乳動物細胞を、適当な培地中、約37℃の温度で十分な時間にわたりインキュベートして細胞培養物を取得し、

(d) 該細胞培養物において、粒子に結合したp24のレベルを測定し、

(e) 哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を浸透させていない対照の哺乳動物細胞培養物と比較した場合の、粒子に結合したp24のレベルの低下を、HIV粒子の産生を減少させるのに有効なペプチドまたは断片の同定と関連づける、

ことを含んでなる上記方法。

20

【請求項6】

HIV粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、

(a) HIVを哺乳動物細胞内に導入し、

(b) 哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を該哺乳動物細胞内に導入し、

(c) HIVでトランスフェクトされかつ哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を浸透させた該哺乳動物細胞を、適当な培地中、約37℃の温度で十分な時間にわたりインキュベートし、

(d) 該細胞から放出されたHIV粒子を定量し、

(e) 哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を浸透させていない対照の哺乳動物細胞培養物と比較した場合の、HIV粒子の産生の減少を、HIV粒子の産生を減少させるのに有効なペプチドまたは断片の同定と関連づける、

ことを含んでなる上記方法。

30

40

【請求項7】

哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列がTsg101のUEV Aドメインに由来する、請求項1、2または3のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

HIV粒子の産生を減少させるのに有用なペプチドまたは断片であって、哺乳動物Tsg101タンパク質の少なくとも4個連続したアミノ酸を含んでなり、請求項1～6のいずれか1項記載の方法により同定されたものである、上記ペプチドまたは断片。

【請求項9】

50

哺乳動物Tsg101タンパク質がマウスTsg101タンパク質（配列番号1）、ヒトTsg101タンパク質（配列番号2）または他の哺乳動物Tsg101タンパク質である、請求項8記載のペプチドまたは断片。

【請求項10】

4個連続したアミノ酸が哺乳動物Tsg101タンパク質のUEV Aドメインに由来する、請求項8記載のペプチドまたは断片。

【請求項11】

前記ペプチドがHIV粒子の産生を少なくとも約3倍減少させる、請求項8記載のペプチド。

【請求項12】

1種以上の製薬上許容される担体または希釈剤と哺乳動物Tsg101タンパク質またはその断片とを含んでなる、HIV粒子の産生を減少させるための医薬組成物。 10

【請求項13】

1種以上の製薬上許容される担体または希釈剤と請求項8記載のペプチドとを含んでなる、HIV粒子の産生を減少させるための医薬組成物。

【請求項14】

Tsg101タンパク質がマウスTsg101タンパク質（配列番号1）である、請求項13記載の医薬組成物。

【請求項15】

Tsg101タンパク質がヒトTsg101タンパク質（配列番号2）である、請求項13記載の医薬組成物。 20

【請求項16】

4個連続したアミノ酸が哺乳動物Tsg101タンパク質のUEV Aドメインに由来する、請求項13記載の医薬組成物。

【請求項17】

Tsg101タンパク質とHIV Gagとの相互作用を阻害する、HIV-1 Gagp6後期（L）ドメインPTA PP（配列番号3）を含むペプチドを同定するための方法であって、

（a）HIV-1 GagまたはHIV-1 Gagp6後期（L）ドメインを含むペプチドを、少なくとも第1および第2の固相支持体または表面上に固定化し、ここで、該固定化ペプチドは特異的抗GagもしくはLドメイン抗体または他のリンカーに連結されており、

（b）標識Tsg101タンパク質と、適当なバッファーと、HIV-1 Gagp6後期（L）ドメインの少なくとも4個連続したアミノ酸を含むペプチドと、を含む第1反応混合物を、約4 で十分な時間にわたりインキュベートし、 30

（c）標識tsg101と適当なバッファーとを含む第2反応混合物を、約4 で十分な時間にわたりインキュベートし、

（d）工程（b）の第1反応混合物を工程（a）の第1固相支持体または表面混合物に加え、液相中にて約4 の温度で十分な時間にわたりインキュベートし、

（e）工程（c）の第2反応混合物を工程（a）の第2固相支持体または表面混合物に加え、液相中にて4 の温度で十分な時間にわたりインキュベートし、

（f）該第1固相支持体または表面を工程（d）の液相から分離して、第1固相を取得し、

（g）該第2固相支持体または表面を工程（e）の液相から分離して、第2固相を取得し、 40

（h）工程（f）の第1固相中および工程（g）の第2固相中の標識tsg101の量を測定し、

（i）工程（g）の第2固相中の標識tsg101の量と比較した場合の工程（f）の第1固相中の標識tsg101の量の減少を、HIV-1 Gagp6後期（L）ドメインの少なくとも4個連続したアミノ酸を含みかつTsg101タンパク質とHIV Gagとの相互作用を阻害するペプチドの同定と関連づける、

ことを含んでなる上記方法。

【請求項18】

Tsg101タンパク質がマウス、ヒトまたは他の哺乳動物Tsg101タンパク質である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

HIV-1 Gagp6後期(L)ドメインPTAPP(配列番号3)の少なくとも4個連続したアミノ酸を含んでなり、請求項17記載の方法により同定された、Tsg101タンパク質とHIV Gagとの相互作用を阻害するためのペプチド。

【請求項20】

ALQSRPEPTAPPEES(配列番号4)の少なくとも5個連続したアミノ酸を更に含む、請求項19記載のペプチド。

【請求項21】

前記ペプチドがTSG101-HIV Gag相互作用を少なくとも約3倍減少させる、請求項19または20記載のペプチド。

【請求項22】

1種以上の製薬上許容される担体または希釈剤と請求項19または20記載のペプチドとを含んでなる、TSG101とHIV Gagとの相互作用を阻害するための医薬組成物。

【請求項23】

治療に有効な量の請求項8記載のペプチドを投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項24】

治療に有効な量の請求項9記載のペプチドを投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項25】

治療に有効な量の請求項10記載のペプチドを投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項26】

治療に有効な量の請求項11記載のペプチドを投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項27】

治療に有効な量を請求項19または20記載のペプチドを投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項28】

治療に有効な量の請求項12記載の医薬組成物を投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項29】

治療に有効な量の請求項13記載の医薬組成物を投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項30】

治療に有効な量の請求項14記載の医薬組成物を投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項31】

治療に有効な量の請求項15記載の医薬組成物を投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項32】

治療に有効な量の請求項16記載の医薬組成物を投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項33】

治療に有効な量の請求項22記載の医薬組成物を投与することを含んでなる、HIVまたは他のレトロウイルスに感染した患者の治療方法。

【請求項34】

HIV粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、

(a) 哺乳動物細胞の培養物中に放出されたHIV粒子のレベルを測定し、ただし、該哺乳動物細胞は、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物を含んでいて、

10

20

30

40

50

哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物を発現し、かつ HIV ウイルスに感染しており、

(b) 該 HIV 粒子のレベルと、類似した条件下で対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出された HIV 粒子のレベルと、を比較し、ただし、該対照の哺乳動物細胞は、哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物を含まないが、HIV ウイルスに感染しており、

その際、工程 (a) で測定した HIV 粒子のレベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物の HIV 粒子のレベルと比較して所定の閾値レベル未満であれば、前記の哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物を、HIV 粒子の産生を減少させるのに有効なものとして同定する、

ことを特徴とする上記方法。

10

【請求項 35】

HIV 粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物 Tsg101 タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、

(a) 哺乳動物細胞の培養物中に放出された HIV 粒子のレベルを測定し、ただし、該哺乳動物細胞は、(i) 哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物、および (ii) HIV gag、pol および rev コード配列を含む 1 以上の発現構築物、を含んでいて、前記の哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物と HIV gag、pol および rev 遺伝子にコードされる遺伝子産物とを発現し、

(b) 放出された HIV 粒子のレベルと、類似した条件下で対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出された HIV 粒子のレベルと、を比較し、ただし、該対照の哺乳動物細胞は、HIV gag、pol および rev コード配列を含む 1 以上の発現構築物を含んでいて、HIV gag、pol および rev 遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現するが、哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の一部を含む該発現構築物は含んでおらず、

20

その際、工程 (a) で測定した HIV 粒子のレベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出された HIV 粒子のレベルと比較して所定の閾値レベル未満であれば、前記の哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物を、HIV 粒子の産生を減少させるのに有効なものとして同定する、

ことを特徴とする上記方法。

【請求項 36】

HIV 粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物 Tsg101 タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、

(a) 哺乳動物細胞の培養物中に放出された HIV ウイルス粒子のレベルを測定し、ただし、該哺乳動物細胞は、(i) 哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物、および (ii) HIV gag コード配列を含む発現構築物、を含んでいて、前記の哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物と HIV gag 遺伝子にコードされる遺伝子産物とを発現し、

(b) 放出された HIV ウイルス粒子のレベルと、類似した条件下で対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出された HIV ウイルス粒子のレベルと、を比較し、ただし、該対照の哺乳動物細胞は、HIV gag コード配列を含む 1 以上の発現構築物を含んでいて、HIV gag 遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現するが、哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物を含んでおらず、

40

その際、工程 (a) で測定した HIV ウイルス粒子のレベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出された HIV 粒子のレベルと比較して所定の閾値レベル未満であれば、前記の哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物を、HIV 粒子の産生を減少させるのに有効なものとして同定する、

ことを特徴とする上記方法。

【請求項 37】

哺乳動物細胞の培養物中に放出された HIV 粒子のレベル、および対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出された HIV 粒子のレベルが、粒子に結合した p24 の測定レベルにより表される

50

、請求項34、35または36記載の方法。

【請求項38】

哺乳動物tsg101のコード配列の前記部分がTsg101遺伝子のUEV Aドメイン中の配列である、請求項34、35または36記載の方法。

【請求項39】

所定の閾値レベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物のHIV粒子のレベルと比較して、工程(a)で測定したHIV粒子のレベルの2倍の減少である、請求項38記載の方法。

【請求項40】

所定の閾値レベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物のHIV粒子のレベルと比較して、工程(a)で測定したHIV粒子のレベルの4倍の減少である、請求項38記載の方法。

10

【請求項41】

所定の閾値レベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物のHIV粒子のレベルと比較して、工程(a)で測定したHIV粒子のレベルの90%減少である、請求項40記載の方法。

【請求項42】

所定の閾値レベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物のHIV粒子のレベルと比較して、工程(a)で測定したHIV粒子のレベルの95%減少である、請求項41記載の方法。

【請求項43】

所定の閾値レベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物のHIV粒子のレベルと比較して、工程(a)で測定したHIV粒子のレベルの99%減少である、請求項42記載の方法。

【請求項44】

所定の閾値レベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物のHIV粒子のレベルと比較して、工程(a)で測定したHIV粒子のレベルの99.5%減少である、請求項43記載の方法。

20

【請求項45】

レトロウイルスの産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法であって、レトロウイルスタンパク質のPTAPモチーフを含むペプチドと結合するペプチドを同定することを含んでなる方法。

【請求項46】

前記レトロウイルスがレンチウイルスである、請求項45記載の方法。

【請求項47】

前記レンチウイルスがHIV-1ウイルスである、請求項46記載の方法。

30

【請求項48】

前記レンチウイルスがHIV-2ウイルスである、請求項46記載の方法。

【請求項49】

前記レンチウイルスがサル免疫不全ウイルスである、請求項46記載の方法。

【請求項50】

PTAPモチーフを含むペプチドがHIV Gagタンパク質である、請求項45記載の方法。

【請求項51】

PTAPモチーフを含むペプチドが配列番号4のペプチドである、請求項45記載の方法。

【請求項52】

レトロウイルスの産生を減少させるのに有効である、PTAPモチーフを含むペプチドを同定するための方法であって、TSG101タンパク質またはその断片と結合する、PTAPモチーフを含むペプチドを同定することを含んでなる方法。

40

【請求項53】

前記レトロウイルスがレンチウイルスである、請求項52記載の方法。

【請求項54】

前記レンチウイルスがHIV-1ウイルスである、請求項53記載の方法。

【請求項55】

前記レンチウイルスがHIV-2ウイルスである、請求項53記載の方法。

【請求項56】

前記レンチウイルスがサル免疫不全ウイルスである、請求項53記載の方法。

50

【請求項57】

前記ペプチドが配列番号4の配列を含む、請求項52記載の方法。

【請求項58】

前記tsg101遺伝子がヒトtsg101遺伝子である、請求項34～36および45～57のいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 発明の分野

本発明は、レトロウイルス粒子の産生（例えば、HIV粒子の産生）を阻害するのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質中のペプチドを同定するための方法に関する。本発明はまた、本発明の方法により同定されたペプチド、およびレトロウイルス感染、HIV感染を治療するための前記ペプチドの使用方法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

2. 発明の背景

ヒト免疫不全ウイルスI型（HIV-1）のPr55^{Gag}タンパク質は、細胞膜上の集合(assembly)部位への輸送、ゲノムRNAとの結合および細胞外腔への放出に必要な情報のすべてを含有する（例えば、E. G., Swanstrom, R. & Wills, J. W., 1997, in *Retroviruses*, Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E.編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 263-334を参照されたい）。しかし、Gagはウイルス集合に十分なものではあるが、細胞性タンパク質がこの過程を促進している可能性がある。精製されたピリオンから幾つかの細胞性タンパク質が回収されうるが、このことは、集合粒子への接近性を示唆している（例えば、Arthur, L. O., Bess, J. W., Jr., Sowder, R. C. I., Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J.-C. & Henderson, L. E., 1992, *Science* 258,1935-1938およびOtt, D. E., Coren, L. V., Kane, B. P., Busch, L. K., Johnson, D. J. Sowder, R. C. I., Chertova, E. N., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1996, *J. Virol.* 70,7734-7743を参照されたい）。他のタンパク質はPr55^{Gag}と直接的に相互作用する（例えば、Luban, B., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. & Goff, S. P., 1993, *Cell* 73,1067-1078を参照されたい）。Gagは翻訳後修飾を含有するため、その他のタンパク質との相互作用も示唆されている（例えば、Bryant, M. & Ratner, L., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,523-527; Camaur, D., Gallay, P., Swingler, S. & Tirono, D., 1997, *J. Virol.* 71,6834-6841; Gottlinger, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86,5781-5785; Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1998, *J. Virol.* 72,2962-2968）。成熟粒子の放出に必要なGag中の領域である後期(L)ドメイン（例えば、Wills, J. W., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, *J. Virol.* 68, 6605-6618; Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88,3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, *J. Virol.* 69,6810-6818を参照されたい）が該タンパク質とユビキチン化機構との相互作用を指令することが新たに報告されている（例えば、Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13057-13062; Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13063-13068; Vogt, V. M., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,12945-12947; Ott, D. E., Coren, L. V., Chertova, E. N., Gagliardi, T. D. & Schubert, U., 2000, *Virology* 278, 111-121, Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13069-13074を参照されたい）。Tsg101は、その配列および最近の研究に基づけば、細 40 50

胞内輸送の調節、転写調節および細胞周期の制御に關与するユビキチン (Ub) 結合性E2酵素変異体 (variant) (UEV) タンパク質である (例えば、Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1,242-258; Lemmon, S. K. & Traub, L. M., 2000, *Curr. Opin Cell Biol.* 12,457-466, Xie, W., Li, L. & Cohen, S. N., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,1595-1600; Zhong, Q., Chen, Y., Jones, D. & Lee, W. H., 1998, *Cancer Res.* 58,2699-2702; Sun, Z., Pan, S., Hope, W. X., Cohen, S. N. & Balk, S. P., 1999, *Cancer* 86,689-96を参照されたい)。UEVタンパク質は、タンパク質基質またはUb結合性 (E3) 酵素へのUbの結合および移行に不可欠なきわめて重要なCys残基を欠いている (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* 75,467-469)。それらは進化において高度に保存されており、E2酵素と構造的に關連したタンパク質の新規ファミリーを構成するが、E2酵素とは明確に区別される。

10

【0003】

すべてのレトロウイルスは、そのウイルスの構造的機能および酵素的機能を定める3つの遺伝子gag、polおよびenvを共有している (例えば、Swanstrom, R. & Wills, J. W., 1997, in *Retroviruses*, Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E.編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 263-334を参照されたい)。gag遺伝子は単独で、未熟ウイルス様粒子の集合、および感染細胞からのその放出に十分なものである。感染粒子を形成するように成熟するためには、pol中にコードされているウイルスコード化プロテアーゼ (PR) が必要である。gagがコードするタンパク質 (Gag) は、集合および放出に關与している、明確に区別されるドメインを含有する。N末端マトリックス (MA) 領域に位置する細胞膜結合性 (M) ドメイン、ゲノムを封入するコア構造体を形成するキャプシド (CA) ドメイン、ヌクレオキャプシド (NC) 領域内のタンパク質相互作用 (I) ドメイン、および細胞膜からの出芽による放出に必要な後期 (L) ドメインが存在する。LDメインは、レトロウイルスにおいて高度に保存されたProリッチモチーフである。ラブドウイルス、フィブ (fib) ウイルス、エプスタインバーウイルスなどの他の包膜ウイルス、および細胞性タンパク質も、Proリッチモチーフをもっている (Harty, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huibregtse, I. & Hayes, F. P., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13871-13876; Wills, J. W., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, *J. Virol.* 68,6605-6618; Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88,3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, *J. Virol.* 69,6810-6818; Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L. C. & Longnecker, R., 2000, *Virology* 268,178-191; Yasuda, J. & Hunter, E., 1998, *J. Virol.* 72, 4095-4103; Harty, R. N., Paragas, J., Sudol, M. & Palese, P., 1999, *J. Virol.* 73,2921-2929)。レトロウイルスにおけるLDメインは、アミノ酸配列とそれぞれのウイルス構造タンパク質内の位置が様々であるものの、機能的には互換性があり (Wills, J. W., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, *J. Virol.* 68, 6605-6618; Parent, L. J., Bennett, R. P., Craven, R. C., Nelle, T. D., Krishna, N. K., Bowzard, J. B., Wilson, C. B., Puffer, B. A., Montelaro, R. C. & Wills, J. W., 1995, *J. Virol.* 69,5455-5460)、このことは、機能が共通していることを示唆している。

20

30

40

【0004】

TSG101遺伝子のタンパク質産物は元々は、マウス繊維芽細胞においてその機能的不活性化に關連した可逆的異常増殖により同定されたものである (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* 85, 319-329)。Tsg101は転写のモジュレーション (Sun, Z., Pan, J., Hope, W. X., Cohen, S. N. & Balk, S. P., 1999, *Cancer* 86,689-96; Watanabe, M., Yanagi, Y., Masahiro, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., Yanagisawa, J., & Kato, S., 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245,900-905; Hittleman, A. B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J. A., Freedman, L. P., & Garabedian, M. J., 1999, *Embo J.* 18,5380-5388) と、ユビキチン化およびタンパク質分解の抑制 (Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T.

50

W., & Cohen, S. N., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98,1619-1624) との両方において機能しうることが、配列分析から示唆されており (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, Cell 85, 319-329; Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, Nat. Genet. 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, J. Mol. Med. 75,467-469)、また、実験的証拠により示されている。後者の作用はN末端領域により媒介され、そのN末端領域は、ユビキチン (Ub) コンジュガーゼ (conjugase) (E2) 様ドメインを含有するが、Ubの結合にきわめて重要な活性部位であるCys残基を欠いている。Tsg101のUEVドメインの構造、ならびにUbおよびPTAPとのその相互作用様式も報告されている (Pornillosら, 2002, EMBO J. 21: 2397-2406)。

【0005】

Tsg101を欠損した細胞は核、微小管および紡錘体の種々の異常を示し (Xie, W., Li, L. & Cohen, S. N., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95,1595-1600; Zhong, Q., Chen, Y., Jones, D. & Lee, W. H., 1998, Cancer Res. 58,2699-2702)、tsg101ヌル突然変異マウスは、不完全な細胞増殖および早期胎児死を呈する (Ruland, J., Sirard, C., Elia, A., MacPherson, D., Wakeham, A., Li, L., de la Pompa, J. L., Cohen, S. N., & Mak, T. W., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98,1859-1864)。Tsg101の定常状態レベルは、通常、培養されたマウスおよびヒト細胞系においては翻訳後に狭い範囲内で制御されており (Feng, G. H., Lih, C.-J., & Cohen, S. N., 2000, Cancer Research 60,1736-1741)、外来性プロモーターからの過剰発現およびtsg101の欠損は悪性形質転換を招くことがある (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, Cell 85,319-329)。Tsg101タンパク質レベルの調節は、UbリガーゼであるMdm2による影響を受けることがあり (Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T. W., & Cohen, S. N., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98,1619-1624)、ヒト、線虫*C. elegans*、分裂酵母*S. pombe*およびキイロシヨウジョウバエ (*D. melanogaster*) に及ぶ多様な生物において進化的に高度に保存されたC末端Tsg101配列を必要とする (Feng, G. H., Lih, C.-J., & Cohen, S. N., 2000, Cancer Research 60, 1736-1741; Bishop NおよびWoodman P., 2001, J Biol Chem. 276: 11735-42)。

【0006】

*S. cerevisiae*におけるクラスE液胞タンパク質ソーティング (vps) タンパク質であるStp22p/Vps23はTsg101のオルソログとして同定されており、Tsg101自体は膜結合型タンパク質の輸送に関与している (Bishop NおよびWoodman P., 2001, J Biol Chem. 276: 11735-42; Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, Traffic 1, 242-258; Li, Y., Kane, T., Tipper, C., Spatrick, P. & Jenness, D. D., 1999, Mol. & Cell Biol. 19,3588-3599)。また、SL6細胞は、複数の表面結合型タンパク質のソーティングに欠陥があることが示されている (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, Traffic 1, 242-258)。

【0007】

前記の参考文献の引用は、そのような参考文献が本発明の先行技術であることを認めるものと解釈されるものではない。

【発明の開示】

【0008】

3. 発明の概要

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) のPTAPモチーフまたはLドメインに結合する、哺乳動物Tsg101タンパク質中のペプチドを同定するための方法を提供する。そのようなペプチドは、Tsg101-HIV Gag結合を阻害するために使用することが可能であり、したがって、HIV粒子の産生を減少させるのに有効である。本発明の好ましい実施形態においては、(a) 哺乳動物細胞 (該哺乳動物細胞は、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物を含んでいて、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物を発現し、かつHIVウイルスに感染している) の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルを測定し、(b) 該HIVウイルス粒子のレベルと、類似した条件下で対照の哺乳動物細胞 (該対照の哺乳動物細胞は、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の

10

20

30

40

50

一部分を含む上記発現構築物を含まない)の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルと、を比較することを含む方法により、哺乳動物tsg101タンパク質中のペプチドを同定する。前記方法においては、工程(a)で測定したHIVウイルス粒子のレベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物中のHIVウイルス粒子のレベルと比較して所定の閾値レベル未満であれば、前記の哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物は、HIV粒子の産生を減少させるのに有効であると同定される。好ましい実施形態においては、哺乳動物細胞の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベル、および対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルは、粒子に結合したp24の測定レベルにより表される。本発明の好ましい実施形態においては、所定の閾値レベルは、対照の哺乳動物細胞の培養物のHIVウイルス粒子のレベルと比較して、工程(a)で測定したHIVウイルス粒子のレベルの2倍、4倍、90%、95%、99%または99.5%の減少である。

10

【0009】

本発明のもう1つの好ましい実施形態においては、(a)哺乳動物細胞[該哺乳動物細胞は、(i)哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物および(ii)HIV gagコード配列を含む発現構築物を含んでいて、前記の哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物とHIV gag遺伝子にコードされる遺伝子産物とを発現する]の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルを測定し、(b)該放出HIVウイルス粒子のレベルと、類似した条件下で対照の哺乳動物細胞(該対照の哺乳動物細胞は、HIV gagコード配列を含む1以上の発現構築物を含んでいて、HIV gag遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現するが、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物を含まない)の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルと、を比較することを含む方法により、哺乳動物tsg101タンパク質中のペプチドを同定する。本発明の更にもう1つの好ましい実施形態においては、(a)哺乳動物細胞[該哺乳動物細胞は、(i)哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物および(ii)HIV gag、polおよびrevコード配列を含む1以上の発現構築物を含んでいて、前記の哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物とHIV gag、polおよびrev遺伝子にコードされる遺伝子産物とを発現する]の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルを測定し、(b)該放出HIVウイルス粒子のレベルと、類似した条件下で対照の哺乳動物細胞(該対照の哺乳動物細胞は、HIV gag、polおよびrevコード配列を含む1以上の発現構築物を含んでいて、HIV gag、polおよびrev遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現するが、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物を含まない)の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルと、を比較することを含む方法により、哺乳動物tsg101タンパク質中のペプチドを同定する。これらの実施形態においては、工程(a)で測定したHIVウイルス粒子のレベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルと比較して、所定の閾値レベル未満であれば、前記の哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物は、HIV粒子の産生を減少させるのに有効であると同定される。好ましい実施形態においては、哺乳動物細胞の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベル、および対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルは、粒子に結合したp24の測定レベルにより表される。本発明の好ましい実施形態においては、所定の閾値レベルは、対照の哺乳動物細胞の培養物の粒子結合p24のレベルと比較した場合、工程(a)で測定した粒子結合p24のレベルの2倍、4倍、90%、95%、99%または99.5%の減少である。

20

30

40

【0010】

本発明はまた、レトロウイルス粒子(例えば、HIV-1およびHIV-2、サル免疫不全ウイルス(SIV)を含むレンチウイルスの粒子が挙げられるが、これらに限定されるものではない)の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法を提供する。前記方法は、レトロウイルスタンパク質(例えば、HIV Gagタンパク質)のPTAPモチーフを含むペプチドに結合するペプチドを同定することを含む。好ましい実施形態においては、PTAPモチーフを含むペプチドは配列番号4のペプチドである。もう1つの好ましい実施形態においては、PTAPモチーフを含むペプチドはH

50

IV Gagタンパク質である。

【0011】

本発明はまた、レトロウイルス粒子（例えば、HIV-1およびHIV-2、サル免疫不全ウイルス（SIV）を含むレンチウイルスの粒子が挙げられるが、これらに限定されるものではない）の産生を減少させるのに有効である、PTAPモチーフを含むペプチドを同定するための方法を提供する。前記方法は、Tsg101タンパク質に結合するPTAPモチーフを含むペプチドを同定することを含む。好ましい実施形態においては、該ペプチドは配列番号4の配列を含む。

【0012】

本発明はまた、本発明の方法により同定されたペプチド、およびHIV感染を治療するための、そのようなペプチドの使用法を提供する。 10

【0013】

4. 図面の説明

図1. ツーハイブリッドアッセイを用いた、Tsg101結合に必要とされるPr55^{Gag}中の領域の同定。ガラクトシダーゼ単位の測定により、レポーター遺伝子の活性化を定量した。図1A: Gagおよびp1-p6とTsg101との相互作用。Gagおよびp1-p6のガラクトシダーゼ活性は、2つの独立した試験において同等であった。図1B: p1-p6とTsg101との相互作用（100%とみなす）は、20の独立した試験において約10~30ガラクトシダーゼ単位の範囲であった。陰性相互作用は、Tsg101を欠くベクターでp1-p6を同時形質転換した場合に得られたものと同様であった（<0.3単位）。この図は、野生型相互作用に対するパーセント+/- 1%として6つの独立した試験において突然変異体に関して得られた平均値を示している。 20

【0014】

図2. PR55^{Gag}とTsg101とのin vitro結合。図2A: 免疫捕捉された放射能標識Tsg101を検出するオートラジオグラフィ。レーン1, RRLにおいて合成されたTsg101。レーン2~9, プロテインAビーズ上に固定化された抗T7（レーン3）、抗CA（レーン7、8）または抗p6（レーン9）IgGに結合した未標識Pr55GSへの放射性Tsg101の結合の測定。抗体は「材料および方法」において定義されている。レーン2~9において使用したRRLの量は、レーン1において使用した量より5倍多かった。図2B: ウェスタン分析による該ビーズ上のPR55^{Gag}の存在の証明。Aにおいて使用した抗体で免疫沈降したGagタンパク質を可視化するために、CAドメイン中の抗原部位に対するモノクローナル抗体を使用した。該パネルの左側に分子量マーカー（kDa）が示されている。 30

【0015】

図3. 細胞質抽出物由来のPR55^{Gag}とTsg101との共免疫沈降。図3A: 全細胞質抽出物。rev（レーン1）、rev、gagおよびpol（レーン2）、またはrev、gag p6およびpol（レーン3）でトランスフェクトされた細胞から抽出物を調製した。図3B: rev（レーン1）； rev、野生型gagおよびpol（レーン2）；またはrev、gag^{p6}およびpol（レーン3）でトランスフェクトされた細胞の抽出物を使用した、抗Tsg101モノクローナル抗体での免疫沈降（抗NCポリクローナル抗体により検出）。免疫沈降物中のTsg101の存在を確認するために、プロットを抗Tsg101ポリクローナル抗体で再びプローブした（レーン4~6）。図3C: rev（レーン1）またはrev、gagおよびpol（レーン2）でトランスフェクトされた細胞からの抽出物を使用した、抗CAポリクローナル抗体での免疫沈降（抗Tsg101モノクローナル抗体により検出）。免疫沈降物中のGagの存在を確認するために、プロットを抗CAモノクローナル抗体で再びプローブした（レーン3、4）。パネルの左側に分子量マーカー（kDa）が示されている。 40

【0016】

図4. Pr55^{Gag}結合に必要とされるTsg101中の領域の同定。Tsg101のトランケート型（図4A）および置換型（図4Bおよび4C）突然変異体を、p1-p6融合タンパク質との相互作用に関してツーハイブリッドアッセイで試験した。この図は、野生型相互作用に対する割合（%）（+/- 2~6%の誤差を伴う）としての平均値を示している。表示は図1の説明のとおり 50

である。

【0017】

図5. ウイルス産生および細胞局在に及ぼすTsg101欠損の影響。図5A: gagトランスフェクト細胞から調製したNIH 3T3およびSL6ライセートをSDS-PAGEにより分離し、全タンパク質に対してクーマシーブルーにより染色し(レーン1および2)、 Na^+K^+ ATPアーゼ、アクチンおよびTsg101に関してウェスタンブロット法により分析した(レーン3および4)。図5B~5D: (5B) ウイルス粒子、(5C) NIH 3T3およびSL6細胞のS1抽出物[挿入図, pHIVトランスフェクトNIH 3T3細胞のS100(レーン1)およびP100(レーン2)画分]、(5D) SL6細胞のS1およびP1抽出物のウェスタンブロット。該ブロットは、抗CAウサギ血清(図5Bおよび5C)または抗NCヤギ抗血清(図5D)でプローブした。ウェスタン分析用の同等のサンプルをバイオラッド(Biorad)アッセイにより測定した。

10

【0018】

図6. HIV-1粒子の放出に及ぼす野生型Tsg101の過剰発現の影響。図6A: 野生型Tsg101_{FLAG}の誘導発現。トランスフェクトCOS-1細胞から調製したS1画分を、抗Tsg101抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。pa, 誘導物質ポナステロン。図6B: 抗CA抗体を使用するウェスタンブロット法に粒子を付すことにより分析した、COS-1細胞からのHIV-1の放出に及ぼすTsg101-FLAG過剰発現の影響。左側に分子サイズマーカーの移動位置が示されている。

【0019】

図7. HIV-1粒子の放出に及ぼす突然変異Tsg101の過剰発現の影響。図7A: Tsg101_{FLAG} 34 8-351Gの誘導発現。図7B: HIV-1粒子の産生に及ぼすTsg101-FLAG過剰発現の影響。図6の説明に記載のとおり、S1画分およびウイルス粒子を分析した。

20

【0020】

図8. 抗Tsg101抗体による細胞質抽出物中のウイルスタンパク質の免疫沈降。図8A: FLAG標識野生型(レーン1および3)または突然変異型(レーン2および4) Tsg101を発現する模擬トランスフェクト(レーン1および2)およびgagトランスフェクト(レーン3および4) COS-1細胞から調製した細胞質抽出物を、抗p6抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。tsg101をコードする2 μ gのDNAおよび5 μ M paを使用して、発現を誘導した。図8B~8D: 該抽出物を抗Tsg101ウサギポリクローナル抗体で免疫沈降させ、(8B) 抗p6抗体、(8C) 抗FLAG抗体および(8D) 抗Tsg101マウスモノクローナル抗体でタンパク質に関してプローブした。

30

【0021】

図9. ウイルスタンパク質の細胞内定常状態レベルに及ぼすTsg101過剰発現の影響。Rev(図9A、レーン1および3)、野生型Gag(図9Bおよび9C、レーン1および3)またはGag p6(図9Bおよび9C、レーン2および4)、およびFLAG標識野生型(図9B)または突然変異型(図9C) Tsg101を発現する細胞から、細胞質抽出物を調製した。S1(レーン1および2)およびP1(レーン3および4)画分を、抗CA抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。

【0022】

5. 発明の詳細な記載

40

本発明によれば、Gag前駆体ポリタンパク質のC末端p6領域内に位置する、ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)のPTAPモチーフまたはLDメインが、in vitroでトランスフェクト細胞の細胞質中のtsg101遺伝子のタンパク質産物と結合することが見出された。本発明は、Tsg101-HIV Gag結合を阻害する分子、例えば、PTAPモチーフの少なくとも4個連続したアミノ酸を含むペプチド、を試験するためのアッセイを提供する。好ましくは、本発明のアッセイは、HIVウイルス放出の少なくとも2倍、4倍、90%、95%、99%または99.5%の減少を達成する分子(例えば、ペプチド)を同定するために使用する。前記アッセイにより同定された分子(例えば、ペプチド)は、HIV-1または他のレトロウイルスに感染した患者を治療するための治療用組成物として使用することができる。

【0023】

50

また、驚くべきことに、Tsg101タンパク質の過少発現または過剰発現によるTsg101タンパク質の定常レベルの変動（perturbation）が、マウスおよび霊長類細胞からのHIV-1ウイルス様粒子の放出にマイナスの影響を及ぼすことを見出した。したがって、本発明は、1以上の製薬上許容される担体または希釈剤と哺乳動物Tsg101タンパク質とを含んでなる医薬組成物を提供する。本発明のもう1つの態様においては、HIV粒子の産生を減少させるのに有効である哺乳動物Tsg101タンパク質の断片を同定するためのアッセイを提供する。本発明で用いる「HIV粒子」は、成熟ウイルス様粒子および未熟ウイルス様粒子の両方を含む。HIV粒子の産生を減少させるのに有効であると本アッセイにより同定された、本発明でTsg101の「ペプチド」と称されるTsg101の断片は、HIV-1または他のレトロウイルスに感染した患者を治療するための治療用組成物として有用である。したがって、1種以上の本発明のペプチドと1種以上の製薬上許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物も提供する。

10

【0024】

したがって、本発明の1つの実施形態においては、HIV粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドを同定するための方法を提供する。前記方法は、（a）第1発現構築物（第1発現構築物は哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む）を哺乳動物細胞内に導入し、（b）HIVウイルス、またはHIV gag、polおよびrevコード配列を含む1以上の発現ベクターを該哺乳動物細胞内に導入し、（c）該トランスフェクト哺乳動物細胞を、適当な培地中、十分な時間にわたり及び十分な条件下でインキュベートして、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物ならびにHIV gag、polおよびrev遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現する哺乳動物細胞の培養物を得る工程を含む。HIV gag、polおよびrev遺伝子を含む1以上の発現ベクターを使用して細胞をトランスフェクトした場合には、粒子に結合したp24（キャプシドタンパク質）のレベルを測定することができる。哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物でトランスフェクトされていない対照の哺乳動物細胞培養物と比較して、粒子結合p24のレベルが低いという知見は、HIV粒子形成を減少させるのに有効なTsg101ペプチドの同定と相関する。哺乳動物細胞にHIVウイルスを加えた場合には、前記のとおり、粒子結合p24を測定し、相関づけることが可能である。あるいは、哺乳動物細胞にHIVウイルスを加えた場合には、該細胞から放出されたHIV粒子を定量することができる。哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物でトランスフェクトされていない対照の哺乳動物細胞培養物と比較して、HIV粒子の産生が少ないという知見は、HIV粒子の産生を減少させるのに有効なペプチドの同定と相関する。

20

30

【0025】

本発明のもう1つの実施形態においては、（a）哺乳動物細胞（該哺乳動物細胞は、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物を含んでいて、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物を発現し、かつHIVウイルスに感染している）の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルを測定し、（b）該HIV粒子のレベルと、類似した条件下で対照の哺乳動物細胞（該対照の哺乳動物細胞は、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む該発現構築物を含まない）培養物中に放出されたHIV粒子のレベルとを、比較することを含む方法により、哺乳動物tsg101タンパク質中のペプチドを同定する。前記方法においては、工程（a）で測定したHIV粒子のレベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物のHIV粒子のレベルと比較して、所定の閾値レベル未満であれば、前記の哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物は、HIV粒子の産生を減少させるのに有効であると同定される。

40

【0026】

本発明の更にもう1つの実施形態においては、（a）哺乳動物細胞〔該哺乳動物細胞は、（i）哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物および（ii）HIV gagコード配列を含む発現構築物を含んでいて、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物とHIV gag遺伝子にコードされる遺伝子産物とを発現する〕の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルを測定し、（b）該放出HIVウイルス粒子の

50

レベルと、類似した条件下で対照の哺乳動物細胞（該対照の哺乳動物細胞は、HIV gagコード配列を含む1以上の発現構築物を含んでいて、HIV gag遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現するが、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む該発現構築物を含まない）の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルとを、比較することを含む方法により、哺乳動物tsg101タンパク質中のペプチドを同定する。

【0027】

本発明の更にもう1つの実施形態においては、(a)哺乳動物細胞〔該哺乳動物細胞は、(i)哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物ならびに(ii)HIV gag、polおよびrevコード配列を含む1以上の発現構築物を含んでいて、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物とHIV gag、polおよびrev遺伝子にコードされる遺伝子産物とを発現する〕の培養物中に放出されたHIV粒子のレベルを測定し、(b)該放出HIV粒子のレベルと、類似した条件下で対照の哺乳動物細胞（該対照の哺乳動物細胞は、HIV gag、polおよびrevコード配列を含む1以上の発現構築物を含んでいて、HIV gag、polおよびrev遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現するが、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む該発現構築物を含まない）の培養物中に放出されたHIV粒子のレベルとを、比較することを含む方法により、哺乳動物tsg101タンパク質中のペプチドを同定する。これらの実施形態においては、工程(a)で測定したHIVウイルス粒子のレベルが、対照の哺乳動物細胞の培養物中に放出されたHIVウイルス粒子のレベルと比較して、所定の閾値レベル未満であれば、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の該部分にコードされる遺伝子産物は、HIV粒子の産生を減少させるのに有効であると同定される。

10

20

【0028】

本発明の好ましい実施形態においては、同定されたペプチドは、放出されたHIV粒子のレベルまたは培養物中の粒子結合p24のレベルの少なくとも2倍、4倍、90%、95%、99%または99.5%の減少を引き起こす。

【0029】

もう1つの実施形態においては、HIV粒子の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドを同定するための方法は、前記の方法において、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の一部を含む発現構築物を使用する代わりに、哺乳動物Tsg101タンパク質のランダムな断片（ペプチド）を作製し、同様にHIVに感染した又はHIV gag、polおよびrevコード配列を含む1以上の発現構築物でトランスフェクトされた哺乳動物細胞に添加することにより行うことが可能である。Tsg101断片（ペプチド）は、周知の浸透（permeation）方法を用いて哺乳動物細胞内に導入することができる。この実施形態は、HIVまたは他のウイルス粒子の産生を減少させるのに有効である他の分子の同定にも適用可能であることが、当業者には明らかであろう。したがって、本発明のもう1つの態様においては、HIVまたは他のウイルス粒子の産生を減少させるのに有効である分子を同定するための方法を提供する。

30

【0030】

もう1つの実施形態においては、本発明は、レトロウイルス粒子（例えば、HIV-1およびHIV-2、サル免疫不全ウイルス（SIV）を含むレンチウイルスの粒子が挙げられるが、これらに限定されるものではない）の産生を減少させるのに有効である、哺乳動物Tsg101タンパク質由来のペプチドまたは断片を同定するための方法を提供する。前記方法は、HIV Gagタンパク質のPTAPモチーフを含むペプチドに結合するペプチドを同定することを含む。好ましい実施形態においては、PTAPモチーフを含むペプチドは配列番号4のペプチドである。もう1つの好ましい実施形態においては、PTAPモチーフを含むペプチドはHIV Gagタンパク質である。ペプチドの結合を同定するための、当業者に公知の任意の標準的な方法を用いることができる。

40

【0031】

好ましくは、哺乳動物tsg101遺伝子のコード配列の前記部分は、Tsg101のUEV Aドメインの少なくとも一部を含む。UEV A領域は哺乳動物Tsg101のアミノ酸1～140にまたがっている。

50

【0032】

もう1つの好ましい実施形態においては、哺乳動物細胞が霊長類細胞である。本発明を実施するのに有用な哺乳動物細胞には、ミドリザル腎細胞、ヒトHeLa細胞およびヒト293細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。これらの及び他の哺乳動物細胞系は、American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va)のような種々の入手源から入手可能である。

【0033】

哺乳動物 tsg101 遺伝子はどのような哺乳動物細胞から得てもよい。例えば、ヒト tsg101 遺伝子は B 細胞または B 細胞ライブラリーから単離することができる (Durfee T.ら, 1993, *Genes Dev.* 7: 555-569)。同様に、マウスまたは他の哺乳動物 tsg101 遺伝子を B 細胞または B 細胞ライブラリーから単離することもできる。ヒト tsg101 遺伝子およびマウス tsg101 遺伝子のヌクレオチド配列および対応アミノ酸配列は公知である。例えば、参照により本明細書に組み入れる Li, L.ら (1997) *Cell* 88: 143-154 を参照されたい。関連するマウスおよびヒト tsg101 遺伝子も、参照により本明細書に組み入れる米国特許第 5,807,995 号、第 5,892,016 号、第 5,679,523 号および第 5,891,668 号に開示されている。前記の開示および本明細書に記載の他の任意の刊行物を、それらの内容が本明細書に完全に記載されているものとして、参照により本明細書に組み入れることとする。また、マウス Tsg101 タンパク質は、本明細書では配列番号 1 として記載されている。ヒト Tsg101 タンパク質は、本明細書では配列番号 2 として記載されている。

【0034】

哺乳動物 Tsg101 タンパク質由来のペプチドは、tsg101 コード配列の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方を遺伝子操作によりトランケートすることにより得ることができる。in vitro 突然変異誘発は、簡便な制限部位を導入するのに有用である。この用途に特に適した種々の商業的に入手可能なキットがあり、例えば、T7-Gene in vitro Mutagenesis Kit (USB, Cleveland, OH) および Quikchange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, San Diego, CA) が挙げられる。あるいは、tsg101 コード配列の特定の部分の直接的な増幅を可能にするような PCR プライマーを画定することができる (例えば、実施例 1 を参照されたい)。好ましくは、tsg101 コード配列の前記部分は UEVA 領域の一部に対応する。哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の前記部分は、多種多様なタイプの配列ベクター内に挿入することができる。例えば、哺乳動物 tsg101 遺伝子のコード配列の部分を含む発現構築物は、哺乳動物細胞内で機能する任意の発現構築物でありうる。より好ましい実施形態においては、ヘテロ二量体のエクジソン誘導性受容体 [これは、ホルモンであるエクジソンまたはエクジソン類似体 (例えば、プロナステロン) と一緒になって、転写アクチベーター複合体を形成し、該複合体は tsg101 の発現を駆動するプロモーターに結合する] の両方の単量体をコードするベクター内に、tsg101 遺伝子の一部のコード配列を配置する。

【0035】

種々の HIV 遺伝子をコードする発現ベクターが広く知られており、入手可能である。例えば、tgp-RRE-r (Smithら 1990 *J. Virol.* 64:2743-2750) は、gag コード領域および pol コード領域の両方を含む発現ベクターである。pCMV-rev は、HIV-1 rev 遺伝子を含む発現ベクターである。Rev は、gag および pol の発現に必要な HIV-1 コード化タンパク質である。哺乳動物宿主細胞においては、tsg101 コード配列の一部ならびに HIV gag、pol および rev コード配列を発現させるために、ウイルスおよび細胞 DNA からエレメントを用いる多数の発現系を利用することができる。

【0036】

細胞から放出された HIV 粒子を定量するためには、任意の公知方法を用いることができる。細胞から放出された HIV 粒子の定量は、種々の方法、例えば、p24 ELISA により又は Flint, S. J.ら, 2000, *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*, ASM Press, Washington, D. C. に記載の感染性アッセイにより行うことができる。まず、フィルター (例えば、0.22 μ m のフィルター) に通し、ついで 20% スクロースク

10

20

30

40

50

ッションによる超遠心に付すことにより、ウイルス粒子を培地または上清から単離する。適当な界面活性剤（例えば、1% SDS）でHIV粒子を破壊した後、12.5% SDSポリアクリルアミドゲルによる電気泳動およびそれに続く、p24に特異的な抗体 [例えば、天然形態のC Aタンパク質に対して産生させた抗CAウサギポリクローナル抗体（Ehrlich, L. S.ら, 1990 AIDS Res & Hum. Retro. 6:1169-1175）または抗CAMウスモノクローナル抗体（NEN-Du Pont）] を使用するウェスタンブロット法により、p24タンパク質を分離することができる。

【0037】

本発明においては、HIV粒子の産生を減少させるのに有効であり、かつ前記の本発明アッセイにより同定された、哺乳動物Tsg101タンパク質の少なくとも約4個連続したアミノ酸を含むTsg101ペプチドを提供する。好ましくは、本ペプチドは、HIV粒子の産生を減少させるのに有効であり、前記の本発明アッセイにより同定された、少なくとも約5個連続したアミノ酸を含む。より一層好ましいのは、少なくとも約6個連続したアミノ酸を含み、HIV粒子の産生を減少させるのに有効であり、前記の本発明アッセイにより同定されたペプチドである。最も好ましい実施形態においては、本ペプチドは少なくとも約7個連続したアミノ酸を含む。したがって、例えば、本ペプチドは、配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列の少なくとも約4個、好ましくは少なくとも約5個、より好ましくは少なくとも約6個、最も好ましくは少なくとも約7個連続したアミノ酸を含みうる。好ましくは、本ペプチドは、哺乳動物Tsg101タンパク質のUEV Aドメインの部分に由来する又はそれを含む。本発明で用いる「ペプチド」は、少なくとも約4個のアミノ酸を含むTsg101タンパク質の断片を意味する。したがって、ペプチドは、哺乳動物Tsg101タンパク質のわずか約4個のアミノ酸しか含まないものであってもよい。本ペプチドはまた、哺乳動物Tsg101タンパク質由来の約4～約140の任意の個数の連続的アミノ酸を含みうる。本発明では、約140アミノ酸より大きなアミノ酸配列はTsg101断片と称される。また、本ペプチドの類似体、ホモログ、断片、化学誘導体および製薬上許容される塩も、「ペプチド」なる語の範囲内に含まれる。本ペプチドはアミノ酸単位の反復も含みうる。

【0038】

「類似体」は、本ペプチドのアミノ酸配列における置換体または改変体を意味し、ここで、アミノ酸残基の置換または改変、例えば付加および欠失は、HIV粒子の産生を減少させる又はTsg101-Gag結合を阻害するという特性を妨げない。したがって、類似体は、本ペプチドと実質的に同一なアミノ酸配列を有し、かつ1個以上のアミノ酸残基が化学的に類似したアミノ酸で保存的に置換されているペプチドを含みうる。

【0039】

本ペプチドを製造するための前記の組換えDNA技術に加えて、多数の公知技術により、本発明のペプチドを合成することができる。例えば、MerrifieldによりJ. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963)に最初に記載された固相合成法を用いて、ペプチドを製造することができる。他のペプチド合成技術は、M. Bodanszkyら, Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d Ed. (1976)、および当業者に容易に入手可能な他の参考文献に記載されている。ポリペプチド合成技術の概要は、J. StuartおよびJ. D. Young. Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984)に記載されている。また、The Proteins, Vol. II, 3d Ed., Neurath, H.ら編, p.105-236, Academic Press, New York, N. Y. (1976)に記載されている液相法によっても、ペプチドを合成することができる。種々のペプチド合成に使用する適当な保護基は、前記文献およびJ. F. W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Pelenu Press, New York, N. Y. (1973)に記載されている。

【0040】

また、哺乳動物Tsg101タンパク質のより大きな部分または全哺乳動物Tsg101タンパク質の化学的または酵素的切断によっても、本発明のペプチドを製造することが可能であろう。本発明のペプチドは、好ましくは、Merrifieldの固相法により化学合成する。一般には、この方法は、1個以上のアミノ酸残基の逐次的付加によりペプチド鎖を伸長させることを

10

20

30

40

50

含む。通常、第1アミノ酸残基のアミノ基またはカルボキシル基を、選択的に除去しうる適当な保護基で保護する。反応性側鎖基を含有するアミノ酸（例えば、リシン）には、選択的に除去しうる異なる保護基を使用する。

【0041】

好ましい固相合成法は、保護された又は誘導体化されたアミノ酸をその未保護カルボキシルまたはアミノ基を介して不活性固相支持体に結合させることを含む。ついで該アミノまたはカルボキシル基の保護基を選択的に除去し、適切に保護された相補（complementary）（アミノまたはカルボキシル）基を有する次の配列順序のアミノ酸を混合し、固相支持体に既に結合している残基とのアミド結合の形成に適した条件下で反応させる。ついでアミノまたはカルボキシル基の保護基を、この新たに付加されたアミノ酸残基から除去し、次のアミノ酸（適切に保護されたもの）を加えることを繰り返す。すべての所望のアミノ酸が適当な配列で連結された後、残存している末端保護基および側鎖保護基（固相支持体を含む）を逐次的または同時に除去して、最終的なペプチドを得る。

10

【0042】

本発明の更にもう1つの態様においては、HIV-1後期（L）ドメインの少なくとも4個連続したアミノ酸を含みかつTsg101タンパク質とHIV Gagとの間の相互作用を阻害するペプチドを同定するための方法を提供する。HIV-1後期Lドメインは、アミノ酸配列PTAPP（配列番号3）（これはPTAPPモチーフとも称される）から構成される。したがって、前記方法により同定されたペプチドはPTAPPモチーフの少なくとも4個連続したアミノ酸を有し、また、アミノ末端およびカルボキシ末端の一方または両方に追加的なアミノ酸を含みうる。好ましくは、前記方法により同定されたペプチドは、PTAPPモチーフを含む少なくとも7個のアミノ酸を含む。より好ましくは、前記方法により同定されたペプチドは、PTAPPモチーフの少なくとも4個のアミノ酸と、天然においてPTAPPモチーフに隣接している1個以上のアミノ酸とを含む。PTAPPから誘導されるペプチドは、5アミノ酸PTAPPモチーフの反復を含むことができる。PTAPPモチーフに隣接したアミノ酸を以下に示す（Lドメインが下線で示されている）。

20

ALQSRPEPTAPPEES（配列番号4）。

【0043】

HIV-1 Gagp6後期（L）ドメインを含みかつTsg101タンパク質とHIV Gagとの相互作用を阻害するペプチドを同定するための方法は、以下の工程を含む。第1に、HIV-1 GagまたはHIV-1 Gagp6後期（L）ドメインを含むペプチドを固相支持体または表面（例えば、ビーズ、プレート、スライドまたはマイクロタイターディッシュ）上に固定化する。固定化は、特異的抗GagもしくはHIV Gagp6後期ドメイン抗体または他の化学的リンカー（例えば、UVクロスリンカー）を使用して行なうことができる。実験用および対照用の両方の試験を行う。したがって、少なくとも2つの個別の固相支持体または表面（すなわち、第1および第2固相支持体または表面）は、その上に固定化されたHIV-1 GagまたはHIV-1 Gagp6後期（L）ドメインを有する（例えば、実験用試験のための1つのカラムおよび対照用試験のための1つのカラム）。標識Tsg101タンパク質、バッファーおよびHIV-1 Gagp6後期（L）ドメイン含有ペプチドを含む第1（実験用）反応混合物を、十分な時間にわたり約4℃でインキュベートする。また、標識TSG101とバッファーとを含む第2（対照用）反応混合物を、十分な時間にわたり約4℃でインキュベートする。好ましくは、十分な時間は約60分である。第1（実験用）反応混合物を第1固相支持体または表面に加え、液相中で十分な時間にわたり約4℃でインキュベートする。同様にして、第2（対照用）反応混合物を第2固相支持体または表面に加え、液相中で十分な時間にわたり約4℃でインキュベートする。好ましくは、十分な時間は約60分である。次に、第1固相支持体または表面を液相から分離して第1固相を得る。同様にして、第2固相支持体または表面を液相から分離して第2固相を得る。ついで第1固相および第2固相中の標識Tsg101の量を測定する。第2固相中の標識Tsg101の量と比較した場合の第1固相中の標識TSG101の量の減少は、HIV-1 Gagp6後期（L）ドメインを含みかつTsg101タンパク質とHIV Gagとの間の相互作用を阻害するペプチドの同定と相関する。HIV-1 GagまたはHIV-1 Gagp6後期（L）ドメインを含む固定化ペプチドに結

30

40

50

合され得る適当な抗体には、抗p6ラットモノクローナル抗体（ABI）および抗Gag CA（NEN-Dupont）が含まれる。

【0044】

本発明はまた、Tsg101が相互作用するウイルスタンパク質のPTAPまたは関連モチーフとTsg101との相互作用をモジュレートまたは阻害する、PTAPモチーフを含むペプチドを同定するための方法を提供する。前記ペプチドは、ウイルス粒子（例えば、HIV-1およびHIV-2、サル免疫不全ウイルス（SIV）を含むレンチウイルスの粒子が挙げられるが、これらに限定されるものではない）の産生を減少させるために使用することができる。前記方法は、TSG101タンパク質と結合するPTAPモチーフを含むペプチドを同定することを含む。好ましい実施形態においては、前記ペプチドは配列番号4の配列を含む。前記方法は、Tsg101が相互作用するウイルスタンパク質のPTAPまたは関連モチーフ（例えば、HIV GagのPTAPモチーフ）とTsg101との相互作用を、Tsg101またはウイルスタンパク質の活性部位への結合によりモジュレートまたは阻害する他の分子の同定にも適用可能である。したがって、本発明のもう1つの態様においては、ウイルスタンパク質のPTAPまたは関連モチーフとTsg101との相互作用をモジュレートまたは阻害する分子を同定するための方法を提供する。ペプチドの結合を同定するための当技術分野で公知の標準的な方法を用いることができる。

10

【0045】

Tsg101は、商業的に入手可能な一般的なシグナル生成系のいずれかを利用する蛍光物質、酵素、化学発光物質、光増感剤、懸濁可能粒子または放射性同位体で標識されていてもよい。あるいは、Tsg101は、抗体、6Hisタグ、GSTタグまたはインフルエンザウイルスエピトープ（HAタグ）のようなタグ（標識）で標識されていてもよい。前記のアッセイで使用するTsg101タンパク質は、マウス、ヒトまたは他の哺乳動物タンパク質由来でありうる。

20

【0046】

好ましくは、前記アッセイにより同定されたペプチドは、Tsg101-HIV Gag相互作用の少なくとも約3倍の減少をもたらす。本発明のペプチドはいずれも、HIV粒子の形成を減少させるための又はTsg101-HIV Gag相互作用を阻害するための治療用組成物として使用することができる。好ましくは、治療用組成物は医薬組成物である。したがって、本発明のペプチドは、好ましくは、治療に有効な量の少なくとも1つの本発明ペプチドと1種以上の製薬上許容される担体または希釈剤とを含有する医薬組成物としてヒト被験者に投与することができる。「治療に有効な量」なる語は、本ペプチドの作用様式に応じて、HIV粒子の形成または他のレトロウイルスの形成を減少させるのに又はTsg101-HIV Gag相互作用を阻害するのに必要な用量を意味する。そのような作用様式は、前記の適当なアッセイにより決定される。

30

【0047】

ペプチド組成物は、静脈内に投与される場合には、担体および/または希釈剤および/または補助剤のような他の成分と組み合わせられる。典型的な担体には、例えば、水緩衝化水溶液、エタノール、ポリオール、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、それらの適当な混合物、界面活性剤または植物油を含む溶媒または分散媒が含まれる。本組成物には、糖または塩化ナトリウムのような等張化剤を含有させることが可能である。血液からのペプチドのクリアランスを最小限に抑えるために、ペプチドをアルブミンのようなタンパク質担体と共有結合させることができる。その他の成分の性質に対する制限はないが、それらは製薬上許容されるものであり、意図されるそれらの投与に有効でなければならず、該組成物の有効成分の活性を低下させないものでなければならぬ。本発明のペプチド組成物を、好ましくは、治療に有効な量の1種以上の本ペプチドが被験者に徐放されるように液体または半液体形態で、経皮パッチ中に含浸させたり、皮下インサート中に含有させることが可能である。

40

【0048】

本発明のペプチドを経口投与する場合には、有効量のペプチドを含有するその医薬組成物はまた、同化可能な食用担体などのような不活性希釈剤を含有したり、硬質または軟質シェルゼラチンカプセル剤であったり、錠剤に圧縮されていたり、あるいはエリキシル剤、

50

懸濁剤、シロップ剤などとするのが可能である。したがって、本ペプチドは、薬学的に有効な量での簡便かつ効果的な投与のために、治療に有効な量の製薬上許容される適当な担体と配合される。

【0049】

HIV感染者の治療方法に使用するペプチドの厳密な治療に有効な量は、対象者の年齢、体重および/または性別、病態の重症度、食事、投与の時間および頻度、薬物の組合せおよび/または反応感受性に基いて、臨床医により決定される。好ましくは、ペプチドは、投与経路に応じて、投与量として約0.1~100,000 μ gの量で、合計用量約1gまで投与すべきであると一般には述べられている。本発明のペプチド組成物は最終的には血流からクリアランスされるため、該組成物の再投与が指示され、そうすることが好ましい。

10

【実施例】

【0050】

6. 実施例

以下の実施例は本発明の例示として示されており、本発明を何ら限定するものではない。

【0051】

6.1. 実施例1

本実施例においては、HIV-1 Pr55^{Gag}を酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいてベイトとして使用し、哺乳動物の腫瘍感受性遺伝子Tsg101の産物であるTsg101 (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, Cell 85, 319-329)を、HIV-1 Gagと相互作用する細胞性タンパク質として同定した。本実施例は、*in vitro*およびトランスフェクト細胞の細胞質の両方において、Tsg101がHIV-1 Gagのp6領域と特異的に相互作用したことを示している。p6中のLドメイン内の高度に保存された2つのPro残基は、Tsg101の結合にきわめて重要であった。さらに、Tsg101中のUEVドメイン内の改変されたUb結合部位、およびTsg101に特有の他の残基は、Gagとの相互作用の決定基であった。これらの結果は、細胞輸送機構の特定の成分がウイルスの出芽および成熟に関与していることを示している。

20

【0052】

ユビキチン化は感染細胞からのウイルス粒子の放出に関与しているようである。遊離ユビキチン(Ub)と、p6 Gagの小断片に共有結合したUbとが、成熟ヒト免疫不全ウイルス粒子において検出される。Pr55^{Gag}構造前駆体ポリタンパク質中のp6領域は、細胞膜結合タンパク質の輸送に関する推定Ub調節因子であるTsg101と結合する。Tsg101は、(i)酵母ツーハイブリッドアッセイ、(ii)精製Pr55^{Gag}とウサギ網状赤血球ライセートにより合成されたTsg101とを使用する*in vitro*共免疫沈降、および(iii) gagでトランスフェクトされたCOS細胞の細胞質で*in vivo*において、Gagと相互作用することが判明した。p6中のPTAPPモチーフ(または後期(L)ドメイン)は、細胞膜からの成熟ウイルスの放出に必要とされ、Pr55^{Gag}への結合の決定因子である。Ub結合(E2)酵素のUbc4クラスに相同である、Tsg101中のN末端領域は、p6との相互作用の決定因子であった。E2酵素中のUbと結合する活性部位Cysの代わりに存在するTsg101中のTyr110の突然変異、およびTsg101に特有の他の残基の突然変異は、p6との相互作用を妨げたが、このことは、活性なE2酵素からTsg101を区別する特徴が該ウイルスタンパク質への結合に重要であったことを示している。これらの結果は、HIVにおけるLドメインの機能を、Ub機構と細胞輸送装置の特定成分とに

30

40

【0053】

材料および方法

プラスミドの構築

酵母内での発現のためのPr55^{Gag} p1-p6およびTsg101 GAL4ハイブリッド、*in vitro*発現のためのヒトTsg101、ならびに哺乳動物細胞内での発現のためのPr55^{Gag} p6を構築するためのPCRおよび突然変異誘発に使用するオリゴヌクレオチドおよび方法を以下に記載し、表1に示す。

【0054】

酵母で発現させるためのPr55^{Gag} およびp1-p6ハイブリッド：

50

酵母発現ベクター-pGBT9またはpMA424およびpGAD424内に連結するためのインサートを合成するための鑄型としてプラスミドgpVIを使用するPCRにより、HIV-1配列を増幅した。pgpV Iは、Pr55^{Gag}、およびpolの一部、およびPol中のPR(D₂₅A)の触媒部位内の不活性化突然変異をコードする。完全長gagのPCR断片を合成するために、5'末端プライマー(表1のオリゴ番号1)および3'末端プライマー(番号2)を使用した。それらのプライマーは、それぞれ、gagのnt 333とPRコード領域の末端とにアニールした。pGBT9およびpGAD424中に連結するために、インサート中のBamHIおよびBglII部位を操作した。MA-CAインサートの場合には、同じ5'末端プライマー(番号1)および3'末端プライマー(番号3)(これは、CAのC末端におけるgag遺伝子中の1421位にアニールする)を使用した。これらのオリゴヌクレオチドは、それぞれ、制限部位BglIIおよびBamHIを含有していた。CA-p2-NCインサートの場合には、CAのN末端におけるgag遺伝子の730位にアニールする5'プライマー(番号4)、およびp1のC末端におけるgag遺伝子の1673位に相補的な3'末端プライマー(番号5)を使用した。PCR産物をBglIIで切断し、該ベクター中のその部位に連結した。p1-p6インサートの場合には、gag遺伝子に1636位においてアニールする5'末端プライマー(番号6)、およびpci遺伝子中の2116位においてアニールする3'末端プライマー(番号7)を使用した。得られたインサートは、gagフレームにおけるGagのp1-p6領域、およびpciフレームの最初の99アミノ酸に及ぶものであった。gagフレームの発現のみが得られるように、それは、ヌクレオチド1636の上流のp1領域中に位置するフレームシフト部位を欠いていた。両方のオリゴヌクレオチドはBglII部位を含有していた。ユニークBglII部位における制限消化により、Pr55^{Gag} p6インサートを作製した。最終的には、BamHIおよびSalI部位を使用してpMA424由来のインサートをpGBT9に導入することにより、gag配列をpGBT9ベクターバックグラウンド中に配置した。Gene Editor(Promega)を使用する突然変異誘発により、pGBT9-p1-p6中の欠失および部位特異的突然変異を作製した。突然変異誘発性オリゴヌクレオチド(番号8~15)を、製造業者のプロトコルに従い使用した。アミノ酸の変化に至る点突然変異または欠失突然変異のために導入されたミスマッチ領域が、それぞれ下線または「/」で示されている。該ベクター中のSnaBI制限部位を除去する第2選択オリゴヌクレオチド(番号13)を使用して、二重突然変異を作製した。SnaBI消化に対する抵抗性により突然変異プラスミドを選択した。鑄型としての突然変異体K_{4,8,7}Rと共に第2選択オリゴヌクレオチドおよびK_{4,8,7,4,9,3}R突然変異誘発性オリゴ(番号11)を使用して、二重突然変異体K_{4,8,7,4,9,3}Rを合成した。鑄型としてのPTAPP₁と共に第2選択オリゴヌクレオチドおよびPTAPP₂突然変異誘発性オリゴ(番号9)を使用して、二重突然変異体PTAPP_{1,2}を合成した。第2選択オリゴならびにオリゴ番号14および15(表1に示されているとおり)を使用して、突然変異体PTAPP₁から、第2PTAPP₁モチーフ中の点突然変異を合成した。

10

20

30

【0055】

酵母内で発現させるためのTsg101ハイブリッド:

pACTベクターとしてB細胞ライブラリーから単離されたTsg101を、酵母ツーハイブリッド系用のインサートのPCRのための鑄型として使用した。該インサートを、pGAD424中に連結するためにEcoRIおよびSalI部位を有するように操作した。野生型tsg101インサートの場合には、フォワード(5'末端)プライマー(番号16)はTsg101のコード領域の開始部位に相補的であった。リバー(3'末端)プライマーは番号17であった。tsg101フォワードプライマー(番号16)およびリバープライマー番号18~20(すべて、該遺伝子の下流末端に導入されたSalI部位および翻訳終結コドン(番号18)を有する)を使用して、3'末端におけるトランケーションを導入した。tsg101リバープライマー(番号17)およびフォワードプライマー番号21~23(それぞれ、該配列の5'末端の前に導入されたEcoRI部位を有する)を使用して、5'末端におけるトランケーションを導入した。Gene Editorおよびオリゴ番号24~28を使用して、tsg101中に部位特異的突然変異を作製した。

40

【0056】

in vitro発現:

T7プロモーターの制御下のpET3aベクター(Novagen)のBamHI部位に、ヒトtsg101をサブクローニングした。5'プライマー番号29(これは、該タンパク質中のアミノ酸10に対応す

50

る位置でアニールする)および3'プライマー番号30(これは、該コード領域のC末端にアニールする)と共に鋳型としてのpACT-tsg101を使用するPCRにより、該インサートを得た。

【0057】

哺乳動物細胞で発現させるためのPr55^{gag} p6:

p6の最初のコドン中に3つの点突然変異をPCRにより合成してそれを終止(オーカー)コドンに変換するための鋳型として、pgp-RRE-rを使用した。5'プライマー(番号31)はBH10 gagのヌクレオチド1637-1687にアニールし、ユニークBgIII部位を含む。3'プライマー(番号32)は、ユニークEcoRV部位の下流のpol遺伝子中のヌクレオチド2655-2682にアニールする。pgp-RRE-rプラスミドおよびPCRから得られた断片をBgIIIおよびEcoRVで切断し、所望の断片を連結した。

10

【0058】

すべての構築物は、ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactionキット(Perkin-Elmer, Foster City, CA)を製造業者の説明に従い使用する配列決定により確認した。

【0059】

例えば、Ehrlich, L. S., Fong, S., Scarlata, S., Zybarth, G. & Carter, C., 1996, Biochemistry 35,3933-3943; Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.-H. & Elledge, S. J., 1993, Genes Dev. 7,555-569; Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, J. Virol. 64, 2743-2750; Ratner, L., Hasteline, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K.ら, 1985, Nature (London) 313,277-284を参照されたい。

20

【表1】

表1 PCRおよび突然変異誘発で使用したオリゴヌクレオチド

インサート	鋳型	#	配列
gag	pgpVI	1	GGCTAGAAGGATCCGGATGGGTGCGAGAGCGTCAG (SEQ ID NO:5)
		2	GAAGATCTATTAGAAGTTTAAAGTGC (SEQ ID NO:6)
MA-CA		1	
		3	GAAGATCTCACTACAAAACCTCTTGCC (SEQ ID NO:7)

30

CA-p2-NC		4	GGAAGATCTCCCCTATAGTGCAGAACATCC (SEQ ID NO:8)	
		5	CGGGATCCTTCCCTGGCCTTCCC (SEQ ID NO:9)	
p1-p6		6	GGGAAGATCTGGCCTTCC (SEQ ID NO:10)	
		7	GAAGATCTATTAGAAGTTTAAAGTGC (SEQ ID NO:11)	
PTAPP ₁	pGBT9-p1p6	8	CAGAGCAGACCAGAG/TTTCTTCAGAGCAGACC (SEQ ID NO:12)	
PTAPP ₂		9	CAGAGCAGACCAGAG/GAAGAGAGCTTCAGG (SEQ ID NO:13)	
K ₄₈₇ R (AAG)		10	CCCCTCAGAGCCAGGAGCC (SEQ ID NO:14)	
K ₄₉₃ R (AAG)		11	GCCGATAGACAGGGAAGTGTATC (SEQ ID NO:15)	
(LXX) ₄		12	CCGATAGACAAGGAA/AACGACCCCTCGTCAC (SEQ ID NO:16)	10
K _{487,493} R	pGBT9-p1p6 _{K487R}	11		
(TAC)		13	CATTCCTATAIGTAGTATATAG (SEQ ID NO:17)	
PTAPP _{1,2}	pGBT9-p1p6	9		
	PTAPP ₁	13		
P _{7A}	pGBT9-p1p6	13		
	PTAPP ₁	14	GACCAGAGGCAACAGCC (SEQ ID NO:18)	
(CCA)		13		
P _{10,11A}		15	CAGAGCCAACAGCCGAGCA TTTCTTCAGAGC (SEQ ID NO:19)	20
(CCA,CCA)		16	GAATTCATGGCGGTGTCCGAGAGC (SEQ ID NO:20)	
tsg101	pACT-tsg101	17	GTCGACTCAGTAGAGGTCACTGAG (SEQ ID NO:21)	
N-155		16		
		18	GTCGACTCATGCCTGGTATGGCGG (SEQ ID NO:22)	
N-215		16		
		19	GTCGACTCAGGGACCAACAGTGGTCAC (SEQ ID NO:23)	
N-311		16		
		20	GTCGACTCAGTTTTCAGACTGATTTTCC (SEQ ID NO:24)	
139-C		17		
		21	GAATCCCTCCAGTCTTCTCTCGTCC (SEQ ID NO:25)	
241-C		17		30
		22	GAATCCGGATGAAGGAGGAAATGGATCG (SEQ ID NO:26)	
311-C		17		
		23	GAATCAATGATATCGATGAAGTTATCATTCCC (SEQ ID NO:27)	
K ₁₀₈ A (AAG)	pGAD-tsg101	24	GTTGATGCAAATGGGGCGATATATCTTCC (SEQ ID NO:28)	
Y ₁₁₀ W (TAT)		25	AATGGGAAGATATGGCTTCTTATCTAC (SEQ ID NO:29)	
Y ₁₁₃ V (TAT)		26	GGAAGATATATCTTCTCTCTACATGAATGG (SEQ ID NO:30)	
W ₁₁₇ A		27	CCTTATCTACATGAAGCGAAACACCCACAG (SEQ ID NO:31)	
(TGG)		28	CTACATGAATGGGCACACCCACAGTCAG (SEQ ID NO:32)	
K ₁₁₈ A (AAA)		29	GGATCCATGGTGTCCAAGTAC (SEQ ID NO:33)	
tsg101	pACT-tsg101	30	GGATCCTCAGTAGAGGTCACTGAG (SEQ ID NO:34)	40
gag p6		31	GGAAGATCTGGCCTTCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATT (SEQ I	
			NO:35)	
		32	CCATGTATTGATAGATAACTATGTCTG (SEQ ID NO:36)	

【 0 0 6 0 】

ツーハイブリッドアッセイ

B細胞ライブラリーを使用する酵母ツーハイブリッドスクリーニング (Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.-H. & Elledge, S. J., 1993, Genes Dev. 7,555-569) により、PR55^{Gag}-Tsg101相互作用を確認した。GAL4活性化および結合ドメイン融合タンパク質としてPR55^{Gag}またはTsg101配列をコードす

るベクター-pGBT9およびpGAD424を、既に記載されている方法 (Bartel, P. L. & Fields, S., 1995, Methods Enzymol. 254, 241-263) によりサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) Y153中に形質転換した。簡潔に説明すると、TrpおよびLeu原栄養性に関する選択ならびにそれに続くLacZ活性化に関する定量的アッセイにより、相互作用を検出した。インサートを保持しないベクターまたは非特異的遺伝子 (ラミン) を保持するベクターと相互作用しないことを示すことにより、真の陽性体を確認した。該DNAを自動配列決定に付し、それをデータベース中のタンパク質配列と一致させた後、タンパク質を同定した。該タンパク質のトランケート型、欠失型または点突然変異型と融合した酵母GAL4転写アクチベータータンパク質のDNA結合または活性化ドメインをコードするベクターを使用して、相互作用ドメインの位置決定を行った。相互作用は両方向で試験した。本明細書には、GAL4 DNA-結合ドメイン-Gagまたは-p1-p6融合タンパク質とGAL4活性化ドメイン-Tsg101融合タンパク質との相互作用が記載されている。SDS-ゲル電気泳動と、GAL4結合ドメイン (Upstate Biochemical) およびGAL4トランス活性化ドメイン (Santa Cruz) に対する抗体でのウェスタンブロット法と、による酵母細胞抽出物の分析により、すべてのGAL4融合体の発現を調べた。

10

20

30

40

50

【0061】

細胞培養、トランスフェクションおよび細胞質抽出物の調製

COS-1細胞を、ウシ胎児血清を補充したDMEM中、60%コンフルエントになるまで37 で培養した。FuGene 6試薬 (Roche) を製造業者の説明に従い使用して、該細胞を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、該細胞を培地中に回収し、遠心分離により集めた。ペレット化細胞を冷PBSで洗浄し、プロテアーゼ阻害剤を含有する低張性バッファー (10mM Tris, pH 7.4, 1mM MgCl₂; 4) で膨潤させ、Dounceホモジナイザー (B型乳棒) で破壊した。全ライセートを10,000 × g、4 で10分間遠心して、未破壊細胞、核およびミトコンドリアを除去した。

【0062】

免疫捕捉アッセイ

Tsg101-Gag相互作用の *in vitro* アッセイのために、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) を使用して、[³⁵S]-Met (DuPont NEN) 存在下、pET3a-tsg101構築物からウサギ網状赤血球ライセート (RRL) 中でTsg101を発現させた。T7 RNAポリメラーゼプロモーターを使用して産生された、T7遺伝子10のアミノ酸1-10をN末端に含有する組換えPr55^{Gag}を、既に記載されているとおりに (Ehrlich, L. S., Fong, S., Scarlata, S., Zybarth, G. & Carter, C., 1996, Biochemistry 35, 3933-3943)、大腸菌 (*E. coli*) (BL21-DE3) 発現株から精製した。プロテアーゼ阻害剤 (Roche) を含有する非変性バッファー (25mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 1% IGEPAL (Sigma)) で予め洗浄したプロテインAアガロースビーズ (Pierce) を適当な抗体と共にインキュベートし、再び洗浄し、ついでGagと共にプレインキュベートした。ついで放射能標識Tsg101を加え、さらに該混合物を回転装置中で4 で60分間インキュベートした。ビーズを洗浄し、SDS-PAGEローディングバッファーに懸濁させ、95 で5分間加熱した。また、前記のとおり調製した細胞質抽出物をTsg101-Gag相互作用に関して調べた。これは、該抽出物および該抗体コーティングプロテインAビーズを10mM Tris, pH 7.4, 1mM MgCl₂中に維持した以外は同じ方法を用いて行った。

【0063】

タンパク質の検出

12.5% SDSポリアクリルアミドゲルでの電気泳動によりタンパク質を分離した。電気泳動後の放射能標識Tsg101の検出のために、ゲルを固定し、ゲルフルオログラフィーのためにEN³HANCE (DuPont NEN) オートラジオグラフィーエンハンサー中で30分間インキュベートし、乾燥させた。イメージングフィルム (BioMax, Kodak) を使用して、放射性バンドを可視化した。非放射性サンプルを含有するゲルをニトロセルロースに転写し、ウェスタンブロット法により分析した。本明細書中に特定されている以下の抗体を使用した：抗キャプシド (CA)₁ およびCA₂ 抗体 (CAタンパク質のそれぞれ天然および変性形態に対して産生さ

せたウサギポリクローナル抗体 ; Ebbets-Reed, D., 1996, Molecular Microbiology, State University of New York (Stony Brook, Stony Brook, NY), pp.209; Ehrlich, L. S., Agresta, B. E. & Carter, C. A., 1992, J Virol. 66, 4874-4883)、抗CA3抗体(マウスモノクローナル抗体, NEN-Dupont)、抗p6抗体(C末端の16アミノ酸に対するウサギポリクローナル抗体, S. Campbell, NCI-FCRDC)、抗ヌクレオキャプシド抗体(NC、ヤギポリクローナル抗体, A. Rein, NCI-FCRDC)、抗T7抗体(Novagen)、抗Tsg101₁抗体(モノクローナル抗体, Santa Cruz)、抗Tsg101₂抗体(S. Cohen (Stanford U.)から得たウサギポリクローナル抗体)。Lumi-Light (Roche)を使用する化学発光により、タンパク質を可視化した。

【0064】

結果

Pr55^{Gag}はツーハイブリッドアッセイにおいてTsg101と相互作用する

ヒトB細胞由来のcDNAライブラリー(Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.-H. & Elledge, S. J., 1993, Genes Dev. 7, 555-569)においてコードされている相互作用性タンパク質を同定するために、酵母ツーハイブリッドスクリーニング(Bartel, P. L. & Fields, S., 1995, Methods Enzymol. 254, 241-263)におけるベイトとしてHIV-1 Pr55^{Gag}を使用した。約2百万個の形質転換体をスクリーニングし、2個の陽性体を単離した。配列決定およびGenBankデータベース中の登録配列との一致により、一方の相互作用相手はシクロフィリンBであることが確認された。これはPr55^{Gag}と相互作用することが既に判明している(Luban, B., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. & Goff, S. P., 1993, Cell 73, 1067-1078)。もう一方の相互作用タンパク質はヒト腫瘍感受性遺伝子Tsg101(Li, L. & Cohen, S. N., 1996, Cell 85, 319-329; Li, L., Li, X., Francke, U. & Cohen, S. N., 1997, Cell 88, 143-154)の産物であることが確認された。

【0065】

Tsg101と相互作用するPr55^{Gag}中の領域の同定

Tsg101との相互作用に必要とされるPr55^{Gag}の領域を位置決定するために、酵母GAL4タンパク質のDNA結合ドメインに融合したNまたはC末端欠失Pr55^{Gag}をコードするプラスミドを、ツーハイブリッドアッセイを用いてLacZレポーター遺伝子の活性化に関して試験した。該融合タンパク質中のGAL4 DNA結合ドメインに対する抗体を使用するウェスタン分析は、突然変異型および野生型タンパク質がすべて、比較しうるレベルで発現されることを示した。図1Aに示すとおり、シグナルは、Pr55^{Gag}のp1-p6領域が欠失すると失われたが、p1-p6をコードするプラスミドにおいては保持された。このように、Tsg101との相互作用はPr55^{Gag}のp1-p6内の要素による影響を受けた。

【0066】

p6領域は、保存モチーフP₇T/SAP₁₀P₁₁(p6ドメイン内の番号づけ)および反復Leu配列(LXX)₄を含有する。(LXX)₄モチーフは、直接的には相互作用しないかもしれないが、Vpr結合のための非常に重要な決定因子である(例えば、Frankel, A. D. & Young, J. A., 1998, Annu. Rev. Biochem. 67, 1-25を参照されたい)。PTAPPモチーフまたは後期(L)ドメイン、および特にPro_{10,11}は、集合の最終段階における成熟ウイルスの放出の決定因子である(Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, J. Virol. 69, 6810-6818)。PTAPPモチーフは、集合したウイルス粒子内へのpol遺伝子産物の効率的なパッケージングにきわめて重要である領域(P₅XP₇)と重複している(Dettenhofer, M. & Yu, X. F., 1999, J. Virol. 73, 4696-4704)。p6領域はまた、ユビキチン化のための基質であるLys残基を含有する(Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1998, J. Virol. 72, 2962-2968)。前記の保存モチーフのいずれかがTsg101結合に重要であるかどうかを判定するために、Pr55^{Gag}のp1-p6領域をコードするプラスミド中に欠失および点突然変異を導入し、

10

20

30

40

50

ツ-ハイブリッドアッセイによりタンパク質-タンパク質相互作用を測定した。これらの研究に使用したpBH10クローン由来のp6領域は2コピーのPTAPPモチーフを含有し (Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. 3., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K.ら, 1985, Nature 313, 277-284)、これらのそれぞれを、独立して欠失させた。第1 PTAPPモチーフ (Gag中での番号づけでaa 455-459) の欠失は、野生型タンパク質結合の約50%のレベルにまでガラクトシダーゼ活性を減少させた (図1B)。すべてのHIV株およびほとんどのレンチウイルス間で保存されている第2 PTAPPモチーフ (aa 467-471) (Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S., Smith, R. F. & Pavlakis, G. N., 1995, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM) の欠失は、野生型タンパク質結合の約25%にまでガラクトシダーゼ活性を減少させた。両方のモチーフ (aa 455-459および467-471) の欠失は、該ベクターがインサートを欠く場合に得られたレベル (<0.3%) にまでガラクトシダーゼ活性を減少させた。第2モチーフ中のPro₇からAlaへの置換と組み合わせた第1 PTAPPモチーフの欠失は、野生型の25%まで酵素活性を減少させた。同じ状況で、Pro_{10,11}からAlaへの置換は該相互作用を完全に遮断した。Ub修飾のための基質として働くLys残基 (Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1998, J. Virol. 72, 2962-2968) の一方または両方からArgへの置換は野生型ガラクトシダーゼ活性を与えたが、このことは、p6中のUb基質がTsg101認識に必要とされないことを示している。(LXX)₄反復モチーフの欠失は、野生型レベルの約55%にまでガラクトシダーゼ活性を減少させた。第1 PTAPPモチーフの全体を除去した場合に、同じ減少が得られた。第2の高保存PTAPPモチーフ全体の欠失により又はこのモチーフ中のPro_{10,11}の突然変異により引き起こされる、より有害な影響は、それがTsg101結合の主要な決定因子であることを示唆している。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

Tsg101はin vitroでPr55^{Gag}に結合する

ツ-ハイブリッドアッセイによる本発明者らの観察を証明し進展させるために、細菌中で発現された未標識のバクテリオファージT7タンパク質タグ付けした組換えPr55^{Gag} (Ehrlich, L. S., Fong, S., Scarlata, S., Zybarth, G. & Carter, C., 1996, Biochemistry 35, 3933-3943) およびRRLにおいて発現された [³⁵S]-Met標識マウスまたはヒトTsg101を使用して、in vitro共免疫沈降実験を行った。マウス (Stanford U.のS. Cohenから入手) およびヒトTsg101 (B細胞ライブラリー由来) は94%同一であり、これらのアッセイにおいて互換的に使用した。図2A (レーン1) に示す放射能標識タンパク質は、Tsg101の予想分子量 (391アミノ酸、約43kDa) で移動した。該タンパク質は、一貫して二重線として検出されたが、これはおそらく、Met₁₀における内部開始によるものである。細胞質抽出物においても、該タンパク質は時々、二重線として検出された。Tsg101は、T7タグ、CAまたはp6ドメインに対する抗体が固定化されており、かつPr55^{Gag}と共にプレインキュベートされたプロテインAコーティングビーズにより捕捉された (レーン3、7、8および9)。Gagと共にプレインキュベートされなかった (レーン2、4、5、6) または抗体の非存在下でGagと共にプレインキュベートされたビーズは、Tsg101を捕捉しなかった。抗p6抗体は、該タンパク質のC末端の16残基 ((Leu-X-X)₄反復を含む) 中の抗原部位を認識する。この抗p6抗体に結合したPr55^{Gag}が尚もTsg101を捕捉し得たという事実は、p6中のTsg101結合領域が露出していたことを示している。これは、p6領域のC末端半分がTsg101の結合部位ではないこと示したツ-ハイブリッドアッセイの結果と合致している。競合アッセイにおいては、PTAPPモチーフを含有する、5倍モル過剰のペプチド (ALQSRPEPTAPPEES) の添加は、Pr55^{Gag}によるTsg101捕捉の2.2倍の減少を引き起こした。該ペプチドの溶解度が限られたものであったため、より高濃度での試験を行うことはできなかった。これとは対照的に、突然変異LIAPP配列を含有する、5倍モル過剰のペプチドでは、何の変化も検出されなかったが、このことは、PTAPPモチーフの作用が特異的であったことを示している。抗CAモノクローナル抗体でのウェスタン分析は、Tsg101を捕捉する、抗T7、CAおよびp6抗体で

コーティングされたビーズ上の完全長Pr55^{Gag}の存在を証明した(図2B、レーン1~4)。免疫捕捉アッセイの結果は、Tsg101が、LDメインとの相互作用を介して、Pr55^{Gag}と特異的かつ安定にin vitroで相互作用することを示している。

【0068】

Tsg101はin vivoでPr55^{Gag}と結合する

ウイルス集合中にTsg101とGagとが結合するかどうかを確認するために、Gagを発現するCOS細胞を共免疫沈降アッセイによりTsg101-Gag複合体に関して調べた。プラスミドpgp-RRE-rは、HIV-1 GagおよびGag-Polポリタンパク質ならびにVifをSV40後期プロモーターの制御下で発現する(Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, J. Virol. 64,2743-2750)。発現には、pCMV-revの発現によりトランスで付与されるRevタンパク質が必要である(Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, J. Virol. 64,2743-2750)。細胞質内のTsg101-Gag相互作用の特異性が保証されるよう、p6ドメインを欠くGag突然変異体を加えた。revのみ、rev、gagおよびpol、またはrev、gag p6およびpolでトランスフェクトされた細胞から調製した細胞質抽出物を抗Tsg101マウスモノクローナル抗体と共にインキュベートし、NCドメインに対するヤギポリクローナル抗体を使用するウェスタンブロット法により免疫沈降体をGag関連タンパク質に関して調べた。まず、全細胞質抽出物を調べた(図3A)。抗NC抗体は、野生型Gagタンパク質を発現する細胞から調製した抽出物において、Pr55^{Gag}、18kDaのNC関連タンパク質、およびNCp7を認識した(レーン7)。18kDaのバンドは、抗NC抗体および抗p6抗体の両方に対するその反応性に基づき、NC-p6であると確認された。抗NC抗体はまた、突然変異体を発現する細胞から調製した抽出物において、NCp7、および約49kDaで移動するタンパク質を認識した(レーン3)。後者は、Pr55^{Gag} p6前駆体タンパク質の予想分子量である。この結論と一致して、Revのみ(レーン1)または野生型Gagタンパク質(レーン2)を発現する細胞から調製した抽出物においては、その49kDaのタンパク質は検出されなかった。Tsg101に対するモノクローナル抗体を使用する免疫沈降は、野生型Gag前駆体およびNC-p6タンパク質を沈降させたが、NCp7(図3B、レーン2)や、p6ドメインを欠くGag(レーン3)は沈降させなかった。別の抗Tsg101抗体で同じブロットを再プローブすることにより、全3個の抽出物の免疫沈降体中の細胞タンパク質の存在が証明された(レーン4~6)。反復実験において、抗CA抗体は、Gagを発現する細胞の抽出物からはTsg101を共免疫沈降させたが(図3C、レーン2)、Revのみを発現する抽出物からはTsg101を共免疫沈降させなかった(レーン1)。別の抗CA抗体で同じブロットを再プローブすることにより、Tsg101を捕捉するビーズ上のGagの存在が証明された(レーン4)。無関係な抗体(ウサギ抗マウスIgG)での免疫沈降はGagもTsg101も沈降させなかった。その結果は、Tsg101とGagとの相互作用が、ウイルスタンパク質を含有する細胞の細胞質において生じることを示しており、Gagタンパク質のp6領域が該相互作用を特異的に導くことを示している。

【0069】

Pr55^{Gag}と相互作用するTsg101中の領域の同定

Tsg101タンパク質は、E2酵素のUb結合(Ubc)4サブグループに対する相同性を有するN末端E2様(UEV)ドメインを含有する(Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, Nat. Genet. 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, J. Mol. Med. 75,467-469)。それはまた、中央のProリッチ領域およびコイルドコイル領域、ならびにその定常状態レベルを制御するC末端ステディネス(steadiness)ボックス(SB)を含有する(図4; Feng, G. H., Lih, C. J. & Cohen, S. N., 2000, Cancer Res. 60, 1736-1741)。Gagの集合にUbを関連づける最近の知見(Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1998, J. Virol. 72,2962-2968; Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,13057-13062; Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,13063-13068; Vogt, V. M., 2000, Proc. Natl. Ac

ad Sci. USA 97,12945-12947; Ott, D. E., Coren, L. V., Chertova, E. N., Gagliardi, T. D. & Schubert, U., 2000, Virology 278,111-121; Patnaik, A., Chau, V. & Willis, J. W., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 13069-13074) に基づき、Tsg101のどの領域がウイルスタンパク質により認識されるのかを決定することに関心が持たれた。これを調べるために、酵母ツーハイブリッド系を用いて、Pr55^{Gag}との相互作用に必要とされるTsg101中の領域を位置決定した。GAL4タンパク質の活性化ドメインに融合したNまたはC末端トランケート型Tsg101をコードするプラスミドを、GAL4 DNA結合性ドメインに融合したp1-p6と結合する能力に関してアッセイした。図4Aに示すとおり、レポーター遺伝子の活性化の評価は、p6-Tsg101相互作用が、N末端の155アミノ酸を保有する断片においては維持されるが、この領域を欠く突然変異体においては失われることを示した。このことは、N末端領域が結合の最小決定因子であることを示唆している。ウェスタン分析は、相互作用性および非相互作用性断片の比較可能な発現を示し、したがってこの結論を支持している。興味深いことに、定性的アッセイにおいては、N末端の155、215および311残基断片が、比較できるほどにp6と結合したが、定量的アッセイにおいては、311残基断片が著しく大きな程度に相互作用した(図4A)。この相違は、aa155の下流の結合部位を反映するものではなかった。なぜなら、Tsg101のaa139からC末端に及ぶ断片は相互作用しなかったからである。さらに、Tsg101の残基167-374に融合したGSTから構成されるハイブリッドタンパク質を使用するin vitro捕捉アッセイにおいては、結合は検出されなかった。N末端の155残基断片中のp6結合領域の最適な提示には下流配列が必要かもしれない。これに関して、Tsg101は、約150残基の保存された触媒コアドメインと、基質認識において何らかの役割を果たすと推測されているこのコアドメインに結合した追加的なC末端延長部とを有するクラスII E2酵素に類似している(Jentsch, S., Seufert, W., Sommer, T. & Reins, H. A., 1990, Trends Biochem. Sc. 15,195-198; Li, L. Liao, J., Ruland, J., Mak, T. W. & Cohen, S. N., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98,1619-1624)。

10

20

【0070】

Ubc4を含めたE2酵素においては、Ubは活性部位Cysに結合する。Tsg101では、このCys残基がTyrにより置換されている。しかし、このTyrに隣接する14個中8個の残基はTsg101およびUbc4の両方において保存されている(Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, Nat. Genet. 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, J. Mol. Med. 75,467-469; 図4B)。p6ドメインによる認識が、Tsg101に特有のアミノ酸残基によるものであったのかどうかを確認するために、完全長タンパク質中の活性部位相同体に点突然変異を導入し、ツーハイブリッドアッセイでp6との相互作用を試験した。融合タンパク質中のGAD部分に対する抗体を使用するウェスタン分析は、突然変異タンパク質および野生型タンパク質がすべて、比較しうるレベルで発現されることを示した。E2およびUEVタンパク質のすべてのクラスにおいて保存されており、活性部位領域のC末端の境界を定めると考えられているTrp₁₁₇(Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, Nat. Genet. 16,330-331; Hershko, A. & Ciechanover, A., 1998, Annu. Rev. Biochem. 67,425-479)の突然変異は結合を完全に妨げたが、このことは、この残基がTsg101およびUbc4の両方において重要であることを示している。Tsg101に特有の残基がLドメインとの相互作用を決定づけるといふ仮説と一致して、試験した4個中3個の非保存残基の置換がp6結合を妨げた(図4B)。Tyr₁₁₀からTrpへの保存的置換は、p6相互作用を野生型の31%にまで減少させた。Tyr₁₁₃から疎水性アミノ酸Valへの置換は、結合を野生型の33%にまで減少させた。Lys₁₁₈からAlaへの置換は、より低い程度に結合を減少させた。

30

40

【0071】

上記仮説を更に検証するために、本発明者らは、E2酵素において保存されていないTsg101中の残基のうち、Ubc4サブグループにおける基質認識を決定づけることが既に示されている領域(Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, Nat. Genet. 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, J. Mol. Med. 75,467-469; Oughtred, R., Bedard, N, Vrieland, A. & Wing, S. S., 1998, J. Biol. Chem. 273, 18435-18442)と整列する残基を調べた。Ubc4中の残基49および125は、構造的には相同であるが機能的には異な

50

るUbc4アイソフォームの基質特異性を決定することが判明した (Oughtred, R., Bedard, N, Vrieling, A. & Wing, S. S., 1998, J. Biol. Chem. 273,18435-18442)。残基49はTsg101のThr₆₇ (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, Nat. Genet. 16,330-331; Sancho, E. Vila, M. R., Sanchez-Pulido, L., Lozano, 3.3., Paciucci, R., Nadal, M., Fox, M., Harvey, C. Bercovich, B., Loukili, N., Ciechanover, A., Lin, S. L., Sanz, F. Estivill, X., Valencia, A. & Thomson, T. M., 1998, Mol. Cell Biol. 18,576-589) またはAsn₆₉ (Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, J. Mol. Med. 75,467-469) と整列する。残基125はSer₁₄₉ (24) またはTyr₁₅₀ と整列する (Sancho, E. Vila, M. R., Sanchez-Pulido, L., Lozano, 3.3., Paciucci, R., Nadal, M., Fox, M., Harvey, C. Bercovich, B., Loukili, N., Ciechanover, A., Lin, S. L., Sanz, F. Estivill, X., Valencia, A. & Thomson, T. M., 1998, Mol. Cell Biol. 18, 576-589)。したがって、本発明者らは、₆₇Thr-Tyr-Asn₆₉ および ₁₄₉Ser-Tyr₁₅₀ をAlaにより置換し、結合に及ぼす影響を調べた。図4Cに示すとおり、₆₇Thr-Tyr-Asn₆₉ の突然変異は野生型レベルの5%にまで結合を減少させた。₁₄₉Ser-Tyr₁₅₀ の突然変異は何ら影響を及ぼさなかった。ウェスタンブロット法は、該突然変異体が野生型レベルで発現されることを証明した。その結果は、GagとTsg101との相互作用が特定の認識に基づくという結論と一致しており、Tsg101のN末端E2様ドメインがp6結合の最小決定因子であるという示唆を裏付けている。

10

【0072】

考察

本実施例には、*in vitro* および *in vivo* でのTsg101とHIV-1Pr55^{Gag}との相互作用が記載されている。Tsg101のN末端半分は、Gag結合の決定因子を含有し、Ub結合E2酵素に相同である (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, Nat. Genet. 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, J. Mol. Med. 75,467-469; Jentsch, S., Seufert, W., Sommer, T. & Reins, H. A., 1990, Trends Biochem. Sc. 15, 195-198)。Tsg101のC末端半分は、微小管ダイナミクス (動力学) に関する細胞質リントタンパク質のスタシミン (stathmin) と相互作用しうるコイルドコイル・ドメインを有し (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, Cell 85, 319-329)、かつ該タンパク質の定常状態レベルを調節する高度に保存された配列を含有する (Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Reko sh, D., 1990, J Virol. 64,2743-2750)。Tsg101は、その構造的特徴に基づき、(i) ドミナントネガティブUb調節因子 (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, Nat. Genet. 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, J. Mol. Med. 75,467-469)、(ii) 転写調節因子 (Sun, Z., Pan, 3., Hope, W. X., Cohen, S. N. & Balk, S. P., 1999, Cancer 86,689-96)、(iii) 細胞周期の調節因子 (Xie, W., Li, L. & Cohen, S. N., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95,1595-1600; Zhong, Q., Chen, Y., Jones, D. & Lee, W. H., 1998, Cancer Res. 58,2699-2702)、および (iv) 膜タンパク質輸送の調節因子 (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, Traffic 1,242-258; Lemmon, S. K. & Traub, L. M., 2000, Curr. Opin Cell Biol. 12,457-466) であると推測されている。多岐にわたるようにみえるこれらの役割が、該タンパク質の独立したまたは関連した機能を反映するものであるかどうかは明らかでない。さらに、これらの機能の関与がユビキチン化過程におけるTsg101の役割とどのように関連しうのかも不明である。

20

30

40

【0073】

哺乳動物細胞内でTsg101がHIV-1 Gagと相互作用するという観察は、該相互作用がウイルスの生活環に関連していることを示唆している。かかる相互作用は、細胞質抽出物においては、*in vitro* の場合より遥かに効率的であることが認められるが、これは恐らく、安定化細胞因子または特定のGag集合状態が必要とされることを示唆するものである。該タンパク質のLドメイン含有p6領域が結合に必要とされることから、該相互作用は後期出芽機能に関連づけられる。本実施例に記載されている結果は、LドメインPTAPPモチーフの欠失がGagとTsg101との相互作用を妨げることを示している。このProリッチ配列は、ウマ伝染性貧血ウイルス以外のすべてのレンチウイルスにおいて高度に保存されている (Myers,

50

G., Korber, B., Wain-Hobson, S., Smith, R. F. & Pavlakis, G. N., 1995, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM)。HIV-1、HIV-2およびサル免疫不全ウイルス(SIV)のいくつかの分離株においては、それは重複している。ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)およびメソンファイザーサルウイルス(MPMV) Gagタンパク質は、レンチウイルスモチーフ(PT(S)AP)および(P)PPPYモチーフ(機能的に互換性のあるトリレトロウイルス対応物)の両方を含有する(Wills, J. W., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, *J. Virol.* 68,6605-6618; Parent, L. J., Bennett, R. P., Craven, R. C., Nelle, T. D., Krishna, N. K., Bowzard, J. B., Wilson, C. B., Puffer, B. A., Montelaro, R. C. & Wills, J. W., 1995, *J. Virol.* 69, 5455-5460)。PYおよびPTAPモチーフがUb装置を動員すること、ならびに或るプロテアソームインヒビターが、PTAPPおよびPYの突然変異から生じた欠陥に類似したウイルス粒子出芽における改変を引き起こすこと示す研究は、該細胞のユビキチン化装置がウイルス集合に関連している可能性を支持している(Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13057-13062; Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13063-13068; Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13069-13074)。しかし、この関連性がUbの直接的または間接的な関与を反映するものであるかどうかは、現時点では明らかではない。一方で、Ub修飾のための基質であるp6ドメイン中のLys残基の突然変異は、ウイルス集合または放出に見かけ上の影響を及ぼさない(Ott, D. E., Coren, L. V., Chertova, E. N., Gagliardi, T. D. & Schubert, U., 2000, *Virology* 278,111-121)。他方で、GagへのUbの共有結合は、プロテアソームインヒビターにより生じた放出における欠陥をレスキューすることが示された(Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13069-13074)。p6中の好ましい部位が利用可能でない場合には、おそらく、他のLys残基がUb基質として働くのであろう。

10

20

30

40

50

【0074】

Tsg101がドミナントネガティブUb調節因子として機能するという見解は、活性なE2酵素中のUbに結合する活性部位Cys残基をTsg101が欠くということに基づいている(Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* 75,467-469)。ユビキチン化過程は2または3種の酵素の連続的作用を必要とする(例えば、Hershko, A. & Ciechanover, A., 1998, *Annu. Rev. Biochem.* 67,425-479を参照されたい)。Ub活性化酵素であるE1は、チオエステル結合を介してUbに結合し、ついでそれをE2に伝達する。E2酵素は、単独で又はE3 Ub-タンパク質リガーゼと共に機能して、Ubを基質タンパク質中のリシン残基に結合させうる。ポリユビキチン化により修飾された基質はプロテアソームにより分解される。モノユビキチン化は、エンドサイトーシスのためのシグナルとして働く(Shili, S. C., Sloper-Mould, K. E. & Hicke, L., 2000, *Embo. J.* 19,187-198)。活性部位CysはTsg101において保存されていないが、本発明者らの結果は、この領域がHIV-1 Lドメインの結合において直接的または間接的に機能することを示唆している。LドメインPTAPPの結合に寄与するTsg101中の改変されたUb結合部位中の残基は、正に荷電したLys残基に隣接するTyrおよびTrp残基であることに注目すべきである(図4B)。荷電残基に隣接した芳香族アミノ酸は、SH3およびWWドメインのようなタンパク質結合モチーフのための非常に重要な結合決定因子である。SH3ドメインは、PTAPPのようなコンセンサスPXXPを有するProリッチ配列と結合する。WWドメインはPPXYモチーフと相互作用する(Kay, B. K., Williamson, M. P. & Sudol, M., 2000, *Fasebj.* 14,231-241; Gamier, L., Wills, J. W., Verderame, M. F. & Sudol, M., 1996, *Nature* 381,744-745)。さらに、Tsg101中のこれらの芳香族残基を取り囲むアミノ酸は、活性なE2酵素において保存されているため、E2-Ub-E3相互作用性複合体に関して示唆されているとおり(Laney, J. D. & Hochstrasser, M., 1999, *Cell* 97, 427-430; Nuber, U. & Scheffli, M., 1999, *J. Biol. Chem.* 274,7576-7582)、Tsg101は、Gag

p6を相互作用性E3酵素に提供するE2様能力を維持しているかもしれない。そうであれば、Tsg101-Gag複合体が活性なE3酵素と結合して、LDメインの機能に関連した事象を促進するかもしれない。さらに、Tsg101は膜タンパク質輸送において機能することが示されている (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1,242-258; Lemmon, S. K. & Traub, L. M., 2000, *Curr. Opin Cell Biol.* 12,457-466)。膜結合タンパク質の再循環に必要とされる小胞を調節する際のその関与 (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1,242-258; Bishop N And Woodman P., 2001, *J Biol Chem.* 276: 11735-42) が、粒子の成熟および放出の部位へのGagの輸送において何らかの役割を果たすことを可能にしているのかもしれない。

【 0 0 7 5 】

HIV-1 GagがTsg101中のE2様ドメインを介して結合するという知見は幾つかの仮説を示唆している。活性なE2酵素に対するTsg101の類似性に基けば、GagとTsg101との相互作用は偶発的なものであるかもしれない。あるいは、示唆されているように (Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13057-13062; Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13063-13068; Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13069-13074)、Ubが集合に必要とされるのであれば、Tsg101は、活性なE2酵素とGagとの相互作用を妨げる細胞防御機構として機能するのかもしれない。また、Tsg101がシャペロンとしてウイルスにより動員されて、Gagのポリユビキチン化と、それに続くプロテアソームによる分解を阻止する可能性がある。この見解は、活性Cysの代わりにSerを含有するサイクリン特異的E2酵素が実際にサイクリン破壊のドミナントネガティブインヒビターであるということにより裏付けられている (Townsend, F. M., Aristarkhov, A., Beck, S., Hershko, A. & Ruderman, J. V., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94,2362-2367)。最後に、Tsg101は、相互作用性E3タンパク質の機能を改変する酵母UEV Mms2タンパク質のように機能するのかもしれない (Hofmann, R. M. & Pickart, C. M., 1999, *Cell* 96, 645-653)。興味深いことに、エボラウイルス基質タンパク質のLDメインは、E3 Ubタンパク質リガーゼであるNedd4と相互作用する (Harty, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huibregtse, J. & Hayes, F. P., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,13871-13876)。Ubの修飾に影響を及ぼす細胞性タンパク質とLDメインとの相互作用の明らかな保存は、Ub機構の関与が、レトロウイルスファミリー内およびレトロウイルスファミリー外の両方のウイルスの集合および粒子放出における高度に保存された事象であることを示唆している。

【 0 0 7 6 】

6.2. 実施例2

実施例1は、Gag前駆体ポリタンパク質のC末端のp6領域に位置するヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) のPTAPPモチーフまたはLDメインがtsg101遺伝子のタンパク質産物に結合することが判明したことを示している。Tsg101は転写のモジュレーションとユビキチン化およびタンパク質分解の抑制との両方において機能しうることを、配列分析が示唆しており、また、実験的証拠も示している。後者の効果は、ユビキチン (Ub) コンジュガーゼ (E2) 様ドメインを含有するがUb結合にきわめて重要な活性部位Cys残基を欠くN末端領域により媒介される。Tsg101のこのドメインは、HIV-1 Gagとのその相互作用に必要な最小結合領域である。エンドソーム輸送におけるTsg101の関与、ならびにそれが*in vitro*および哺乳動物細胞においてHIV-1 Gagと相互作用する能力 (実施例1に示したとおり)、およびGagのp6領域内のLDメインが、結合に特に必要とされるという知見は、細胞表面からの成熟ウイルスの放出をもたらす後期出芽機能に及ぼすTsg101の効果を検討するための本実施例での研究につながった。

【 0 0 7 7 】

本実施例では、成熟HIV-1粒子の放出が、Tsg101を欠損しているマウスSL6細胞 (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* 85, 319-329)、および野生型Tsg101タンパク質を過剰産生

10

20

30

40

50

する霊長類COS-1細胞においては減少することが示されている。また、SL6細胞は複数の表面結合タンパク質のソーティング（選別）に欠陥があることが示されている（Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1,242-258）。Tsg101タンパク質の分解の調節には必要であるがGagの結合には必要でない領域内のTsg101の突然変異（実施例1を参照）は、ウイルスの放出に対するTsg101の過剰発現の抑制効果を部分的に逆転させた。Tsg101の過剰産生の効果は、Tsg101と相互作用する配列がGag中に存在することを必要とした。本実施例における結果は、Tsg101タンパク質が、GagのLDメインとの相互作用を介して、HIV-1粒子の輸送および成熟を特異的に調節しているという証拠を提供するものであり、増殖性ウイルス集合におけるTsg101の機能を示唆している。

【0078】

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）にコードされる構造前駆体ポリタンパク質であるPr55^{Gag}中のp6領域は、gagトランスフェクト細胞の細胞膜からの成熟ウイルス様粒子の放出を導く。実施例1は、Gag^{p6}が、膜結合タンパク質の輸送に影響を及ぼすタンパク質であるTsg101と結合することを示している。本実施例では、アンチセンス転写産物によるTsg101 mRNAの機能的不活性化により誘導されるTsg101の欠損は、細胞膜に富む細胞画分におけるGagタンパク質の成熟を妨げ、ウイルス粒子の放出を減少させることが示されており、このことは、正常なGagの輸送およびプロセッシングにはTsg101が必要であることを示唆している。逆説的であるが、Tsg101の過剰発現もウイルス粒子の放出を阻害したが、Tsg101と結合しないGag p6の排出には影響を及ぼさなかった。阻害は、Tsg101分解の適当な自己調節に必要とされる、Tsg101のC末端ステディネス（steadiness）ボックス（SB）ドメインの突然変異により減少した。しかし、SBの突然変異は、過剰発現されたTsg101がウイルス粒子の放出を妨げる能力を低下させたが、粒子に結合したGag前駆体タンパク質の成熟は不完全であった。本実施例の結果は、Tsg101がHIV粒子の成熟および放出の両方において何らかの役割を果たしており、HIV-1の産生を妨げる新規標的となる可能性があることを示唆している。

【0079】

材料および方法

プラスミド

野生型gag、polおよびvifをコードするpgp-RRE-r（Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjöld, M. L. & Rekosh, D., 1990, *J. Virol.* 64,2743-2750）を、PCRによりp6の最初の3つの点突然変異を導入して、それを終止（オーカー）コドンに変換することによりPr55 Gag p6を合成するための鋳型として使用した。5'プライマー（GGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATT、配列番号37）はBH10 gagのnt 1637-1687にアニールし（Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K.ら, 1985, *Nature* 313,277-284）、ユニークBgIII部位を含む。3'プライマー（CCATGTATTGATAGATAACTATGTCTG、配列番号38）は、ユニークEcoRV部位の下流のpol遺伝子中のnt 2655-2682にアニールする。pgp-RRE-rプラスミドおよびPCRから得られた断片をBgIIIおよびEcoRVで切断し、所望の断片を連結した。突然変異を、ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactionキット（Perkin-Elmer, Foster City, CA）を使用する配列決定により確認した。pIND-hTsg101-FLAG（野生型ヒトTsg101）およびpIND-SD5-59-FLAG（アミノ酸348-351がGlyにより置換されている）は記載されている（Feng, G. H., Lih, C.-J., & Cohen, S. N., 2000, *Cancer Research* 60,1736-1741）。

【0080】

細胞培養、トランスフェクションおよび細胞質抽出物の調製

COS-1細胞を、ウシ胎児血清および抗生物質を補充したDMEM中、60%コンフルエントになるまで37℃で培養した。FuGene 6試薬（Roche）を使用して、野生型または突然変異pIND-hTsg101-FLAG、pVgRXR、pCMV-rev、および野生型または突然変異pgp-RRE-rを種々の組合せで該細胞にトランスフェクトした。Revは、gagおよびpolの発現に必要なHIV-1コード化タンパク質である（Frankel, A. D. & Young, J. A., 1998, *Annu. Rev. Biochem.* 67,1-

10

20

30

40

50

25)。PVgRXRは、ヘテロ二量体のエクジソン誘導性受容体〔これは、該ホルモンと一緒に
 なって、転写アクチベーター複合体を形成し、該複合体はtsg101の発現を駆動するプロモ
 ーターに結合する〕の両方の単量体をコードしている。トランスフェクションの24時間後
 にトランスフェクト細胞をエクジソン類似体プロナステロンで24時間処理したところ、Ts
 g101の発現が誘導された。トランスフェクションの48時間後、該細胞をかき取ることに
 より該培地中に回収し、遠心分離により集めた。ペレット化細胞を冷PBSで3回洗浄し、プロ
 テアーゼ阻害剤を含有する1mlの冷低張性バッファー(10mM Tris, pH 7.4, 1mM MgCl₂)
 で膨潤させ(15分間、4℃)、35ストロークのDounceホモジナイザー(B型乳棒)により破
 壊した。ライセートを10,000×g、4℃で10分間遠心して、未破壊細胞、核およびミトコン
 ドリアを除去した。NIH 3T3およびSL6細胞を、抗生物質およびウシ胎児血清を補充したDM 10
 EM中、37℃で維持した。SL6細胞は、既に記載されているランダムホモ接合ノックアウト
 (RHKO)法(Li, L. & Cohen, S. N., 1996, Cell 85, 319-329)を用いてアンチセンスR
 NAによりtsg101遺伝子の機能的不活性化が施された3T3誘導体である。FuGene6試薬を使用
 して、これらの細胞をpHIV-AP_{env}(Sutton, R. E., Wu, H. T., Rigg, R., Bohnlein,
 E. & Brown, P. O., 1998, J. Virol. 72,5781-5788)と、明細書中に示されている場合
 にはpME VSV G(Sutton, R. E., Wu, H. T., Rigg, R., Bohnlein, E. & Brown, P. O.,
 1998, J. Virol. 72,5781-5788)とでトランスフェクトした。全細胞質画分(S1)、核/
 ゴルジに富む画分(P1)、可溶性画分(S100)および細胞膜に富む画分(P100)への分画
 化を、記載されているとおり(L. Alland, S. M. Peseckis, R. E. Atherton, L. Berthi
 aume & Resh, M. D., 1994, J. Biol. Chem. 269,16701-16705)に行った。20% スクロ 20
 ースのクッションによる30,000rpm、4℃で80分間の超遠心分離(Beckman SW41ローター)
 により、0.45μmフィルターを通した培養上清からウイルス粒子を単離した。ペレット化
 ウイルス粒子を、4℃で穏やかに振とうすることにより1mlのリン酸緩衝食塩水に再懸濁さ
 せた。VSV G偽型ウイルス調製物の感染力を、MAGIAッセイ(Vodicka, M. A., Goh, W. C
 ., Wu, L. I., Rogel, M. E., Bartz, S. R., Schweickart, V. L., Raport, C., & Emer
 man, M., 1997, Virol. 233,193-198)を用いて評価した。

【0081】

免疫沈降アッセイ

プロテアーゼ阻害剤(Roche)を含有する非変性低張性バッファー(10mM Tris, pH 7.4,
 1mM MgCl₂)で予め洗浄したプロテインAアガロースビーズ(Pierce)を適当な抗体と共に 30
 インキュベートし、サイトゾル抽出物に加え、4℃で60分間回転させた。免疫沈降物を低
 張性バッファー中で洗浄し、5%メルカプトエタノールを含有するSDSサンプルバッファ
 ー中で煮沸し、SDS-PAGEにより分離し、本明細書中に示されている抗体を使用するウェス
 タンブロット法により分析した。

【0082】

タンパク質の検出

12.5% SDSポリアクリルアミドゲルでの電気泳動によりタンパク質を分離した。電気泳動
 後、該ゲルをニトロセルロースに転写し、ウェスタンブロット法により分析した。本明細
 書中に特定されている以下の抗体を使用した:抗Tsg101マウスモノクローナル抗体(Sant
 a Cruz, Inc)、アミノ酸383-391に対して誘導された抗Tsg101ウサギポリクローナル抗 40
 プチド抗体、抗FLAGマウスモノクローナル抗体(Sigmaから入手)、天然形態のCAタンパ
 ク質に対して誘導された抗CAウサギポリクローナル抗体(Ehrlich, L. S., Krausslich,
 H.-G., Wimmer, E. & Carter, C. A., 1990, AIDS & Hum. Retro. 6,1169-1175)、抗CA
 マウスモノクローナル抗体(NEN-DuPont)、抗p6ラットモノクローナル(ABI)。Lumi-Li
 ght試薬(Roche)を使用する化学発光により、タンパク質を可視化した。

【0083】

結果

ウイルス産生に及ぼすTsg101欠損の影響

実施例1は、Tsg101が、感染細胞からの成熟ウイルス粒子のエキソサイトーシスを導く領
 域であるHIV-1 Pr55 Gag^{p6}中のLDメイン(Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, 50

J. G. & Haseltine, W. A., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88,3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, J. Virol. 69,6810-6818) と特異的に結合することを示している。ウイルス産生におけるこの相互作用の役割を調べるために、ウイルス粒子の放出に及ぼすTsg101発現のモジュレーションの影響を判定した。初期アプローチとして、Tsg101発現がアンチセンス法 (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, Cell 85, 319-329) により正常レベルの約30%にまで低下しているNIH 3T3由来細胞系 (SL6) においてウイルスの産生を調べた。

【0084】

これらの実験のために、Gagと、NefおよびEnv以外のその他のすべてのウイルスタンパク質とを、pHIV-AP_{env} (Sutton, R. E., Wu, H. T., Rigg, R., Bohnlein, E. & Brown, P. O., 1998, J. Virol. 72,5781-5788) から発現させ、培地内に放出されたウイルス粒子をウェスタンブロット法により評価した。pHIV-AP_{env} は、nef遺伝子の代わりにヒト胎盤アルカリホスファターゼ遺伝子を含み、env遺伝子が欠失している。特定の細胞画分マーカーの全タンパク質染色およびウェスタンブロット分析により測定して、コンフルエンスの程度に合致した細胞培養物が得られるよう、増殖条件を確認した。対照実験においては、Fugene6試薬を使用してSL6が3T3と同じ効率でトランスフェクトされたことを確認する。トランスフェクトされた親および突然変異細胞の合致した培養物から調製された、互いの+/- 0.01 µg以内の全タンパク質値を示す細胞質 (S1) 抽出物は、同じクーマシーブルー染色タンパク質パターン (図5A、レーン1、2)、ならびにNa⁺K⁺ATPアーゼおよびアクチンの比較可能な発現 (レーン3、4) を示した。これに対して、SL6細胞は、既に報告されているとおり、抗Tsg101モノクローナル抗体を使用する比較半定量的ウェスタン分析により測定したときに親細胞のレベルの約30%のTsg101を蓄積した。

【0085】

3T3およびSL6細胞における細胞結合Gagタンパク質の分析

Gagの細胞内蓄積に及ぼすTsg101欠損の影響を判定するために、トランスフェクト細胞を分画遠心分離に付し、ウイルスタンパク質の量をS1ライセートおよび細胞画分において評価した。擬似処理細胞には含まれていなかったが、トランスフェクト3T3細胞から調製したS1ライセートは、細胞膜に富むP100画分中に蓄積した (図5Cの挿入図) 成熟CAタンパク質を含んでいた (図5C、レーン1、2)。この画分は、内在性膜タンパク質であるNa⁺K⁺ATPアーゼの局在化により同定された (例えば、L. Alland, S. M. Peseckis, R. E. Atherton, L. Berthiaume & Resh, M. D., 1994, J. Biol. Chem. 269,16701-16705を参照されたい)。これに対して、擬似処理SL6細胞またはトランスフェクトSL6細胞から調製したS1画分には、成熟CAがまったく検出されなかった (図5C、レーン3、4)。Gag前駆体を認識する抗体を使用する、SL6細胞からのS1およびP1画分の更なる分析は、これらの未処理SL6細胞またはトランスフェクトSL6細胞から調製したS1画分中にウイルス特異的タンパク質が存在しないことを証明した (図5D、レーン1、2)。これとは対照的に、該抗体は、繊維状アクチンタンパク質、ゴルジ複合体タンパク質および核タンパク質に富むP1画分中に完全長Gag前駆体を明らかにした (レーン4) (例えば、L. Alland, S. M. Peseckis, R. E. Atherton, L. Berthiaume & Resh, M. D., 1994, J. Biol. Chem. 269,16701-16705を参照されたい)。これらの結果は、SL6細胞におけるウイルス放出の阻止が、細胞膜へのGag前駆体の輸送の欠陥 (通常は、細胞膜においてそれが集合する) から生じたことを示唆しており、したがって、このことから、Tsg101はこの輸送機能に関連づけられる。

【0086】

HIV-1粒子の放出に及ぼすTsg101過剰産生の影響

Tsg101タンパク質の定常状態レベルは、タンパク質分解を含む翻訳後機構により、細胞増殖中は狭い範囲内に維持される (Feng, G. H., Lih, C.-J., & Cohen, S. N., 2000, Cancer Research 60,1736-1741)。FLAGタグ付きTsg101タンパク質の過剰発現は、内因性およびFLAGタグ付きの両タンパク質の代謝回転を促進させる (Feng, G. H., Lih, C.-J., & Cohen, S. N., 2000, Cancer Research 60,1736-1741)。pIND-h-Tsg101-FLAG構築物 (Feng, G. H., Lih, C.-J., & Cohen, S. N., 2000, Cancer Research 60, 1736-1741) の

使用は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) エクジソン応答性DNAエレメントを含有する修飾プロモーターの制御下でのFLAGタグ付きTsg101の誘導性発現を可能にする。エクジソン類似体である誘導物質プロナステロン (以下、「pa」という) を使用する予備的実験においては、内因性タンパク質の定常状態レベルの大きな変動を伴うことなくFLAGタグ付きTsg101を過剰産生させる条件を確認した。図6Aに示すとおり、抗Tsg101抗体を使用するウェスタン分析は、予想された約46kDaの位置に移動する内因性タンパク質のバンドと、より遅く移動する漸増量のタンパク質とを検出した。8残基のFLAG配列に対する抗体で該プロットを再プローブすることにより、より遅く移動するタンパク質は、該タンパク質をコードする誘導プラスミドの発現に由来するFLAGタグ付きTsg101であることが確認された。

【0087】

既に示されているとおり、プラスミドpgp-RRE-rは、COS細胞内でHIV-1調節タンパク質Revと共に発現されると、成熟HIV-1とは区別できないウイルス様粒子の集合および放出を可能にする (Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, *J. Virol.* 64,2743-2750, Ebbets-Reed, D., Scarlata, S. & Carter, C. A. *Biochem.* 35,14268-14275)。本発明者らが観察したTsg101関連効果の特異性を確実なものとするために、HIV-1 Gag p6突然変異体を平行して調べた。突然変異Gagタンパク質は、(i) Tsg101に結合するp6ドメインを欠き、(ii) タンパク質分解性成熟を完結できない粒子を集合させ、(iii) 非効率的に放出される (実施例1; Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, *J. Virol.* 69, 6810-6818を参照されたい)。Gag p6を含有する粒子は、細胞質中および培地中の蓄積を比較することにより測定した場合に、野生型の50%の効率で放出されることが判明した。一定量のpIND-h-Tsg101-FLAG DNA、rev、polおよびgagまたはgag 6でトランスフェクトされた細胞に誘導物質paを0、1および5 μ Mで加え、ウイルス様粒子に関して培地を調べることにより、ウイルス粒子の放出に及ぼす漸増量のTsg101の影響を調べた。予想どおり、revだけを発現する細胞からはウイルス特異的タンパク質は放出されなかった (図6B、レーン1)。0 μ Mのpaで処理した細胞から放出されたウイルス粒子は、予想されるバンドの成熟CAタンパク質を含有していた (レーン2)。1または5 μ Mのpaで処理した細胞から放出されたウイルスは、同じ成熟CA組成物を示したが、その量は対照 (0 μ Mのpa) レベルのそれぞれ約60%および約30%に低下した (それぞれレーン3および4)。pIND-h-Tsg101-FLAGの非存在下での5 μ Mのpaの添加は抑制効果を示さなかった。トランケート型Gag p6前駆体タンパク質およびMA-CAと同定されたバンドを含有する未成熟粒子の放出は、Tsg101の過剰発現によっては有意には影響されず、実質的に不変のままであった (レーン5~7)。これらの結果は、Tsg101の細胞内レベルの増加が野生型Pr55^{Gag}粒子の放出を妨げたこと、およびこの抑制がGag中のインタクトのp6ドメインの存在を必要としたことを示している。

【0088】

Tsg101 SBドメインの成熟の効果

総合すると、前記の結果は、Tsg101の欠損および過剰産生の両方が成熟ウイルス粒子の放出を妨げうることを示唆した。しかし、過剰発現されたFLAGタグ付きTsg101タンパク質が、正常な輸送を妨げるドミナントネガティブインヒビターとして作用している可能性がある (図6C)。前記のとおり、C末端に位置するSBドメインは、Tsg101タンパク質の分解に影響を及ぼすことにより、翻訳後にTsg101の定常状態レベルを調節する (Feng, G. H., Lih, C.-J., & Cohen, S. N., 2000, *Cancer Research* 60,1736-1741)。最近得られた証拠は、26Sプロテアソームがこの過程に関与していることを示している (Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T. W., & Cohen, S. N., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98,1619-1624)。Tsg101の過剰発現の際のウイルス粒子の放出における観察された低下は、自己調節に関連した事象によるTsg101結合Gagタンパク質の偶発的な分解から生じうると仮定される。この見解は、SB領域中で突然変異してTsg101自己調節に欠陥があるTsg101タンパク質の過剰発現がウイルスの放出の抑制を招くはずがないことを予想させるものである。Tsg101突然変異SD5-59タンパク質は、SBドメイン中の4個のアミノ酸 (残基348-351) がグリシ

10

20

30

40

50

ン残基により置換された高度に局在化した突然変異を含有し、その結果、Tag101タンパク質をダウンレギュレーションするその能力に一部欠陥がある (Feng, G. H., Lih, C.-J., & Cohen, S. N., 2000, Cancer Research 60, 1736-1741)。ウェスタンブロット分析は、誘導物質paの添加後に又は漸増量の突然変異Tsg101-FLAG DNAのトランスフェクションに回答して、このタンパク質が蓄積することを証明した (図7A)。

【0089】

前記突然変異体ならびに rev、pol および gag または gag⁶ でトランスフェクトされた COS 細胞に pa を 0、1 および 5 μM で加え、ウイルス様粒子に関して培地を調べることにより、ウイルス粒子の放出に及ぼす漸増量の SD5-59 の影響を検討した。予想どおり、rev だけを発現する細胞からはウイルス特異的タンパク質は放出されなかった (図7B、レーン1)。前記の結果 (図6B、レーン2) と一致して、0 μM の pa で処理した細胞から放出された粒子は成熟ウイルス粒子の CA 組成物を示した (レーン2)。Tsg101 の自己調節に関連した事象がウイルスの産生を妨げるといふ仮説と一致して、漸増量の SD5-59 突然変異タンパク質 (これは調節において非効率的である) の発現はウイルス粒子の放出を可能にした (レーン3、4)。しかし、驚くべきことに、突然変異 Tsg101 タンパク質の発現は、粒子と結合した未切断 Gag 前駆体の蓄積をも引き起こした。一方、Gag^{p6} により集合した粒子は、野生型 tsg101 が過剰発現された場合に検出されたものと同一であった (レーン5~7)。Tsg101 突然変異体の過剰発現が、プロセッシングされていない Gag を含有する粒子の放出を引き起こしたという観察は、該突然変異が、正常なウイルス放出を可能にするものの、ウイルス放出と Gag プロセッシングとの通常の結びつきを切り離したことを示唆している。

10

20

【0090】

aa348-351 の欠失は、Gag と Tsg101 との相互作用に影響を及ぼすとは予想されない。なぜなら、Gag への Tsg101 中の結合部位は N 末端の Ub E2 変異体 (UEV) ドメイン内に存在するからである。残基 348-351 を欠く C 末端トランケート型タンパク質は、ツーハイブリッドアッセイにおいて、無傷のタンパク質と同等の効率で Gag^{p6} に結合する。図8に示すとおり、抗 p6 抗体を使用するウェスタン分析は、Gag^{p6} 前駆体および NC-p6 切断産物が、gag と 2 μg の野生型または突然変異型 tsg101 DNA とでトランスフェクトされた誘導細胞から調製された細胞質抽出物中に蓄積することを示した (図8A、レーン3、4)。抗 Tsg101 抗体は、それらの2つの抽出物において、比較可能な程度に該ウイルスタンパク質を免疫沈降させたが (図8B、レーン3、4)、このことは、外因性タンパク質の発現が、Tsg101 に結合した Gag の量を変化させなかったことを示している。FLAG タグ (図8C) または完全長 Tsg101 タンパク質 (図8D) に対する抗体で該プロットを再プローブすることにより、免疫沈降物中に外因性 (FLAG タグ付き) および天然 Tsg101 タンパク質が存在することが確認された (レーン1~4)。これらの結果は、Gag 放出に及ぼす SD5-59 突然変異の影響の欠如が Tsg101-Gag 相互作用の廃止によるものではなかったことを示している。

30

【0091】

野生型 Tsg101 タンパク質の過剰発現によるウイルス粒子の放出の抑制が、Tsg101 の自己調節に関連した事象から生じるといふ仮説を更に検証するために、放出に対する最大効果が検出される条件下でのウイルスタンパク質の定常状態レベルを評価した。図9Aに示すとおり、gag、pol および rev でトランスフェクトされているが外因性 tsg101 ではトランスフェクトされていない対照細胞は、抗 CA 抗体を使用するウェスタン分析により示されるように、S1 および P1 の両方の画分において、高レベルのウイルスタンパク質を蓄積した (レーン2、4)。これに対して、最大抑制をもたらす条件下で gag、pol、rev および野生型 tsg101-FLAG DNA でトランスフェクトされた細胞 (図6B、レーン4を参照されたい) は、S1 または P1 画分中に、検出可能なウイルスタンパク質を含有していなかったが、このことは、ウイルスタンパク質の著しい分解が生じたことを示唆している (図9B、レーン1、3)。S1 および P1 の両方の画分において Gag^{p6} が検出されたため (レーン2、4)、この効果は Gag の p6 ドメインを必要としたことになる。同じ条件下、野生型 Tsg101 タンパク質の代わりに SD5-59 突然変異体を発現する細胞は、S1 画分においては検出可能なレベルのウイルスタンパク質を蓄積したが (パネルC、レーン1)、P1 画分においてはタンパク質は見出されなかつ

40

50

た(レーン3)。これに対して、Gag p6は、両方の画分において、より高いレベルで蓄積した(レーン2、4)。これらの結果は、Tsg101自己調節機構が細胞内Gagの定常状態レベルに影響を及ぼすという仮説を支持している。

【0092】

考察

本実施例においては、Tsg101の過少または過剰発現によるTsg101の定常状態レベルの変動が、マウス細胞および霊長類細胞からの成熟HIV-1ウイルス様粒子の放出にマイナスの影響を及ぼしたことが示されている。Tsg101の定常状態タンパク質レベルのTsg101媒介翻訳後自己調節に関与しているTsg101 SB領域の突然変異は、p6ドメインの突然変異と同様に、ウイルス粒子の放出を阻止する過剰発現Tsg101の能力を低下させた。これらの結果は、HIV-1ウイルス粒子の産生を、成熟ウイルスの排出を制御するGag Lドメインに結合する細胞性タンパク質(すなわち、Tsg101)に直接的に関連づけるものであり、Gag-Tsg101相互作用がHIV-1増殖において特異的かつ重大な役割を果たしているという有力な証拠を提供するものである。マウス(SL6)細胞および霊長類(COS)細胞の両方におけるTsg101の発現のモジュレーションがウイルスの放出に影響を及ぼしたということは、Tsg101が多様な細胞内環境中のHIV-1ウイルス集合における重要な補因子であることを示している。

10

【0093】

SBドメインにおいて突然変異したTsg101タンパク質の過剰発現が、タンパク質分解によりプロセシングされていないGagを含有するウイルス粒子の放出をもたらしたという観察は、ウイルス粒子の放出に関連したGagタンパク質の成熟にTsg101が関与していることを示している。成熟ビリオンの放出に及ぼすTsg101の影響は、エンドサイトーシス経路の、提案されているTsg101の調節(Lemmon, S. K. & Traub, L. M., 2000, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12,457-466)の結果であるかもしれない。興味深いことに、自己調節機構を部分的に不活性化するSD5-59の突然変異は、もう一つのエンドサイトーシスソーティングタンパク質であるVps28(Bishop NおよびWoodman P., 2001, *J Biol Chem.* 276: 11735-42) [これは、細胞膜とエンドサイトーシス小胞との間のタンパク質の輸送において機能する複合体中にTsg101と共に含まれる(Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1,242-258)]との相互作用に必要とされる領域内に存在する。

20

【0094】

もしかすると、SD5-59突然変異は、エンドサイトーシスソーティング機構からTsg101を切り離して、Gagがプロセシング部位を迂回して未切断形態で放出されるようにしたのかもしれない。この可能性は、Tsg101には結合せず従って該機構には関与しないGag p6突然変異体も、プロセシングされない形態で放出されるという観察により支持される。

30

【0095】

この点に関して、tsg101欠損SL6細胞が、リソソーム加水分解酵素カテプシンDのソーティングおよびタンパク質分解性成熟に欠陥[これは、該酵素がリソソーム中のプロセシング部位へ運搬されないことによると推定される(Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1,242-258)]を示したことは注目に値する。また、本実施例の結果は、Tsg101欠損を、Gag前駆体のそれらの正常な細胞膜成熟部位への欠陥のある輸送と関連づけるものである。本発明者らが観察したとおり、SL細胞におけるGag輸送の欠陥は、膜出芽部位で利用可能なGag前駆体のプールを制限して、放出される粒子の量を減少させる。p6を欠くGagは、それがあまり効率よく放出されなくとも、該膜と効率的に結合するため(例えば、Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Hase Itine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88,3195-3199を参照されたい)、特異的プロセシング部位または膜画分への輸送(膜局在化それ自体ではない)が、正常なレベルの天然Tsg101タンパク質を必要とするGag関連事象なのかもしれない。あるいは、タンパク質分解プロセシングはウイルスプロテアーゼ含有Gag-Pol前駆体を必要とするため(Swanstrom, R. & Wills, J. W., 1997, in *Retroviruses*, Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. 編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 263-334)、SD5-59突然変異体により媒介されるタンパク質分解プロセシングの効率の変化は、Gag-

40

50

Pol (p6を欠く)ではなくGag^{p6}に対するTsg101の示差的(differential)効果を反映しているのかもしれない。いずれにせよ、Tsg101をエンドサイトーシス機構から切り離したと考えられる突然変異が、COS-1細胞内に集合した粒子においてタンパク質分解プロセシングの効率を低下させたことは、HIV-1 Gagのタンパク質分解性成熟および放出を、エンドサイトーシス機構におけるタンパク質の適切な機能に関連づけるものである。おそらく、推定プロセシング画分または示差的(differential)輸送事象(その存在が本発明者らの結果により示唆される)には、プロテアソームが間接的に関与している。なぜなら、プロテアソームインヒビターはTsg101の細胞媒介分解(Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T. W., & Cohen, S. N., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98,1619-1624)およびGagのウイルスプロテアーゼ媒介プロセシング(Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,13057-13062)を妨げることが判明したからである。

10

20

30

40

【0096】

Tsg101によるウイルス放出の制御に関して、これらの結果は、Tsg101の定常状態レベルと成熟ウイルスの放出の効率とが密接に関連していることを示唆している。Tsg101の欠損および過剰産生は、類似した結果、すなわち、細胞膜に富むS1画分中のGag蓄積の減少を引き起こした。本実施例は、Tsg101の過剰発現がGagの見かけ上の分解と関連していること、およびSD5-59突然変異タンパク質の抑制効果の減少が、Tsg101の自己調節により課されるGagへの影響低下と関連していることを示している。興味深いことに、これらの実験条件下、Gagは、外因性tsg101遺伝子の過剰発現により、内因性Tsg101タンパク質より遥かに大きな影響を受けた。この観察は、Tsg101に結合するGagの形態が多量体であること、および該多量体中のサブセット分子とTsg101との相互作用が、Gagの蓄積および放出に対する観察された抑制効果を誘導するのに十分なものであることを示唆している。これは、効率的な粒子放出には、各Gag分子がLドメイン(実施例1に示すようにGag中のTsg101の結合部位)を有することを必要としないという従来観察(Wills, J. W., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, J. Virol. 68, 6605-6618)と一致しているようである。こうした観察はまた、Tsg101分子の亜集団のみがGagと増殖性複合体を形成しうることを示唆しているのかもしれない。なぜなら、成熟ウイルスの産生の抑制は、野生型FLAGタグ付きTsg101タンパク質の、より著しい蓄積により増強されたからである。最近得られた証拠は、Tsg101が、UbリガーゼであるMdm2(Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T. W., & Cohen, S. N., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98,1619-1624)およびNedd4と相互作用しうることを示している。これらの酵素は、エンドサイトーシス機構により輸送されることになる基質をモノユビキチン化し(Shih, S. C., Sloper-Mould, K. E. & Hicke, L., 2000, EMBO. J. 19,187-198)、また、プロテアソーム分解が意図される運搬物(cargo)(これはおそらく、過剰産生された場合のTsg101自体を含むであろう)をポリユビキチン化する(Hershko, A. & Ciechanover, A., 1998, Annu. Rev. Biochem. 67,425-479)。Tsg101がUbリガーゼと協同的に機能するという見解は、Ub機構をLドメインの機能およびウイルスのエキソサイトーシスに関連づける研究により裏付けられている(Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,13057-13062, Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,13063-13068; Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,13069-13074; Ott, D. E., Coren, L. V., Chertova, E. N., Gagliardi, T. D. & Schubert, U., 2000, Virology 278, 111-121; Vogt, V. M., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,12945-12947)。Tsg101とUbリガーゼとの相互作用は、集合しつつあるGag粒子にこれらの酵素を接近させうる。Gagは、輸送と分解を促進する厳密なTsg101媒介制御を必要とするのかもしれない。

50

【0097】

Tsg101がGagの輸送を厳密にどのように媒介しうるのかは明らかではない。おそらく、Tsg101は、エキソサイトーシスを調節する膜結合型の細胞性タンパク質の輸送を制御するのであろう。また、Tsg101が調節すると考えられているソーティング多重小胞体 (multi vesicular body: MVB) の形成に関連した陥入事象 (invagination event) (Lemmon, S. K. & Traub, L. M., 2000, Curr. Opin. Cell Biol. 12,457-466) が、ウイルス出芽 (この場合は、小胞形成が細胞質から離れて方向づけられる) 以外では、細胞における唯一の例であることは、注目に値する。したがって、Gagは、Tsg101との相互作用を介して、ソーティングMVBの形成を決定づける他のvpsホモログと結合する可能性があり、ウイルス粒子を含有する小胞の細胞外への陥入を該機構に導かせるのかもしれない。この方法が実際に該ウイルスに特有のものであれば、該相互作用の必要条件が、HIV増殖を妨げることができ

10

【0098】

7. 引用参考文献

本明細書中に引用されている全ての参考文献は、各個の刊行物または特許または特許出願の全体が全ての目的において参照により本明細書に組み入れられると明示的かつ個々に示されているのと同様に、それらの全体が全ての目的において参照により本明細書に組み入れられる。

【0099】

当業者には明らかなおおりの、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の多数の修飾および変更を施すことが可能である。本明細書に記載の具体的な実施形態は例示として記載されているにすぎず、本発明は、添付の特許請求の範囲の文言ならびにその特許請求の範囲に含まれる均等物の全範囲により限定されるにすぎない。

20

【0100】

配列番号1:

```
MAVSESQLKK MMSKYKYRDL TVRQTVNVIA MYKDLKPVLD SYVFNDGSSR ELVNLGTIP 60
VRYRGNIYNI PICLWLLD TY PYNPPICFVK PTSSMTIKTG KHVDANGKIY LPYLHDWKHP 120
RSELLELIQI MIVIFGEEPP VFSRPTVSAS YPPYTATGPP NTSYMPGMPS GISAYPSGYP 180
PNPSGYPGCP YPPAGYPAT TSSQYPSQPP VTTVGPSRDG TISED TIRAS LISAVSDKLR 240
WRMKEEMDGA QAELNALKRT EEDLKKGHQK LEEMVTRLDQ EVAEVDKNIE LLKKKDEELS 300
SALEKMQNS ENNDIDEVII PTAPLYKQIL NLYAEENAIE DTIFYLGEAL RRGVIDLDVF 360
LKHVRLLSRK QFQLRALMQK ARKTAGLSDL Y 391
```

30

【0101】

配列番号2:

```
MAVSESQLKK MMSKYKYRDL TVRETENVIT LYKDLKPVLD SYVFNDGSSR ELMNLGTIP 60
VPYRGNTYNI PICLWLLD TY PYNPPICFVK PTSSMTIKTG KHVDANGKIY LPYLHEWKHP 120
QSDLLGLIQV MIVVFGDEPP VFSRPISASY PPYQATGPPN TSYMPGMPGG ISPYPSGYPP 180
NPSGYPGCPY PPGGYPATT SSQYPSQPPV TTVGPSRDGT ISED TIRASL ISAVSDKLRW 240
RMKEEMDRAQ AELNALKRTE EDLKKGHQKL EEMVTRLDQE VAEVDKNIEL LKKKDEELSS 300
ALEKMQNSE NNDIDEVIIP TAPLYKQILN LYAEENAIED TIFYLGEALR RGVIDLDFVL 360
KHVRLLSRKQ FQLRALMQKA RKTAGLSLDY 390
```

40

【0102】

配列番号3:

PTAPP

5

配列番号4:

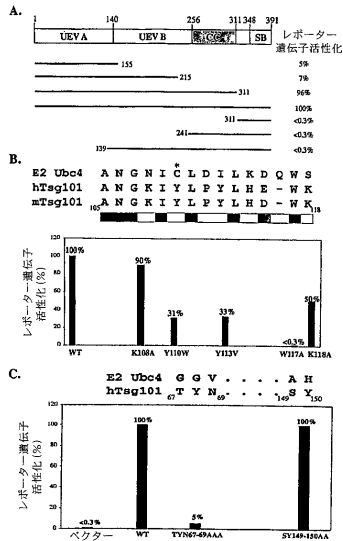
ALQSRPEPTA PPEES

15

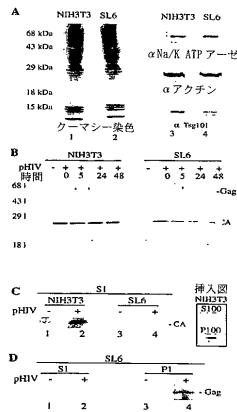
【図面の簡単な説明】

50

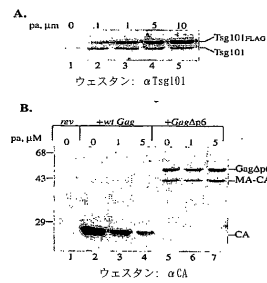
【 図 4 A - 4 C 】



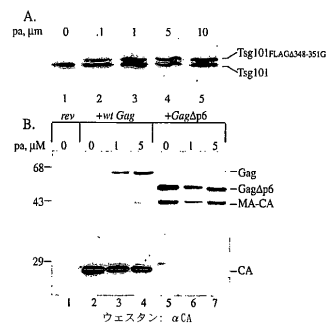
【 図 5 A - 5 D 】



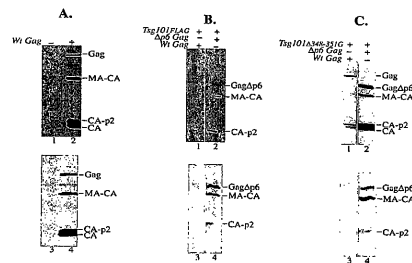
【 図 6 A - 6 B 】



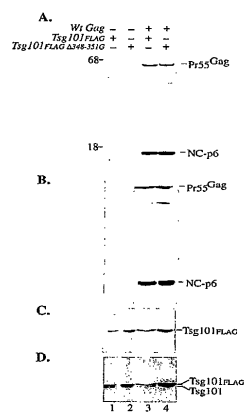
【 図 7 A - 7 B 】



【 図 9 A - 9 C 】



【 図 8 A - 8 D 】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 November 2002 (28.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/094314 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 39/21, A01N 43/04, G01N 33/53, C12Q 1/68, C12N 15/00, 15/64, 5/00, 15/63
- (21) International Application Number: PCT/US02/15965
- (22) International Filing Date: 21 May 2002 (21.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/292,761 21 May 2001 (21.05.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE RESEARCH FOUNDATION OF THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK [US/US]; P.O. Box 9, Albany, NY 12201-0009 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): COHEN, Stanley, N. [US/US]; Department of Genetics School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA 94305-5120 (US); CARTER, Carol [US/US]; 33 Renwick Avenue, Huntington, NY 11743 (US); GOFF, Arthur [US/US]; 279 Radio Avenue, Miller Place, NY 11764 (US); EHRlich, Lorna [US/US]; #1 Colgate Court, Shorcham, NY 11786 (US).
- (74) Agents: CORUZZI, Laura, A. et al.; Pennie & Edmonds LLP, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).
- (81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, 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, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/094314 A1

(54) Title: TSG101 AS INHIBITOR OF HIV PRODUCTION

(57) Abstract: The present invention provides methods for identifying peptides in a mammalian Tsg101 protein that binds to the PTAPP motif or L domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Such peptides can be used to inhibit Tsg101-HIV Gag binding, and is therefore effective in reducing HIV particle production. The invention also provides the peptides identified by the method of the invention and to method of using such peptides for treating HIV infection.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

TSG101 AS INHIBITOR OF HIV PRODUCTION

5

This application claims the benefit, under 35 U.S.C. §119(e), of U.S. Provisional Patent Application No. 60/292,761, filed on May 21, 2001, which is incorporated herein by reference in its entirety.

10

This invention was made with U.S. Government support. Accordingly, the U.S. Government has certain rights in the invention.

1. FIELD OF THE INVENTION

15

The present invention relates to methods for identifying peptides in a mammalian Tsg101 protein, which is effective in reducing retroviral particle production, e.g., HIV particle production. The invention also relates to the peptides identified by the method of the invention and to method of using such peptides for treating retroviral infection, HIV infection.

20

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

The Pr55^{Gag} protein of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) contains all of the information required for transport to assembly sites on the plasma membrane, association with genomic RNA, and release into extracellular space (see, e.g., Swanstrom, R. & Wills, J. W., 1997, in *Retroviruses*, eds. Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 263-334). However, although Gag is sufficient for viral assembly, cellular proteins are likely to facilitate the process. Several cellular proteins can be recovered from purified virions, suggesting proximity to the assembling particle (see, e.g., Arthur, L. O., Bess, J. W., Jr., Sowder, R. C. I., Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J.-C. & Henderson, L. E., 1992, *Science* 258, 1935-1938; and Ott, D. E., Coren, L. V., Kane, B. P., Busch, L. K., Johnson, D. J. Sowder, R. C. I., Chertova, E. N., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1996, *J. Virol.* 70, 7734-7743). Others interact directly with Pr55^{Gag} (see, e.g., Luban, B., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. & Goff, S. P., 1993, *Cell* 73, 1067-1078). Interaction with still others is implied, since Gag contains post-translational modifications (see, e.g., Bryant, M. & Ratner, L., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 523-527; Camaur, D., Galloway, P., Swingler, S. & Trono, D., 1997, *J. Virol.* 71, 6834-6841; Göttinger, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1989,

WO 02/094314

PCT/US02/15965

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86,5781-5785; Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1998, *J. Virol.* 72, 2962-2968). There are now reports that the region in Gag required for release of mature particles, the late (L) domain (see, e.g., Wills, J. W., 5 Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, *J. Virol.* 68, 6605-6618; Göttinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, *J. Virol.* 69, 6810-6818) directs the interaction of the protein with the ubiquitination machinery (see, e.g., Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., 10 Tessmer, U., Princiotta, M. F., Binnink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13057-13062; Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13063-13068; Vogt, V. M., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12945-12947; Ott, D. E., Coren, L. V., Chertova, E. N., Gagliardi, T. D. & Schubert, U., 2000, *Virology* 278, 111-121; Patnaik, A., Chau, V. & 15 Wills, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13069-13074). Based on its sequence and recent studies, Tsg101 is an ubiquitin (Ub)-conjugating E2 enzyme variant (UEV) protein involved in regulation of intracellular trafficking, transcriptional regulation, and cell cycle control (see, e.g., Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1,242-258; Lemmon, S. K. & Traub, L. M., 2000, *Curr. Opin Cell Biol.* 12,457-466; Xie, 20 W., Li, L. & Cohen, S. N., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1595-1600; Zhong, Q., Chen, Y., Jones, D. & Lee, W. H., 1998, *Cancer Res.* 58,2699-2702; Sun, Z., Pan, Z., Hope, W. X., Cohen, S. N. & Balk, S. P., 1999, *Cancer* 86,689-96). UEV proteins lack the critical Cys residue essential for conjugation and transfer of Ub to protein substrates or Ub-ligating (E3) enzymes (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; 25 Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* 75,467-469). They are highly conserved in evolution and constitute a novel family of proteins structurally related to, but distinct from, E2 enzymes.
- All retroviruses have in common 3 genes, *gag*, *pol*, and *env*, which specify the structural and enzymatic functions of the virus (see, e.g., Swanstrom, R. & Wills, J. W., 30 1997, in *Retroviruses*, eds. Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 263-334). The *gag* gene alone is sufficient for assembly and release of immature virus-like particles from infected cells. Maturation to form the infectious particle requires a viral-encoded protease (PR) encoded in *pol*. The *gag*-encoded protein (Gag) contains distinct domains involved in assembly and release. There is 35 a plasma membrane-binding (M) domain located in the N-terminal matrix (MA) region, a

WO 02/094314

PCT/US02/15965

- capsid (CA) domain that forms a genome-encasing core structure, a protein interaction (I) domain in the nucleocapsid (NC) region, and a late (L) domain, required for release by budding from the plasma membrane. The L domain is a Pro-rich motif that is highly conserved in retroviruses; other enveloped viruses, including rhabdo-, fib-, and Epstein Barr
- 5 viruses, and cellular proteins also have Pro-rich motifs (Harty, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huijbregtse, I. & Hayes, F. P., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13871-13876; Wills, J. W., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, *J. Virol.* **68**, 6605-6618; Göttinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, *J. Virol.* **69**, 6810-6818; Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L.C. & Longnecker, R., 2000, *Virology* **268**, 178-191; Yasuda, J. & Hunter, E., 1998, *J. Virol.* **72**, 4095-4103; Harty, R.N., Paragas, J., Sudol, M. & Palese, P., 1999, *J. Virol.* **73**, 2921-2929). The L domains in retroviruses differ in amino acid sequence and location within the respective viral structural proteins, but are functionally exchangeable (Wills, J. W.,
- 15 Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, *J. Virol.* **68**, 6605-6618; Parent, L.J., Bennett, R.P., Craven, R.C., Nelle, T.D., Krishna, N.K., Bowzard, J.B., Wilson, C.B., Puffer, B.A., Montelaro, R.C. & Wills, J.W., 1995, *J. Virol.* **69**, 5455-5460), suggesting commonality of function.
- The protein product of the TSG101 gene was originally identified by the reversible
- 20 neoplasia associated with its functional inactivation in murine fibroblasts (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* **85**, 319-329). Sequence analysis has suggested (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* **85**, 319-329; Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* **16**, 330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* **75**, 467-469), and experimental evidence has shown, that Tsg101 can function in both the modulation of transcription (Sun,
- 25 Z., Pan, J., Hope, W. X., Cohen, S. N. & Balk, S. P., 1999, *Cancer* **86**, 689-96; Watanabe, M., Yanagi, Y., Masahiro, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., Yanagisawa, J., & Kato, S., 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 900-905; Hittleman, A.B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J.A., Freedman, L.P., & Garabedian, M.J., 1999, *EMBO* **3**, 18, 5380-5388) and the inhibition of ubiquitination and protein decay (Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T.W., & Cohen, S.N., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1619-1624). The latter effects are mediated by an N-terminal region that contains a ubiquitin (Ub) conjugase (E2)-like domain, but lacks an active site Cys residue crucial to Ub conjugation. The structure of the UEV domain of Tsg101 and its modes of interaction with Ub and PTAP have also been reported (Pomillos et al., 2002, *EMBO J.* **21**:2397-2406).
- 35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

Cells deficient in Tsg101 show a variety of nuclear, microtubule, and mitotic spindle abnormalities (Xie, W., Li, L. & Cohen, S. N., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1595-1600; Zhong, Q., Chen, Y., Jones, D. & Lee, W. H., 1998, *Cancer Res.* **58**, 2699-2702), and *tsg101* null mutant mice show defective cell proliferation and early embryonic death

5 (Ruland, J., Sirard, C., Elia, A., MacPherson, D., Wakeham, A., Li, L., de la Pompa, J.L., Cohen, S.N., & Mak, T.W., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1859-1864). The steady state level of Tsg101 normally is controlled post-translationally within a narrow range in cultured murine and human cell lines (Feng, G.H., Lih, C.-J., & Cohen, S.N., 2000, *Cancer Research* **60**, 1736-1741) and over-expression from an adventitious promoter, as well as

10 *tsg101* deficiency, can lead to neoplastic transformation (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* **85**, 319-329). Regulation of the Tsg101 protein level, which can be affected by the Ub ligase, Mdm2 (Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T.W., & Cohen, S.N., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1619-1624), requires a C-terminal Tsg101 sequence that is evolutionarily highly conserved in organisms as disparate as humans, *C. elegans*, *S. pombe*,

15 and *D. melanogaster* (Feng, G.H., Lih, C.-J., & Cohen, S.N., 2000, *Cancer Research* **60**, 1736-1741; Bishop N and Woodman P., 2001, *J Biol Chem.* **276**:11735-42).

Stp22p/Vps23, a class E vacuolar protein sorting (*vps*) protein in *S. cerevisiae*, has been identified as a Tsg101 orthologue and Tsg 101 itself has been implicated in the trafficking of membrane-associated proteins (Bishop N and Woodman P., 2001, *J Biol*

20 *Chem.* **276**:11735-42; Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* **1**, 242-258; Li, Y., Kane, T., Tipper, C., Spatrick, P. & Jenness, D.D., 1999, *Mol. & Cell. Biol.* **19**, 3588-3599). It has also been shown that SL6 cells are defective in sorting of multiple surface-bound proteins (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* **1**, 242-258).

25

Citation of references hereinabove shall not be construed as an admission that such references are prior art to the present invention.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

30 The present invention provides methods for identifying peptides in a mammalian Tsg101 protein that bind to the PTAP motif or L domain of human immunodeficiency virus type I (HIV-1). Such peptides can be used to inhibit Tsg101-HIV Gag binding, and are therefore effective in reducing HIV particle production. In a preferred embodiment of the invention, peptides in a mammalian tsg101 protein are identified by a method comprising

35 (a) measuring a level of HIV viral particles released in a culture of mammalian cells,

WO 02/094314

PCT/US02/15965

wherein said mammalian cells comprise an expression construct comprising a portion of the coding sequence of a mammalian *tsg101* gene such that said mammalian cells express a gene product encoded by said portion of said coding sequence of said mammalian *tsg101* gene and are infected by HIV virus; and (b) comparing the level of HIV viral particles to a level of HIV viral particles released in a culture of control mammalian cells which do not comprise an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene under similar conditions. In the method, the level of HIV viral particles measured in step (a) compared to the level of HIV viral particles in the culture of control mammalian cells below a predetermined threshold level identify the gene product encoded by the portion of the coding sequence of the mammalian *tsg101* gene as effective in reducing HIV particle production. In a preferred embodiment, the level of HIV viral particles released in a culture of mammalian cells and the level of HIV viral particles released in a culture of control mammalian cells are represented by measured levels of particle associated p24. In preferred embodiments of the invention, the predetermined threshold level is a two-fold, four-fold, 90%, 95%, 99%, or 99.5% reduction of the level of HIV viral particles measured in step (a) compared to the level of HIV viral particles of the culture of control mammalian cells.

In another preferred embodiment of the invention, peptides in a mammalian *tsg101* protein are identified by a method comprising (a) measuring a level of HIV viral particle released in a culture of mammalian cells, wherein the mammalian cells comprise (i) an expression construct comprising a portion of the coding sequence of a mammalian *tsg101* gene and (ii) an expression construct comprising the HIV *gag* coding sequence such that the mammalian cells express a gene product encoded by the portion of the coding sequence of the mammalian *tsg101* gene and a gene product encoded by the HIV *gag* gene; and (b) comparing the level of HIV viral particle released to a level of HIV viral particle released in a culture of control mammalian cells under similar conditions, wherein the control mammalian cells comprise one or more expression constructs comprising the HIV *gag* coding sequence such that the mammalian cells express a gene product encoded by the HIV *gag* gene, and wherein the control mammalian cells do not comprise an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene. In still another preferred embodiment of the invention, peptides in a mammalian *tsg101* protein are identified by a method comprising (a) measuring a level of HIV viral particles released in a culture of mammalian cells, wherein the mammalian cells comprise (i) an expression construct comprising a portion of the coding sequence of a mammalian *tsg101* gene and (ii) one or more expression constructs comprising the HIV *gag*, *pol*, and *rev* coding sequences

WO 02/094314

PCT/US02/15965

such that the mammalian cells express a gene product encoded by the portion of the coding sequence of the mammalian *tsg101* gene and gene products encoded by the HIV *gag*, *pol* and *rev* genes; and (b) comparing the level of HIV viral particles released to a level of HIV viral particles released in a culture of control mammalian cells under similar conditions,

5 wherein the control mammalian cells comprise one or more expression constructs comprising the HIV *gag*, *pol*, and *rev* coding sequences such that the mammalian cells express gene products encoded by the HIV *gag*, *pol* and *rev* genes, and wherein the control mammalian cells do not comprise an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene. In these embodiments, the level of HIV viral

10 particles measured in step (a) compared to the level of HIV viral particles released in the culture of control mammalian cells below a predetermined threshold level identify the gene product encoded by the portion of the coding sequence of the mammalian *tsg101* gene as effective in reducing HIV particle production. In a preferred embodiment, the level of HIV viral particles released in a culture of mammalian cells and the level of HIV viral particles

15 released in a culture of control mammalian cells are represented by measured levels of particle associated p24. In preferred embodiments of the invention, the predetermined threshold level is a two-fold, four-fold, 90%, 95%, 99%, or 99.5% reduction of the level of particle associated p24 measured in step (a) compared to the level of particle associated p24 of the culture of control mammalian cells.

20 The invention also provides a method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, which is effective in reducing production of retroviral particles, e.g., particles of a lentivirus, including but not limited to HIV-1 and HIV-2, Simian Immunodeficiency Virus (SIV). The method comprises identifying a peptide that binds to a peptide comprising the PTAP motif of a retroviral protein, e.g., a HIV Gag

25 protein. In a preferred embodiment, the peptide comprising the PTAP motif is the peptide of SEQ ID NO:4. In another preferred embodiment, the peptide comprising the PTAP motif is a HIV Gag protein.

The invention also provides a method for identifying a peptide comprising a PTAP motif, which is effective in reducing production of retroviral particles, e.g., particles of a

30 lentivirus, including but not limited to HIV-1 and HIV-2, Simian Immunodeficiency Virus (SIV). The method comprises identifying a peptide identifying a peptide comprising a PTAP motif which binds to a TSG101 protein. In a preferred embodiment, the peptide comprises peptide comprises the sequence of SEQ ID NO:4.

The invention also provides the peptides identified by the method of the invention

35 and to method of using such peptides for treating HIV infection.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG 1. Identification of the region in PR55^{Gag} required for Tsg101 binding using the 2-hybrid assay. Reporter gene activation was quantified by determination of β -galactosidase units. FIG. 1A, The interaction of Gag and pl-p6 with Tsg101. 5 β -Galactosidase activity of Gag and pl-p6 were equivalent in two independent trials. FIG. 1B, The interaction of pl-p6 with Tsg101 (taken as 100%) ranged from ~10 to 30 β -galactosidase units in twenty independent trials. Negative interactions were equivalent to that obtained when pl-p6 was co-transformed with vector lacking Tsg101 (<0.3 units). The figure shows averaged values obtained for mutants in six independent trials as a percentage 10 of the wild-type interaction +/- 1%.

FIG. 2. Binding of PR55^{Gag} and Tsg101 *in vitro*. FIG. 2A, Autoradiography to detect immune-captured radiolabeled Tsg101. Lane 1, Tsg101 synthesized in RRL. Lanes 2 to 9, Determination of binding of radioactive Tsg101 to unlabeled Pr55GS bound to anti-T7 (lane 15 3), anti-CA (lanes 7, 8), or anti-p6 (lane 9) IgG immobilized on protein A beads. Antibodies are as defined in Materials and Methods. The amount of RRL used in lanes 2 to 9 was 5-fold greater than the amount used in lane 1. FIG. 2B, Confirmation of the presence of PR55^{Gag} on the beads by Western analysis. A monoclonal antibody against an antigenic 20 site in the CA domain was used to visualize the Gag proteins immunoprecipitated with the antibodies used in A. Molecular weight markers (kDa) are on the left of the panels.

FIG. 3. Co-immune precipitation of PR55^{Gag} and Tsg101 from cytoplasmic extracts. FIG. 3A, Total cytoplasmic extract. Extracts were prepared from cells transfected with rev (lane 1), *rev, gag* and *pol* (lane 2), or *rev, gag Δ p6* and *pol* (lane 3). FIG. 3B, 25 Immunoprecipitation with anti-Tsg101 monoclonal antibody using extracts of cells transfected with *rev* (lane 1); *rev*, wild-type *gag* and *pol* (lane 2); or *rev, gag Δ p6* and *pol* (lane 3) as detected by the anti-NC polyclonal antibody. The blot was re-probed with an anti-Tsg101 polyclonal antibody to confirm the presence of Tsg101 in the immune-precipitates (lanes 4-6). FIG. 3C, Immunoprecipitation with anti-CA polyclonal 30 antibody using extracts from cells transfected with *rev* (lane 1) or *rev, gag* and *pol* (lane 2) as detected by anti-Tsg101 monoclonal antibody. The blot was re-probed with anti-CA monoclonal antibody to confirm the presence of Gag in the immune-precipitate (lanes 3, 4). Molecular weight markers (kDa) are on the left of the panels.

35 FIG. 4. Identification of the region in Tsg101 required for Pr55^{Gag} binding.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

Truncation (FIG. 4A) and substitution (FIGS. 4B and 4C) mutants of Tsg101 were tested in the 2-hybrid assay for interaction with the pl-p6 fusion protein. The figure shows averaged values as a percentage of the wild-type interaction with \pm 2-6% error. Notations are as in legend to Fig. 1.

5

FIG. 5. Effects of Tsg101 deficiency on virus production and cellular localization.

FIG. 5A, NIH 3T3 and SL6 lysates prepared from *gag*-transfected cells were separated by SDS-PAGE, stained by Coomassie blue for total protein (lanes 1 & 2), and analyzed by Western blotting for Na⁺K⁺ATPase, actin, and Tsg101 (lanes 3 & 4). FIGS. 5B-5D, Western blots of (5B) viral particles; (5C) S1 extracts of NIH 3T3 and SL6 cells; *Inset*, S100 (lane 1) and P100 (lane 2) fractions of pHIV-transfected NIH 3T3 cells; (5D) S1 and P1 extracts of SL6 cells. The blots were probed with anti-CA rabbit serum (FIGS. 5B and 5C) or anti-NC goat antiserum. (FIG. 5D). Equivalent samples for Western analysis were determined by Biorad assay.

15

FIG. 6. Effect of wild-type Tsg101 over expression on release of HIV-1 particles.

FIG. 6A, Induced expression of wild-type Tsg101_{FLAG}. S1 fractions prepared from transfected COS-1 cells were analyzed by Western blotting with anti-Tsg101 antibody. *pa*, ponasterone inducer. FIG. 6B, Effect of Tsg101-FLAG over expression on HIV-1 release from COS-1 cells, analyzed by Western blotting of particles with anti-CA antibody. Migration positions of molecular size markers are indicated on the left.

20

FIG. 7. Effect of mutated Tsg101 over expression on release of HIV-1 particles.

FIG. 7A, Induced expression of Tsg101_{FLAG^{348-351G}}. FIG. 7B, Effect of Tsg101-FLAG over expression on HIV-1 particle production. S1 fractions and viral particles were analyzed as described in the legend to FIG. 6.

25

FIG. 8. Immunoprecipitation of viral proteins in cytoplasmic extracts with anti-

Tsg101 antibody. FIG. 8A, Cytoplasmic extracts, prepared from mock- (lanes 1 & 2) and *gag*- (lanes 3 & 4) transfected COS-1 cells expressing FLAG-tagged wild-type (lanes 1 & 3) or mutated (lanes 2 & 4) Tsg101, were analyzed by Western blotting with anti-p6 antibody. Expression was induced using 2 μ g DNA encoding *tsg101* and 5 μ M *pa*. FIGS. 8B-8D, The extracts were immunoprecipitated with anti-Tsg101 rabbit polyclonal antibody and probed for proteins with (8B) anti-p6 antibody; (8C) anti-FLAG antibody; and (8D) anti-Tsg101 mouse monoclonal antibody.

35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

FIG. 9. Effect of Tsg101 over expression on intracellular steady-state level of viral proteins. Cytoplasmic extracts were prepared from cells expressing Rev- (FIG. 9A, lanes 1 & 3), wild-type Gag- (FIGS. 9B & 9C, lanes 1 & 3), or Gag Δ p6- (FIGS. 9B & 9C, lanes 2 & 4) and FLAG-tagged wild-type (FIG. 9B) or mutated (FIG. 9C) Tsg101. S1 (lanes 1 & 2) and P1 (lanes 3 & 4) fractions were analyzed by Western blotting with anti-CA antibody.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, it has been discovered that the PTAP motif or L domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), which is located in the C-terminal p6 region of the Gag precursor polyprotein, binds to the protein product of the *tsg101* gene *in vitro* and in the cytoplasm of transfected cells. The present invention provides an assay for testing molecules, e.g., peptides comprising at least four contiguous amino acids of the PTAP motif, and which molecules inhibit Tsg101-HIV Gag binding. Preferably, the assay of the invention is used to identify molecules, e.g., peptides, which can achieve a two-fold, four-fold, more than 90%, more than 95%, more than 99%, or more than 99.5% reduction of HIV viral release. Molecules, e.g., peptides, identified by the assay may be used as therapeutic compositions for treating patients infected with HIV-1 or other retrovirus.

It has also been surprisingly found that perturbation of the steady-state level of Tsg101 protein by under- or over-expression of the Tsg101 protein negatively affects release of HIV-1 virus-like particles from murine and primate cells. The present invention therefore provides a pharmaceutical composition comprising one or more pharmaceutically acceptable carriers or diluents and a mammalian Tsg101 protein. In another aspect of the invention, assays are provided for identifying fragments of a mammalian Tsg101 protein which are effective in reducing HIV particle production. As used herein, "HIV particle" encompasses both mature and immature virus-like particles. A fragment of Tsg101, herein referred to as a "peptide" of Tsg101, identified by a subject assay as effective in reducing HIV particle production, is useful as a therapeutic composition for treating a patient infected with HIV-1 or other retrovirus. Pharmaceutical compositions comprising one or more subject peptides and one or more pharmaceutically acceptable carriers or diluents are therefore also provided.

Thus, in one embodiment of the present invention, there is provided a method for identifying a peptide derived from a mammalian Tsg101 protein, which peptide is effective in reducing HIV particle production. The method comprises the steps of: (a) introducing into a mammalian cell or cells, a first expression construct wherein the first expression

WO 02/094314

PCT/US02/15965

construct comprises a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene; (b) introducing into the same mammalian cell or cells either HIV virus or one or more expression vectors comprising the HIV *gag*, *pol* and *rev* coding sequences; (c) incubating the transfected mammalian cell or cells in a suitable media for a sufficient time and under conditions sufficient to obtain a mammalian cell culture wherein the mammalian cells express a gene product encoded by the portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene, and gene products encoded by the HIV *gag*, *pol*, and *rev* genes. In the case where one or more expression vectors comprising the HIV *gag*, *pol*, and *rev* genes, are used to transfect a mammalian cell or cells, the level of particle associated p24 (capsid protein) may be measured. A finding of a reduced level of particle associated p24, when compared to a control mammalian cell culture which has not been transfected with the expression construct comprising a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene, correlates with the identification of a Tsg101 peptide effective in reducing HIV particle formation. In the case where HIV virus is added to the mammalian cell or cells, particle associated p24 may be measured and a correlation made, as described above. Alternatively, when HIV virus is added to the mammalian cell or cells, HIV particles released from the cells may be quantified. A finding of a reduction in HIV particle production, when compared to a control mammalian cell culture which has not been transfected with the expression construct comprising a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene, correlates with the identification of a peptide effective in reducing HIV particle production.

In another embodiment of the invention, peptides in a mammalian tsg101 protein are identified by a method comprising (a) measuring a level of HIV viral particles released in a culture of mammalian cells, wherein said mammalian cells comprise an expression construct comprising a portion of the coding sequence of a mammalian *tsg101* gene such that said mammalian cells express a gene product encoded by said portion of said coding sequence of said mammalian *tsg101* gene and are infected by HIV virus; and (b) comparing the level of HIV particles to a level of HIV particles released in a culture of control mammalian cells which do not comprise an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene under similar conditions. In the method, the level of HIV particles measured in step (a) compared to the level of HIV particles of the culture of control mammalian cells below a predetermined threshold level identify the gene product encoded by the portion of the coding sequence of the mammalian *tsg101* gene as effective in reducing HIV particle production.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

In still another embodiment of the invention, peptides in a mammalian *tsg101* protein are identified by a method comprising (a) measuring a level of HIV viral particle released in a culture of mammalian cells, wherein the mammalian cells comprise (i) an expression construct comprising a portion of the coding sequence of a mammalian *tsg101* gene and (ii) an expression construct comprising the HIV *gag* coding sequence such that the mammalian cells express a gene product encoded by the portion of the coding sequence of the mammalian *tsg101* gene and a gene product encoded by the HIV *gag* gene; and (b) comparing the level of HIV viral particle released to a level of HIV viral particle released in a culture of control mammalian cells under similar conditions, wherein the control mammalian cells comprise one or more expression constructs comprising the HIV *gag* coding sequence such that the mammalian cells express a gene product encoded by the HIV *gag* gene, and wherein the control mammalian cells do not comprise an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene.

In still another embodiment of the invention, peptides in a mammalian *tsg101* protein are identified by a method comprising (a) measuring a level of HIV particles released in a culture of mammalian cells, wherein the mammalian cells comprise (i) an expression construct comprising a portion of the coding sequence of a mammalian *tsg101* gene and (ii) one or more expression constructs comprising the HIV *gag*, *pol*, and *rev* coding sequences such that the mammalian cells express a gene product encoded by the portion of the coding sequence of the mammalian *tsg101* gene and gene products encoded by the HIV *gag*, *pol* and *rev* genes; and (b) comparing the level of HIV particles released to a level of HIV particles released in a culture of control mammalian cells under similar conditions, wherein the control mammalian cells comprise one or more expression constructs comprising the HIV *gag*, *pol*, and *rev* coding sequences such that the mammalian cells express gene products encoded by the HIV *gag*, *pol* and *rev* genes, and wherein the control mammalian cells do not comprise an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene. In these embodiments, the level of HIV particles measured in step (a) compared to the level of HIV particles released in the culture of control mammalian cells below a predetermined threshold level identify the gene product encoded by the portion of the coding sequence of the mammalian *tsg101* gene as effective in reducing HIV particle production.

In preferred embodiments of the invention, the peptide identified causes at least a two-fold, four-fold, 90%, 95%, 99%, or 99.5% reduction of the level of HIV particles released or reduction of the level of particle associated p24 in the culture.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

In an alternative embodiment, a method for identifying a peptide derived from a mammalian Tsg101 protein, which peptide is effective in reducing HIV particle production may be performed as described above except that instead of using an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene, random fragments
5 (peptides) of a mammalian Tsg101 protein are generated and added to a mammalian cell or cells which cells are also infected with HIV or transfected with one or more expression constructs comprising the HIV *gag*, *pol*, and *rev* coding sequences. Tsg101 fragments (peptides) may be introduced into mammalian cells using well known methods of permeation. It will be apparent to a person of ordinary skill in the art that this embodiment
10 is also applicable for identifying other molecules that is effective in reducing HIV or other viral particle production. Therefore, in another aspect of the invention, a method for identifying molecules that is effective in reducing HIV or other viral particle production is provided.

In another embodiment, the invention provides a method for identifying a peptide or
15 fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, which is effective in reducing production of retroviral particles, e.g., particles of a lentivirus, including but not limited to HIV-1 and HIV-2, Simian Immunodeficiency Virus (SIV). The method comprises identifying a peptide that binds to a peptide comprising the PTAP motif of a HIV Gag protein. In a preferred embodiment, the peptide comprising the PTAP motif is the peptide
20 of SEQ ID NO:4. In another preferred embodiment, the peptide comprising the PTAP motif is a HIV Gag protein. Any standard method known in the art for identifying peptide binding can be used.

Preferably, the portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene includes at least a portion of the UEV A domain of Tsg 101. The UEVA region spans amino acids 1
25 through 140 of a mammalian Tsg101.

In another preferred embodiment, the mammalian cells are primate cells. Mammalian 25 cells useful for practicing the invention include but are not limited to green monkey kidney cells, human HeLa cells, and human 293 cells. These and other mammalian cell lines are available from a variety of sources such as the American Type Culture
30 Collection (ATCC), Manassas, Va.

A mammalian *tsg101* gene may be obtained from any mammalian cell. For example, a human *tsg101* gene may be isolated from B cells or a B cell library (Durfee T., et al. 1993, *Genes Dev.* 7:555-569). Similarly, a mouse or other mammalian *tsg101* gene may be
isolated from B cells or a B cell library. The nucleotide sequence and corresponding amino
35 acid sequence for a human *tsg101* gene and a mouse *tsg101* gene are known. See, e.g., Li, L.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

et al. (1997) *Cell* 88:143-154, which is incorporated by reference herein. Relevant mouse and human *tsg101* genes are also disclosed in U.S. Patent Nos. 5,807,995; 5,892,016; 5,679,523; and 5,891,668, which are also incorporated by reference herein. The aforementioned disclosures, as well as any other publications mentioned herein, are

5 incorporated by reference as if fully set forth. The mouse Tsg101 protein is also set forth herein as SEQ ID NO:1. The human Tsg101 protein is set forth herein as SEQ ID NO:2.

Peptides derived from a mammalian Tsg101 protein may be obtained by truncating the 3', 5' or both 3' and 5' end of the *tsg101* coding sequence by genetic manipulation. *In vitro* mutagenesis is helpful for introducing convenient restriction sites. There are various

10 commercially available kits particularly suited for this application such as the T7-Gene *in vitro* Mutagenesis Kit (USB, Cleveland, OH) and the QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, San Diego, CA). Alternatively, PCR primers can be defined to allow direct amplification of a particular portion of a *tsg101* coding sequence. (See, e.g., Example 1). Preferably, the portion of the *tsg101* coding sequence corresponds to a portion

15 of the UEVA region. A portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene may be inserted into many different types of expression vectors. For example, the expression construct comprising a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene may be any expression construct which functions in mammalian cells. In a more preferred embodiment, the coding sequence for a portion of a *tsg101* gene is placed in a vector which

20 encodes both monomers of a heterodimeric ecdysone-inducible receptor, that together with the hormone ecdysone or ecdysone analogue such as pronasterone, form a transcriptional activator complex that binds the promoter driving *tsg101* expression.

Expression vectors encoding different HIV genes are widely known and available. For example, *tgp-RRE-r* (Smith et al. 1990 *J. Virol.* 64:2743-2750) is an expression vector

25 comprising both the *gag* and *pol* coding regions. pCMV-*rev* is an expression vector comprising the HIV-1 *rev* gene. Rev is an HIV-1 encoded protein required for expression of *gag* and *pol*. In mammalian host cells, a number of expression systems using elements from viral and cellular DNA may be utilized for expressing a portion of a *tsg101* coding sequence and the HIV *gag*, *pol* and *rev* coding sequences.

30 Any known method may be used to quantify HIV particles released from the cells. Quantification of HIV particles released from the cells may be performed using different methods such as by p24 ELISA or by infectivity assay as described in Flint, S.J. *et al.*, 2000, *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*, ASM Press, Washington, D.C. Virus particles may first be isolated from culture media or supernatant

35 by passing through a filter such as e.g., a 0.22 μm filter followed by ultracentrifugation

WO 02/094314

PCT/US02/15965

through a 20% sucrose cushion. Following disruption of HIV particles with a suitable detergent such as e.g., 1% SDS, p24 protein may be separated by electrophoresis through a 12.5% SDS polyacrylamide gel, followed by Western blotting using antibodies specific to p24 such as anti-CA rabbit polyclonal antibody raised against a native form of the CA protein (Ehrlich, L.S., et al., 1990 *AIDS Res & Hum. Retro.* 6:1169-1175), or anti-CA mouse monoclonal antibody (NEN-DuPont).

In accordance with the present invention, there are provided Tsg101 peptides which comprise at least about four contiguous amino acids of a mammalian Tsg101 protein, which are effective in reducing HIV particle production and which are identified by a subject assay hereinbefore described. Preferably, a subject peptide comprises at least about 5 contiguous amino acids which are effective in reducing HIV particle production and which are identified by a subject assay hereinbefore described. Even more preferred is a peptide comprising at least about 6 contiguous amino acids and which is effective in reducing HIV particle production and which are identified by a subject assay hereinbefore described. In a most preferred embodiment, a subject peptide comprises at least about 7 contiguous amino acids. Thus, for example, a subject peptide may comprise at least about 4, preferably at least about 5, more preferably at least about 6, and most preferably, at least about 7 contiguous amino acids of the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. Preferably, a subject peptide is derived from or includes part of the UEV A domain of a mammalian Tsg101 protein. As used herein, "peptide" refers to a fragment of a Tsg101 protein comprising at least about four amino acids. Thus, a peptide may comprise as little as about four amino acids of a mammalian Tsg101 protein. A subject peptide may also comprise anywhere from about four to about 140 contiguous amino acids from a mammalian Tsg101 protein. Amino acid sequences larger than about 140 amino acids are referred to herein as Tsg101 fragments. Additionally, analogs, homologs, fragments, chemical derivatives, and pharmaceutically acceptable salts of the subject peptides are included within the scope of the term "peptide". A subject peptide may also comprise a repetition of an amino acid unit.

By "analogs" is meant substitutions or alterations in the amino acid sequences of a subject peptide, which substitutions, or alterations, e.g., additions and deletions of amino acid residues, do not abolish the property of reducing HIV particle production or inhibiting Tsg101-Gag binding. Thus, an analog may comprise a peptide having a substantially identical amino acid sequence to a subject peptide and in which one or more amino acid residues have been conservatively substituted with chemically similar amino acids.

35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

In addition to the recombinant DNA techniques described above for preparing a subject peptide, a peptide of the present invention may be synthesized by a number of known techniques. For example, a peptide may be prepared using the solid-phase synthetic technique initially described by Merrifield, in *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963).

5 Other peptide synthesis techniques may be found in M. Bodanszky et al. *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 2d Ed. (1976) and other references readily available to skilled artisans. A summary of polypeptide synthesis techniques can be found in J. Stuart and J. D. Young. *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984). Peptides may also be synthesized by solution methods as described in *The Proteins*, Vol. II, 3d Ed.,

10 Neurath, H. et. al., Eds., p. 105-236, Academic Press, New York, N. Y. (1976). Appropriate protective groups for use in different peptide syntheses are described in the above-mentioned texts as well as in J. F. W. McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Peleu Press, New York, N.Y. (1973).

The peptides of the present invention might also be prepared by chemical or enzymatic cleavage from larger portions of a mammalian Tsg101 protein or from an entire mammalian Tsg101 protein. The peptides of the present invention are preferably

15 chemically synthesized by the Merrifield solid phase technique. In general, the method comprises the sequential addition of one or more amino acid residues to a growing peptide chain. Normally, either the amino or carboxyl group of the first amino acid residue is

20 protected by a suitable, selectively removable protecting group. A different, selectively removable protecting group is utilized for amino acids containing a reactive side group such as lysine.

The preferred method of solid phase synthesis entails attaching the protected or derivatized amino acid to an inert solid support through its unprotected carboxyl or amino

25 group. The protecting group of the amino or carboxyl group is then selectively removed and the next amino acid in the sequence having the complementary (amino or carboxyl) group suitably protected is admixed and reacted under conditions suitable for forming the amide linkage with the residue already attached to the solid support. The protecting group of the amino or carboxyl group is then removed from this newly added amino acid residue,

30 and the next amino acid (suitably protected) is added, and so forth. After all the desired amino acids have been linked in the proper sequence, any remaining terminal and side group protecting groups including the solid support are removed sequentially or concurrently to yield the final peptide.

In still another aspect of the invention, there is provided a method for identifying a

35 peptide comprising at least four contiguous amino acids of the HIV-1 late (L) domain and

WO 02/094314

PCT/US02/15965

which peptide inhibits interaction between a Tsg101 protein and HIV Gag. The HIV-1 late L domain is made up of the amino acid sequence PTAPP (SEQ ID NO:3), which is also referred to as the PTAPP motif. Thus, a peptide identified by the method will have at least four contiguous amino acids of the PTAPP motif and may also include additional amino acids on either or both the amino terminal and carboxy terminal ends. Preferably, a peptide identified by the method will comprise at least seven amino acids, including the PTAPP motif. More preferably a peptide identified by the method will include at least four amino acids of the PTAPP motif and one or more amino acids which naturally flank the PTAPP motif. PTAPP-derived peptides may embody repetition of the five amino acid, PTAPP motif. The amino acids which flank the PTAPP motif are indicated below (L domain indicated in bold).

ALQSRPEPTAPPEES (SEQ ID NO:4).

15 A method for identifying a peptide comprising the HIV-1 Gagp6 late (L) domain and which peptide inhibits interaction between a Tsg101 protein and HIV Gag comprises the following steps. First, a peptide comprising the HIV-1 Gag or HIV-1 Gagp6 late (L) domain is immobilized on a solid support or surface such as a bead, plate, slide, or microtiter dish. Immobilization may be achieved utilizing specific anti Gag or HIV Gagp6 late domain antibodies or other chemical linkers such as, e.g., UV cross linkers. Both an experimental and control run are performed and thus, at least two separate solid supports or surfaces (i.e., a first and second solid support or surface) have the HIV-1 Gag or HIV-1 Gagp6 late (L) domain immobilized thereon (e.g., one column for the experimental run, and one column for the control run). A first (experimental) reaction mixture comprising labeled Tsg101 protein, buffer, and a peptide which comprises the HIV-1 Gagp6 late (L) domain is incubated at about 4C for a sufficient time. A second (control) reaction mixture comprising labeled TSG101 and a buffer is also incubated at about 4C for a sufficient time. Preferably, a sufficient time is about 60 minutes. The first (experimental) reaction mixture is added to the first solid support or surface and incubated in a liquid phase for a sufficient time at about 4C. Likewise, the second (control) reaction mixture is added to the second solid support or surface and incubated in a liquid phase for a sufficient time at about 4 C. Preferably, a sufficient time is about 60 minutes. Next, the first solid support or surface is separated from the liquid phase to obtain a first solid phase. Likewise, the second solid support or surface is separated from the liquid phase to obtain a second solid phase. The amount of labeled Tsg 101 in the first solid phase and in the second solid phase is then

WO 02/094314

PCT/US02/15965

determined. A decrease in the amount of labeled TSG101 in the first solid phase when compared to the amount of labeled Tsg101 in the second solid phase correlates with the identification of a peptide comprising the HIV-1 Gagp6 late (L) domain, which peptide inhibits interaction between a Tsg101 protein and HIV Gag. Appropriate antibodies which
5 may be linked to the immobilized peptide comprising the HIV-1 Gag or HIV-1 Gagp6 late (L) domain include anti-p6 rat monoclonal antibody (ABI) and anti Gag CA (NEN-Dupont).

The invention also provides a method for identifying a peptide comprising a PTAP motif, which modulates or inhibits interaction between a Tsg101 and a PTAP or related motif of a viral protein which the Tsg101 interacts with. The peptide can be used for
10 reducing production of virus particles, e.g., particles of a lentivirus, including but not limited to HIV-1 and HIV-2, Simian Immunodeficiency Virus (SIV). The method comprises identifying a peptide comprising a PTAP motif which binds to a TSG101 protein. In a preferred embodiment, the peptide comprises the sequence of SEQ ID NO:4. The method is also applicable for identifying other molecules that modulate or inhibit interaction
15 between a Tsg101 and a PTAP or related motif of a viral protein which Tsg101 interacts with, e.g., a PTAP motif of a HIV Gag, e.g., by binding to the active site of the Tsg101 or the viral protein. Therefore, in another aspect of the invention, methods for identifying molecules that modulate or inhibit interaction between a Tsg101 and a PTAP or related motif of a viral protein are provided. Any standard method known in the art for identifying
20 peptide binding can be used.

Tsg101 may be labeled with a fluorescer, enzyme, chemiluminescer, photosensitizer, suspendable particles, or radioisotope using any of the common commercially available signal producing systems. Alternatively, Tsg101 may be labeled with a tag such as e.g., an antibody, a 6His tag, GST tag, or influenza virus epitope (HA tag). The Tsg101 protein for
25 use in the assay described above may be from a mouse, human or other mammalian protein.

Preferably, a peptide identified by the assay causes at least about a three-fold reduction in Tsg101-HIV Gag interaction. Any of the peptides of the present invention may be used as a therapeutic composition for reducing HIV particle formation or for inhibiting Tsg101-HIV Gag interaction. Preferably, the therapeutic composition is a pharmaceutical
30 composition. Thus, the peptides of the present invention may be administered preferably to a human subject as a pharmaceutical composition containing a therapeutically effective dose of at least one of the peptides according to the invention, together with one or more pharmaceutically acceptable carriers or diluents. The term "therapeutically effective amount" means a dose needed to reduce HIV particle formation or other retrovirus
35 formation or inhibit Tsg101-HIV Gag interaction, depending on mode of action of a subject

WO 02/094314

PCT/US02/15965

peptide. Such mode of action is determined by an appropriate assay as hereinbefore described.

When administered intravenously, the peptide compositions may be combined with other ingredients, such as carriers, and/or diluents and/or adjuvants. Typical carriers include
5 a solvent or dispersion medium containing, for example, water buffered aqueous solutions, ethanol, polyols such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, suitable mixtures thereof, surfactants or vegetable oils. Isotonic agents such as sugars or sodium chloride may be incorporated in the subject compositions. The peptides may also be covalently attached to a protein carrier, such as albumin, so as to minimize clearing of the peptides from the
10 blood. There are no limitations on the nature of the other ingredients, except that they must be pharmaceutically acceptable, efficacious for their intended administration and should not degrade the activity of the active ingredients of the compositions. The peptide compositions of the invention may also be impregnated into transdermal patches or contained in subcutaneous inserts, preferably in liquid or semi-liquid form so that a therapeutically
15 effective amounts of one or more subject peptides may be time-released into a subject.

When the peptides of the invention are administered orally, the pharmaceutical compositions thereof containing an effective dose of the peptide may also contain an inert diluent such as an assimilable edible carrier and the like, be in hard or soft shell gelatin capsules, be compressed into tablets, or may be in an elixir, suspension, syrup or the like.
20 The subject peptides are thus compounded for convenient and effective administration in pharmaceutically effective amounts with a suitable pharmaceutically acceptable carrier in a therapeutically effective dose.

The precise therapeutically effective amount of peptides to be used in a method of treating a patient infected with HIV will be determined by the practitioner based on the age,
25 weight and/or gender of the subject, severity of the disease state, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), and/or reaction sensitivities. It can generally be stated that the peptides should preferably be administered in an amount from about 0.1 to 100,000 micrograms as a dosage amount, up to a total dose of about 1 gram, depending on the route of administration. Since the peptide compositions of the invention will eventually be
30 cleared from the bloodstream, re-administration of the compositions is indicated and preferred.

6. EXAMPLES

The following examples are presented by way of illustration of the present
35 invention, and are not intended to limit the present invention in any way.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

6.1. EXAMPLE 1

In this example, HIV-1 Pr55^{Gag} was used as bait in a yeast 2-hybrid screen and identified Tsg101, the product of a mammalian tumor susceptibility gene, Tsg101 (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* 85, 319-329), as a cellular protein that interacts with HIV-1 Gag.

5 The example demonstrates that Tsg101 interacted specifically with the p6 region of HIV-1 Gag both in vitro and in the cytoplasm of transfected cells. Two highly conserved Pro residues in the L domain within p6 were critical for Tsg101 binding. Moreover, the altered Ub-binding site in the UEV domain in Tsg101 as well as other residues unique to Tsg101 were determinants of interaction with Gag. These results implicate a specific component of

10 the cellular trafficking machinery in virus budding and maturation.

Ubiquitination appears to be involved in virus particle release from infected cells. Free ubiquitin (Ub), as well as Ub covalently bound to a small fraction of p6 Gag is detected in mature human immunodeficiency virus particles. The p6 region in the Pr55^{Gag} structural precursor polyprotein binds to Tsg101, a putative Ub regulator that is involved in

15 trafficking of plasma membrane-associated proteins. Tsg101 was found to interact with Gag in (i) a yeast 2-hybrid assay, (ii) *in vitro* co-immune precipitation using purified Pr55^{Gag} and rabbit reticulocyte lysate-synthesized Tsg101, and (iii) *in vivo* in the cytoplasm of COS cells transfected with *gag*. The PTAPP motif (or late (L) domain) within p6, which is required for release of mature virus from the plasma membrane, was the determinant for

20 binding Pr55^{Gag}. The N-terminal region in Tsg101, which is homologous to the Ubc4 class of Ub-conjugating (E2) enzymes, was the determinant of interaction with p6. Mutation of Tyr110 in 101, present in place of the active site Cys that binds Ub in E2 enzymes, and other residues unique to Tsg101 impaired p6 interaction indicating that features that distinguish Tsg101 from active E2 enzymes were important for binding the viral protein.

25 The results link L domain function in HIV to the Ub machinery and a specific component of the cellular trafficking apparatus.

Materials and Methods

30 **Plasmid construction.** Oligonucleotides and procedures used for PCR and mutagenesis to construct Pr55^{Gag} pl-p6, and Tsg101 GAL4-hybrids for expression in yeast; human Tsg101 for in vitro expression; and Pr55^{Gag} Δp6 for expression in mammalian cells are described hereinbelow and in Table 1.

Pr55^{Gag} and pl-p6 hybrids for expression in yeast. HIV-1 sequences were amplified

35 by PCR using plasmid gpVI as template to synthesize inserts for ligation into yeast

WO 02/094314

PCT/US02/15965

expression vectors *pGBT9* or *pMA424* and *pGAD424*. *pgpVI* encodes Pr55^{Gag} and part of Pol, and an inactivating mutation in the catalytic site of PR (D₃₅A) within Pol. The 5' end primer, oligo no.1 in Table 1, and the 3' end primer (no.2) were used to synthesize a PCR fragment of full-length gag. The primers annealed to nt 333 of gag and the end of the PR coding region, respectively. BamHI and BglIII sites were engineered in the insert for ligation into *pGBT9* and *pGAD424*. For the MA-CA insert, we used the same 5' end primer (no.1) and a 3' end primer (no.3) that annealed at position 1421 in the gag gene at the C-terminus of CA. These oligonucleotides contained the restriction sites BglIII and BamHI respectively. For the CA-p2-NC insert, a 5' primer (no.4) that annealed to the gag gene at position 730 at the N-terminus of CA and a 3' end primer (no.5) complementary to position 1673 of the gag gene at the C-terminus of p1 were used. The PCR product was cut with BglIII and ligated into the vector at that site. For the p1-p6 insert, a 5' end primer (no.6) that annealed to the gag gene at position 1636 and a 3' end primer (no.7) that annealed at position 2116 in the pci gene were used. The insert obtained spanned the p1-p6 region of Gag in the gag frame and the first ninety-nine amino acids of the pci frame. It lacked the frameshift site located in the p1 region upstream of nucleotide 1636 so that only expression of the gag frame was obtained. Both oligonucleotides contained BglIII sites. The Pr55^{Gag} insert was created by restriction digestion at the unique BglIII site. gag sequences were ultimately placed in the *pGBT9* vector background by transferring inserts from *pMA424* to *pGBT9* using the BamHI and Sall sites. Deletions and site-directed mutations in *pGBT9*-p1-p6 were created by mutagenesis using the Gene Editor (Promega). Mutagenic oligonucleotides (nos.8-15) were used according to the manufacturer's protocol. Mismatch regions, introduced for point mutations leading to amino acid changes or deletion mutations are underlined or indicated by "P", respectively. Double mutations were created using a second selection oligonucleotide (no.13) that obliterates a SnaBI restriction site within the vector. Resistance to SnaBI digestion selected for the mutant plasmids. The double mutant K_{487,493}R was synthesized using the second selection oligonucleotide and the K₄₈₇R mutagenic oligo (no.11) with the mutant K₄₈₇R as the template. The double mutant ΔPTAPP_{1,2} was synthesized using the second selection oligonucleotide and the ΔPTAPP₂ mutagenic oligo (no.9), with ΔPTAPP₁ as the template. Point mutations in the second ΔPTAPP₁ motif were synthesized from the mutant ΔPTAPP₁ using the second selection oligo and oligos nos.14 and 15, as indicated in Table 1.

Tsg101 hybrids for expression in yeast. Tsg101, as isolated from a B cell library in a pACT vector, was used as template for PCR of inserts for the yeast two-hybrid system. The inserts were engineered with EcoRI and Sall sites for ligation into *pGAD424*. For the

WO 02/094314

PCT/US02/15965

wild-type *tsg101* insert, the forward (5' end) primer (no. 16) was complementary to the beginning of the coding region of *Tsg101*. The reverse (3' end) primer was no. 17. Truncations at the 3' end were introduced using the *tsg101* forward primer (no. 16) and reverse primers nos. 18-20, all with translational stop codons and *Sall* sites introduced at the downstream terminus of the gene. Truncations at the 5' end were introduced by using the *tsg101* reverse primer (no. 17) and forward primers nos. 21-23, each with an *EcoRI* site introduced before the 5' terminus of the sequence. Site-directed mutations in *tsg101* were created using the Gene Editor and oligos nos. 24-28.

In vitro expression. Human *tsg101* was subcloned into the *BamHI* site of the pET3a vector under the control of the T7 promoter (Novagen). The insert was produced by PCR using pACT-*tsg101* as template with 5' primer no. 29, which anneals at the position corresponding to amino acid 10 in the protein, and 3' primer no. 30, which anneals to the C-terminus of the coding region.

Pr55^{TagApo} for expression in mammalian cells. *pgp-RRE-r* was used as a template to synthesize three point mutations in the first codon of *p6* by PCR, thereby converting it into a stop (ochre) codon. The 5' primer (no. 31) anneals to nucleotides 1637-1687 of BH10 *gag* and includes a unique *BglIII* site. The 3' primer (no. 32) anneals to nucleotides 2655-2682 in the *pol* gene downstream of a unique *EcoRV* site. The *pgp-RRE-r* plasmid and the fragment produced from PCR were cut with *BglIII* and *EcoRV*, and the desired fragments were ligated.

All constructs were confirmed by sequencing using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions.

See, e.g., Ehrlich, L. S., Fong, S., Scarlata, S., Zybarth, G. & Carter, C., 1996, *Biochemistry* 35, 3933-3943; Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. -L., Yeh, S. -H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.-H. & Elledge, S. J., 1993, *Genes Dev.* 7, 555-569; Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, *J. Virol.* 64, 2743-2750; Ratner, L., Hasteline, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K., et al., 1985, *Nature (London)* 313, 277-284.

Table 1 Oligonucleotides Used in PCR and Mutagenesis

Insert	Template	#	Sequence
<i>gag</i>	<i>pgpVI</i>	1	GGCTAGAAGGATCCGGATGGGTGCGAGAGCGTCAG (SEQ ID NO:1)
35 MA-CA		2	GAAGATCTATTAGAAGTTAAAGTGC (SEQ ID NO:6)
		1	
		3	GAAGATCTCACTACAAAACCTCTGCC (SEQ ID NO:7)

WO 02/094314		PCT/US02/15965	
CA-p2-NC	4	GGAAGATCTCCCCTATAGTGCAGAACATCC (SEQ ID NO:8)	
	5	CGGGATCCTTCCCTGGCCTTCCC (SEQ ID NO:9)	
p1-p6	6	GGGAAGATCTGGCCTTCC (SEQ ID NO:10)	
	7	GAAGATCTATTAGAAGTTAAAGTGC (SEQ ID NO:11)	
5 PTAPP ₁	pGBT9-p1p6	8	CAGAGCAGACCAGAG/TTTCTTCAGAGCAGACC (SEQ ID NO:12)
PTAPP ₂		9	CAGAGCAGACCAGAG/GAAGAGAGCTTCAGG (SEQ ID NO:13)
K ₄₃ R (AAG)		10	CCCCTCAGAGCCAGGAGCC (SEQ ID NO:14)
K ₄₃ R (AAG)		11	GCCGATAGACAGGGAAGTGTATC (SEQ ID NO:15)
(LXX) ₂		12	CCGATAGACAAGGAA/AACGACCCCTCGTCAC (SEQ ID NO:16)
K _{47, 49} R	pGBT9-p1p6 _{K47,49} R	11	
(TAC)		13	CATTTCTATA <u>T</u> GTAGTATATAG (SEQ ID NO:17)
10 PTAPP _{1,2}	pGBT9-p1p6	9	
	PTAPP ₁	13	
P ₂ A	pGBT9-p1p6	13	
	PTAPP ₁	14	GACCAGAG <u>GCA</u> ACAGCC (SEQ ID NO:18)
(CCA)		13	
P _{10,31} A		15	CAGAGCCAACAGCC <u>GAGCA</u> TTTCTTCAGAGC (SEQ ID NO:19)
15 (CCA,CCA)	pACT-tsg101	16	GAATTCATGGCGGTGTCGGAGAGC (SEQ ID NO:20)
tsg101		17	GTCGACTCAGTAGAGGTCAGTACTGAG (SEQ ID NO:21)
N-155		16	
		18	GTCGACTCATGCCTGGTATGGCGG (SEQ ID NO:22)
N-215		16	
		19	GTCGACTCAGGGACCAACAGTGGTCC (SEQ ID NO:23)
20 N-311		16	
		20	GTCGACTCAGTTTTTCAGACTGATTTTCC (SEQ ID NO:24)
139-C		17	
		21	GAATTCCTCCAGTCTTCTCTCGTCC (SEQ ID NO:25)
241-C		17	
		22	GAATTCGGATGAAGGAGAAATGGATCG (SEQ ID NO:26)
311-C		17	
25		23	GAATTCATGATATCGATGAAGTTATCATTCCC (SEQ ID NO:27)
K ₁₀₉ A (AAG)	pGAD-tsg101	24	GTTGATGCAAATGGGGCGATATATCTTCC (SEQ ID NO:28)
Y ₁₁₀ W (TAT)		25	AATGGGAAGATATGGCTTCTTATCTAC (SEQ ID NO:29)
Y ₁₁₃ V (TAT)		26	GGGAAGATATATCTTCTGCTCTACATGAATGG (SEQ ID NO:30)
W ₁₁₇ A		27	CCTTATCTACATGAAGCGAAACACCCACAG (SEQ ID NO:31)
(TGG)			
K ₁₁₈ A (AAA)		28	CTACATGAATGGGCAACCCACAGTCC (SEQ ID NO:32)
30 tsg101	pACT-tsg101	29	GGATCCATGGTGTCCAAGTAC (SEQ ID NO:33)
		30	GGATCCTCAGTAGAGGTCAGTACTGAG (SEQ ID NO:34)
gag p6		31	GGAAGATCTGGCCTTCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATT (SEQ I
			NO:35)
		32	CCATGATTGATAGATAAAGTATGTCTG (SEQ ID NO:36)

35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

2-hybrid assay. The PR55^{Gag}-Tsg101 interaction was identified by a yeast 2-hybrid screen using a human B cell library (Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.-H. & Elledge, S. J., 1993, *Genes Dev.* 7, 555-569). Vectors pGBT9 and pGAD424 encoding PR55^{Gag} or Tsg101 sequences as GAL4 activation and binding domain fusion proteins were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* Y153 using procedures previously described (Bartel, P. L. & Fields, S., 1995, *Methods Enzymol.* 254,241-263). Briefly, interactions were detected using a selection for Trp and Leu prototrophy followed by quantitative assay for *LacZ* activation. True positives were confirmed by demonstrating that they failed to interact with vectors carrying no insert or vectors carrying nonspecific genes (lamin). Proteins were identified after automated sequencing and matching the DNA to a protein sequence in the database. Mapping of the interacting domain was performed using vectors encoding the DNA-binding or activation domain of the yeast GAL4 transcriptional activator protein fused to truncations, deletions or point mutations of the proteins. Interactions were tested in both orientations: The text describes the interactions of the GAL4 DNA-binding domain-Gag or -p1-p6 fusion proteins with the GAL4 activation domain-Tsg101 fusion protein. Expression of all GAL4 fusions was checked by analysis of yeast cell extracts by SDS-gel electrophoresis and Western blotting with an antibody directed against the GAL4 binding domain (Upstate Biochemical) and GAL4 transactivation domain (Santa Cruz).

20

Cell culture, transfection, and preparation of cytoplasmic extracts. COS-1 cells were cultured in DMEM supplemented with fetal bovine serum to 60% confluency at 37°C. The cells were transfected using the FuGene 6 reagent (Roche) according to the instructions of the manufacturer. At 48 hr post-transfection, the cells were harvested into the media and collected by centrifugation. The pelleted cells were washed with cold PBS, allowed to swell in hypotonic buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM MgCl₂; 4°C) containing protease inhibitors, and disrupted with a Dounce homogenizer (type B pestle). The total lysate was spun for 10 min at 10,000 × g at 4°C to remove unbroken cells, nuclei, and mitochondria.

Immune capture assays. For *in vitro* assay of Tsg101-Gag interaction, Tsg101 was expressed in rabbit reticulocyte lysate (RRL) from a pET3a-*tsg101* construct in the presence of [³⁵S]-Met (DuPont NEN) using the TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega). Recombinant Pr55^{Gag} produced using the T7 RNA polymerase promoter and containing aa 1-10 of T7 gene 10 at the N-terminus, was purified from an expression strain of *E. coli* (BL21-DE3) as previously described (Ehrlich, L. S., Fong, S., Scarlata, S.,

35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

Zybarth, G. & Carter, C., 1996, *Biochemistry* 35, 3933-3943). Protein A agarose beads (Pierce), pre-washed with non-denaturing buffer (25mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 1% IGEPAL (Sigma)) containing protease inhibitors (Roche) were incubated with the appropriate antibody, washed again, and then pre-incubated with
5 Gag. Radiolabeled Tsg101 was then added, and the mixture incubated further at 4°C in a rotating device for 60 min. The beads were washed, suspended in SDS-PAGE loading buffer and heated at 95°C for 5 min. Cytoplasmic extracts prepared as described above were also examined for Tsg101-Gag interaction using the same procedure, except that the extract and the antibody-coated Protein A beads were maintained in 10 mM Tris, pH 7.4, 1
10 mM MgCl₂.

Protein detection. Proteins were separated by electrophoresis through a 12.5% SDS polyacrylamide gel. For detection of radiolabeled Tsg101 after electrophoresis, gels were fixed, incubated for 30 min in EN³HANCE (DuPont NEN) autoradiography enhancer for
15 gel fluorography and dried. Radioactive bands were visualized using imaging film (BioMax, Kodak). Gels with non-radioactive samples were transferred to nitrocellulose and analyzed by Western blotting. The following antibodies, as specified in the text, were used: anti-capsid (CA), and -CA₂ (rabbit polyclonal antibodies raised against native and denatured forms of the CA protein, respectively; Ebbets-Reed, D., 1996, in *Molecular Microbiology*,
20 State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY, pp. 209; Ehrlich, L. S., Agresta, B. E. & Carter, C. A., 1992, *J. Virol.* 66,4874-4883); anti-CA3 (mouse monoclonal antibody, NEN-DuPont); anti-p6 (rabbit polyclonal against the C-terminal 16 amino acids, S. Campbell, NCI-FCRDC); anti-nucleocapsid (NC, goat polyclonal, A. Rein, NCI-FCRDC); anti-T7 (Novagen); anti-Tsg101₁ (monoclonal, Santa Cruz); antiTsg101₂
25 (rabbit polyclonal, obtained from S. Cohen, Stanford U.). Proteins were visualized by chemiluminescence with Lumi-Light (Roche).

Results

30 *Pr55^{Gag} interacts with Tsg101 in the 2-hybrid assay.* HIV-1 Pr55^{Gag} was used as bait in the yeast 2-hybrid screen (Bartel, P. L. & Fields, S., 1995, *Methods Enzymol.* 254,241-263) to identify interacting proteins encoded in a cDNA library derived from human B cells (Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.-H. & Elledge, S. J., 1993, *Genes Dev.* 7, 555-569). Approximately 2 million transformants were
35 screened and 2 positives were isolated. Sequencing and matching to recorded entries in the

WO 02/094314

PCT/US02/15965

GeneBank database identified one interacting partner as cyclophilin B, which had been previously found to interact with Pr55^{Gag} (Luban, B., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. & Goff, S. P., 1993, *Cell* 73, 1067-1078). The other interacting protein was identified as the product of the human tumor susceptibility gene, Tsg101 (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* 85, 3 19-329; Li, L., Li, X., Francke, U. & Cohen, S. N., 1997, *Cell* 88, 143-154).

Identification of the region in Pr55^{Gag} that interacts with Tsg101. To localize the region of Pr55^{Gag} required for interaction with Tsg101, plasmids encoding N- or C-terminally-deleted-Pr55^{Gag} fused to the DNA-binding domain of the yeast GAL4 protein were tested for *LacZ* reporter gene activation using the 2-hybrid assay. Western analysis, using an antibody against the GAL4 DNA binding domain in the fusion proteins showed that the mutated and wild-type proteins were all expressed at comparable levels. As shown in FIG. 1A, the signal was lost upon deletion of the p1-p6 region of Pr55^{Gag} but was retained in plasmids encoding p1-p6. Thus, interaction with Tsg101 was determined by elements within p1-p6 of Pr55^{Gag}.

The p6 region contains the conserved motifs P₇T/SAP₁₀P₁₁ (numbering within p6 domain) and a repeating Leu sequence (LXX)₄. The (LXX)₄ motif is a critical determinant for Vpr binding although it may not interact directly (see, e.g., Frankel, A. D. & Young, J. A., 1998, *Annu. Rev. Biochem.* 67, 1-25). The PTAPP motif, or late (L) domain and, in particular, Pro_{10,11}, is the determinant of mature virus release during the final stages of assembly (Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, *J. Virol.* 69, 6810-6818). The PTAPP motif overlaps a region (P₅XP₇) that is critical for efficient packaging of *pol* gene products into the assembled virus particle (Dettenhofer, M. & Yu, X. F., 1999, *J. Virol.* 73, 4696-4704). The p6 region also contains Lys residues that are substrates for ubiquitination (Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1998, *J. Virol.* 72, 2962-2968). To determine whether any of the above conserved motifs were important for Tsg101 binding, deletion and point mutations were engineered into a plasmid encoding the p1-p6 region of Pr55^{Gag} and protein-protein interactions were measured using the 2-hybrid assay. The p6 region from the pBH10 clone used for these studies contained 2 copies of the PTAPP motif (Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. 3., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K. & et al., 1985, *Nature* 313, 277-284) and each of these was deleted independently. Deletion of the first PTAPP motif (aa 455-459, numbering

WO 02/094314

PCT/US02/15965

- within Gag) reduced β -galactosidase activity to a level that was ~50% that of wild-type protein binding (Fig. 1B). Deletion of the second PTAPP motif (aa 467-471), which is conserved among all HIV strains and most lentiviruses (Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S., Smith, R. F. & Pavlakis, G. N., 1995, Los Alamos National Laboratory,
- 5 Los Alamos, NM), reduced β -galactosidase activity to ~25% that of wild-type protein binding. Deletion of both motifs (aa 455 - 459 and 467 - 471) reduced β -galactosidase activity to the level obtained when the vector lacked an insert (<0.3%). Deletion of the first PTAPP-motif combined with substitution of Ala for Pro₇ in the second motif reduced enzyme activity to 25% that of wild-type. In the same context, substitution of Ala for
- 10 Pro_{10,11} blocked the interaction completely. Substitution of Arg for either or both of the Lys residues that serve as substrates for Ub modification (Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1998, *J. Virol.* 72,2962-2968) gave wild-type β -galactosidase activity indicating that the Ub substrates in p6 are not required for Tsg101 recognition.
- 15 Deletion of the (LXX)₄ repeat motif reduced β -galactosidase activity to ~55% of the wild-type level. The same reduction was obtained when the first PTAPP motif was removed in its entirety. The more deleterious impairment caused by deletion of the entire second highly conserved PTAPP motif or by mutation of Pro_{10, 11} in this motif suggest that it is the major determinant of Tsg101 binding.
- 20
- Tsg101 binds to Pr55^{Gag} in vitro.** To confirm and extend our observations with the 2-hybrid assay, *in vitro* co-immune precipitation studies were conducted using unlabeled bacteriophage T7 protein-tagged recombinant Pr55^{Gag} expressed in bacteria (Ehrlich, L. S., Fong, S., Scarlata, S., Zybarth, G. & Carter, C., 1996, *Biochemistry* 35, 3933-3943.) and
- 25 [³⁵S]-Met-labeled mouse or human Tsg101 expressed in RRL. Mouse (obtained from S. Cohen, Stanford U.) and human Tsg101 (from the B cell library) are 94% identical and were used interchangeably in these assays. The radiolabeled protein shown in Fig. 2A (lane 1) migrated at the molecular weight expected for Tsg101(391 amino acids, ~43 kDa). The protein was detected consistently as a doublet, perhaps due to internal initiation at Met₁₀.
- 30 The protein was also sometimes detected as a doublet in cytoplasmic extracts. Tsg101 was captured by Protein A-coated beads on which antibodies directed against the T7 tag, CA, or p6 domains had been immobilized and pre-incubated with Pr55^{Gag} (lanes 3, 7, 8, and 9). Beads not preincubated with Gag (lanes 2, 4, 5, 6) or preincubated with Gag in the absence of antibody did not capture Tsg101. The anti-p6 antibody recognizes an antigenic site in the
- 35 C-terminal 16 residues of the protein (including the (Leu-X-X)₄ repeat). The demonstration

WO 02/094314

PCT/US02/15965

that the Pr55^{Gag} bound to this anti-p6 antibody was still able to capture Tsg101 indicates that the Tsg101 binding region in p6 was exposed. This is consistent with the 2-hybrid assay result, which showed that the C-terminal half of the p6 region was not a Tsg101 binding site. In competition assays, addition of a 5-fold molar excess of a peptide containing the PTAPP motif (ALQSRPEPTAPPEES) caused a 2.2-fold reduction in Tsg101 capture by Pr55^{Gag}. The limited solubility of the peptide precluded testing at higher concentrations. In contrast, no change was detected with a 5-fold molar excess of a peptide containing the mutant LLAPP sequence, indicating that the effect of the PTAPP motif was specific. Western analysis with an anti-CA monoclonal antibody confirmed the presence of full-length Pr55^{Gag} on the beads coated with the anti-T7, -CA and -p6 antibodies that captured Tsg101 (Fig. 2B, lanes 1 - 4). The results of the immune capture assay demonstrate that Tsg101 interacts specifically and stably with Pr55^{Gag} *in vitro* through interaction with the L domain.

Tsg101 binds Pr55^{Gag} *in vivo*. To determine if Tsg101 and Gag associate during viral assembly, COS cells expressing Gag were examined for Tsg101-Gag complexes by co-immune precipitation assays. Plasmid *pgp-RRE-r* expresses the HIV-1 Gag and Gag-Pol polyproteins as well as Vif under the control of the SV40 late promoter (Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, *J. Virol.* 64, 2743-2750). Expression requires the Rev protein, which is provided in trans by expression of pCMV-*rev* (Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, *J. Virol.* 64, 2743-2750). To ensure the specificity of the Tsg101-Gag interaction in the cytoplasm, a Gag mutant that lacked the p6 domain was included. Cytoplasmic extracts prepared from cells transfected with *rev* alone, *rev*, *gag*, and *pol*, or *rev*, *gagΔp6*, and *pol* were incubated with anti-Tsg101 mouse monoclonal antibody and the immune-precipitate was examined for Gag-related proteins by Western blotting with a goat polyclonal antibody against the NC domain. First, the total cytoplasmic extract was examined (Fig. 3A). The anti-NC antibody recognized Pr55^{Gag}, an 18 kDa NC-related protein, and NCp7 in the extract prepared from cells expressing the wild-type Gag protein (lane 2). The 18 kDa band was identified as NC-p6 based on its reactivity with both anti-NC and anti-p6. The anti-NC antibody also recognized NCp7 and a protein that migrated at ~49 kDa in the extract prepared from cells expressing the mutant (lane 3). The latter is the molecular weight expected for the Pr55^{GagΔp6} precursor protein. Consistent with this conclusion, the 49 kDa protein was not detected in extracts prepared from cells expressing Rev alone (lane 1) or the wild-type Gag protein (lane 2). Immune-precipitation using a monoclonal antibody against Tsg101

WO 02/094314

PCT/US02/15965

precipitated the wild-type Gag precursor and the NC-p6 protein, but not NCp7 (Fig. 3B, lane 2) or Gag lacking the p6 domain (lane 3). Re-probing the same blot with another anti-Tsg101 antibody confirmed the presence of the cellular protein in the immune-precipitates of all three extracts (lanes 4-6). In a reciprocal experiment, anti-CA antibody co-immune-precipitated Tsg101 from extracts of cells expressing Gag (Fig. 3C, lane 2) but not extracts expressing Rev alone (lane 1). Re-probing the same blot with another anti-CA antibody confirmed the presence of Gag on the beads that captured Tsg101 (lane 4). Immune precipitation with an irrelevant antibody (rabbit anti-mouse IgG) did not precipitate Gag or Tsg101. The results indicate that the interaction between Tsg101 and Gag occurs in the cytoplasm of cells containing the viral protein and demonstrate that the p6 region of the Gag protein specifically directs the interaction.

Identification of the region in Tsg101 that interacts with Pr55^{Gag}. The Tsg101 protein contains an N-terminal E2-like (UEV) domain with homology to the Ub-conjugating (Ubc) 4 subgroup of E2 enzymes (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* 75,467-469). It also contains central Pro-rich and coiled-coil regions, and a C-terminal steadiness box (SB) that controls its steady state level (Fig. 4; Feng, G. H., Lih, C. J. & Cohen, S. N., 2000, *Cancer Res.* 60, 1736-1741). Based on recent findings implicating Ub in Gag assembly (Ott, D. E., Coren, L. V., Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L. O. & Henderson, L. E., 1998, *J. Virol.* 72,2962-2968; Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Binnik, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13057-13062; Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13063-13068; Vogt, V. M., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12945-12947; Ott, D. E., Coren, L. V., Chertova, E. N., Gagliardi, T. D. & Schubert, U., 2000, *Virology* 278, 111-121; Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13069-13074), it was of interest to determine which region of Tsg101 was recognized by the viral protein. To investigate this, the yeast 2-hybrid system was used to localize the region in Tsg101 required for interaction with Pr55^{Gag}. Plasmids encoding N- or C-terminally-truncated Tsg101 fused to the activation domain of the GAL4 protein were assayed for the ability to bind p1-p6 fused to the GAL4 DNA-binding domain. As shown in Figure 4A, assessment of reporter gene activation indicated that p6-Tsg101 interaction was maintained in fragments that retained the N-terminal 155 amino acids, but lost in the mutants that lacked this region, suggesting that the N-terminal region was the minimal

WO 02/094314

PCT/US02/15965

determinant of binding. Western analysis showed comparable expression of the interacting and non-interacting fragments, thus supporting this conclusion. Curiously, the N-terminal 155-, 215-, and 311- residue fragments bound p6 comparably in a qualitative assay, but the 311-residue fragment interacted to a significantly greater extent in the quantitative assay

5 (Figure 4A). This difference did not reflect a binding site downstream of aa155 since a fragment extending from aa139 to the C-terminus of Tsg101 failed to interact. Moreover, no binding was detected in *in vitro* capture assays using a hybrid protein comprised of GST fused to Tsg101 residues 167-374. Optimal presentation of the p6 binding region in the N-terminal 155 residue fragment may require downstream sequences. In this regard, Tsg101

10 resembles class II E2 enzymes with a conserved catalytic core domain of ~150 residues and an extra C-terminal extension attached to this core domain that is speculated to play a role in substrate recognition (Jentsch, S., Seufert, W., Sommer, T. & Reins, H.A., 1990, *Trends Biochem. Sci.* 15, 195-198; Li, L. Liao, J., Ruland, J., Mak, T.W. & Cohen, S.N., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1619-1624).

15 In E2 enzymes including Ubc4, Ub is conjugated to an active site Cys. In Tsg101, Tyr replaces this Cys residue. However, 8 of 14 residues flanking this Tyr are conserved in both Tsg101 and Ubc4 (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* 75,467-469; Fig. 4B). To determine whether recognition by the p6 domain was due to amino acids unique to Tsg101,

20 point mutations were engineered into the active site homologue in the full-length protein and interaction with p6 was tested in the 2-hybrid assay. Western analysis using an antibody against the GAD moiety in the fusion proteins showed that the mutated and wild-type proteins were all expressed at comparable levels. Mutation of Trp₁₁₇, which is conserved in all classes of E2 and UEV proteins and believed to demarcate the C-terminus

25 of the active site region (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; Hershko, A. & Ciechanover, A., 1998, *Annu. Rev. Biochem.* 67,425-479) eliminated binding completely, indicating that this residue is important in both Tsg101 and Ubc4. Consistent with the hypothesis that residues unique to Tsg101 determined L domain interaction, substitution of 3 of the 4 non-conserved residues tested impaired p6 binding (Fig. 4B).

30 Conservative substitution of Trp for Tyr₁₁₀ reduced p6 interaction to 31% of wild-type. Substitution of the hydrophobic amino acid Val for Tyr₁₁₃ reduced binding to 33% of wild-type. Substitution of Ala for Lys₁₁₈ reduced binding to a lesser extent.

To further test the hypothesis, we examined residues in Tsg101 that are not conserved in E2 enzymes, but align with regions previously shown to determine substrate

35 recognition in the Ubc4 subgroup (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.*

WO 02/094314

PCT/US02/15965

16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* 75,467-469; Oughtred, R., Bedard, N, Vrielink, A. & Wing, S.S., 1998, *J. Biol. Chem.* 273, 18435-18442). Residues 49 and 125 in Ubc4 were found to determine the substrate specificity of structurally homologous, but functionally distinct Ubc4 isoforms (Oughtred, R., Bedard, N, Vrielink, A. & Wing, S.S., 1998, *J. Biol. Chem.* 273, 18435-18442). Residue 5 49 aligns with Tsg101 Thr₆₉ (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; Sancho, E. Vila, M.R., Sanchez-Pulido, L., Lozano, 3.3., Paciucci, R., Nadal, M., Fox, M., Harvey, C. Bercovich, B., Loukili, N., Ciechanover, A., Lin, S.L., Sanz, F. Estivill, X., Valencia, A. & Thomson, T. M., 1998, *Mol. Cell Biol.* 18, 576-589) or Asn₆₉ 10 (Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* 75,467-469). Residue 125 aligns with Ser₁₄₉ (24) or Tyr₁₅₀ (Sancho, E. Vila, M.R., Sanchez-Pulido, L., Lozano, 3.3., Paciucci, R., Nadal, M., Fox, M., Harvey, C. Bercovich, B., Loukili, N., Ciechanover, A., Lin, S.L., Sanz, F. Estivill, X., Valencia, A. & Thomson, T. M., 1998, *Mol. Cell Biol.* 18, 576-589). We therefore substituted Ala for ₆₉Thr-Tyr-Asn₆₉ and ₁₄₉Ser-Tyr₁₅₀ and 15 determined the effect on binding. As shown in FIG. 4C, mutation of ₆₉Thr-Tyr-Asn₆₉ reduced binding to 5% of the wild-type level. Mutation of ₁₄₉Ser-Tyr₁₅₀ had no effect. Western blotting confirmed that the mutants were expressed at wild-type levels. The results are consistent with the conclusion that the interaction of Gag with Tsg101 is based on specific recognition and support the suggestion that the N-terminal E2-like domain of 20 Tsg101 is the minimal determinant of p6 binding.

Discussion

In this example, the interaction of Tsg101 with HIV-1 Pr55^{Gag} *in vitro* and *in vivo* is 25 described. The N-terminal half of Tsg101, which contains the determinant of Gag binding, is homologous to Ub-conjugating E2 enzymes (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* 75,467-469; Jentsch, S., Seufert, W., Sommer, T. & Reins, H.A., 1990, *Trends Biochem. Sci.* 15, 195-198). The C-terminal half of Tsg101 has a coiled-coil domain that can interact with a 30 cytoplasmic phosphoprotein, stathmin, implicated in microtubule dynamics (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* 85, 319-329), and contains a highly conserved sequence that regulates the steady state level of the protein (Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, *J. Virol.* 64, 2743-2750). Based on its structural features, Tsg101 has been speculated to be (i) a dominant-negative Ub regulator (Koonin, E. V. & Abagyan, 35 R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; Ponting, C. P., Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol.*

WO 02/094314

PCT/US02/15965

Med. 75,467-469); (ii), a transcriptional regulator (Sun, Z., Pan, 3., Hope, W. X., Cohen, S. N. & Balk, S. P., 1999, *Cancer* 86,689-96); (iii), a regulator of the cell cycle (Xie, W., Li, L. & Cohen, S. N., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1595-1600; Zhong, Q., Chen, Y., Jones, D. & Lee, W. H., 1998, *Cancer Res.* 58,2699-2702); and (iv), a regulator of

5 membrane protein trafficking (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1,242-258; Lemmon, S. K. & Traub, L. M., 2000, *Curr. Opin Cell Biol.* 12,457-466). It is not clear whether these apparently diverse roles reflect independent or related functions of the protein. Furthermore, how participation in these functions may relate to Tsg101's role in the ubiquitination process is unknown.

10 The observation that Tsg101 interacts with HIV-1 Gag in mammalian cells suggests that the interaction is relevant to the viral life cycle. It is noted that the interaction was much more efficient in cytoplasmic extracts than *in vitro*, perhaps suggesting a need for stabilizing cellular factors or a particular Gag assembly state. The fact that the L domain-containing p6 region of the protein is required for binding implicates the interaction

15 in the late budding function. The results described in this example indicate that deletion of the L domain PTAPP motif prevents the interaction of Gag with Tsg101. This Pro-rich sequence is highly conserved in all lentiviruses except equine infectious anemia virus (Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S., Smith, R. F. & Pavlakis, G. N., 1995, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM). It is duplicated in some isolates of HIV-1,

20 HIV-2 and simian immunodeficiency virus (SIV). The human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-I) and the Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) Gag proteins contain both the lentivirus motif (PT(S)AP) and the (P)PPPY motif, the functionally interchangeable avian retrovirus counterpart (Wills, J. W., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, *J. Virol.* 68,6605-6618; Parent, L.J., Bennett, R.P., Craven, R.C., Nelle,

25 T.D., Krishna, N.K., Bowzard, J.B., Wilson, C.B., Puffer, B.A., Montelaro, R.C. & Wills, J.W., 1995, *J. Virol.* 69, 5455-5460). Studies indicating that the PY and PTAP motifs recruit the Ub machinery and that certain proteasome inhibitors cause alterations in viral particle budding similar to defects resulting from mutations in PTAPP and PY support the possibility that the cell's ubiquitination machinery is linked to viral assembly (Schubert, U.,

30 Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13057-13062; Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13063-13068; Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13069-13074). However, it is unclear at this time whether this link reflects a

35 direct or indirect involvement of Ub: On one hand, mutation of the Lys residues in the p6

WO 02/094314

PCT/US02/15965

domain that are substrates for Ub modification has no apparent effect on virus assembly or release (Ott, D. E., Coren, L. V., Chertova, E. N., Gagliardi, T. D. & Schubert, U., 2000, *Virology* 278, 111-121). On the other hand, covalent linkage of Ub to Gag was shown to rescue the defect in release caused by proteasome inhibitors (Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13069-13074). Perhaps other Lys residues
5 serve as Ub substrates when the preferred sites in p6 are not available.

The notion that Tsg101 functions as a dominant-negative Ub regulator is based on the fact that Tsg101 lacks the active site Cys residue that conjugates Ub in active E2 enzymes (Koonin, E. V. & Abagyan, R. A., 1997, *Nat. Genet.* 16,330-331; Ponting, C. P.,
10 Cai, Y.-D. & Bork, P., 1997, *J. Mol. Med.* 75,467-469). The ubiquitination process requires the sequential action of two or three enzymes (see, e.g., Hershko, A. & Ciechanover, A., 1998, *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479). E1, an Ub-activating enzyme, binds Ub through a thioester bond, then transfers it to E2. E2 enzymes can function alone or in conjunction with E3 Ub-protein ligases to attach Ub to lysine residues in substrate proteins. Substrates
15 modified by polyubiquitination are degraded by the proteasome; monoubiquitination serves as a signal for endocytosis (Shili, S. C., Sloper-Mould, K. E. & Hicke, L., 2000, *EMBO J.* 19, 187-198). Although the active site Cys is not conserved in Tsg101, our results suggest that this region functions directly or indirectly in binding of the HIV-1 L domain. It is noteworthy that the residues in the altered Ub-binding site in Tsg101 that contribute to L
20 domain PTAPP binding are Tyr and Trp residues flanked by positively charged Lys residues (Fig. 4B). Aromatic amino acids flanked by charged residues are critical binding determinants for protein binding motifs like SH3 and WW domains. SH3 domains bind Pro-rich sequences having the consensus PXXP, like PTAPP; WW domains interact with PPXY motifs (Kay, B. K., Williamson, M. P. & Sudol, M., 2000, *FASEBJ.* 14, 231-241;
25 Gamier, L., Wills, J. W., Verderame, M. F. & Sudol, M., 1996, *Nature* 381, 744-745). Moreover, as the amino acids surrounding these aromatic residues in Tsg101 are conserved in active E2 enzymes, Tsg101 may maintain an E2-like ability to present Gagp6 to interacting E3 enzymes, as suggested for E2-Ub-E3 interacting complexes (Laney, J. D. & Hochstrasser, M., 1999, *Cell* 97, 427-430; Nuber, U. & Scheffli, M., 1999, *J. Biol. Chem.*
30 274, 7576-7582). If so, the Tsg101-Gag-complex may associate with an active E3 enzyme to facilitate an event related to L domain function. Furthermore, Tsg101 has been shown to function in membrane protein transport (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1, 242-258; Lemmon, S. K. & Traub, L. M., 2000, *Curr. Opin Cell Biol.* 12,457-466). Its involvement in regulation of vesicles that are required for recycling of
35 membrane-associated proteins (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000,

WO 02/094314

PCT/US02/15965

Traffic 1, 242-258; Bishop N and Woodman P., 2001, *J Biol Chem.* 276:11735-42) may permit it to play a role in Gag trafficking to the site of particle maturation and release.

The finding that HIV-1 Gag binds through the E2-like domain in Tsg101 suggests several hypotheses. The interaction of Gag with Tsg101 may be adventitious, based on Tsg101's similarity to active E2 enzymes. Alternatively, if Ub is required for assembly as suggested (Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bannink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13057-13062; Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13063-13068; Patnaik, A., Chau, V. & Wills, S. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13069-13074), Tsg101 may function as a cellular defense mechanism that prevents Gag interaction with active E2 enzymes. It is also possible that Tsg101 is recruited by the virus as a chaperone to block Gag polyubiquitination and subsequent degradation by the proteasome. This idea is supported by the fact that cyclin-specific E2 enzymes with Ser substituted for the active Cys are, in fact, dominant negative inhibitors of cyclin destruction (Townsend, F. M., Aristarkhov, A., Beck, S., Hershko, A. & Ruderman, J. V., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94,2362-2367). Finally, Tsg101 may function like the yeast UEV Mms2 protein, which alters the function of interacting E3 proteins (Hofmann, R. M. & Pickart, C. M., 1999, *Cell* 96, 645-653). Interestingly, the L domain of the Ebola virus matrix protein interacts with Nedd4, an E3 Ub protein ligase (Harty, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huijbregtse, J. & Hayes, F. P., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13871-13876). The apparent conservation of L domain interaction with cellular proteins that affect Ub modification suggests that the involvement of the Ub machinery is a highly conserved event in virus assembly and particle release both within and outside the retrovirus family.

25

6.2. EXAMPLE 2

Example 1 demonstrates that the PTAPP motif or L domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), which is located in the C-terminal p6 region of the Gag precursor polyprotein, was found to bind to the protein product of the *tsg101* gene. Sequence analysis has suggested, and experimental evidence has shown, that Tsg101 can function in both the modulation of transcription and the inhibition of ubiquitination and protein decay. The latter effects are mediated by an N-terminal region that contains a ubiquitin (Ub) conjugase (E2)-like domain, but lacks an active site Cys residue crucial to Ub conjugation. This domain of Tsg 101 is the minimal binding region required for its interaction with HIV-1 Gag. The involvement of Tsg101 in endosomal trafficking, together

35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

with its ability to interact with HIV-1 Gag *in vitro* and in mammalian cells as shown in example 1, and the finding that the L domain in the p6 region of Gag is specifically required for binding, have led to studies in this example to investigate the effects of Tsg101 on the late budding function responsible for mature virus release from the cell surface.

5 In this example, it is shown that the release of mature HIV-1 particles is reduced in murine SL6 cells, which are deficient in Tsg101 (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* 85, 319-329), as well as in primate COS-1 cells that overproduce the wild-type Tsg101 protein. It has also been shown that SL6 cells are defective in sorting of multiple surface-bound proteins (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* 1, 242-258).
10 Mutation of Tsg101 in a region necessary for regulation of Tsg101 protein decay, but not for Gag binding (see Example 1), partially reversed the inhibitory effects of Tsg101 over-expression on virus release. The effects of Tsg101 overproduction required the presence in Gag of sequences that interact with Tsg101. The results in this example provide evidence that the Tsg101 protein specifically regulates the transport and maturation of HIV-1
15 particles through its interaction with the L domain of Gag, implicating Tsg101 function in productive virus assembly.

The p6 region in Pr55^{Gag}, the structural precursor polyprotein encoded by human immunodeficiency virus type I (HIV-1), directs release of mature virus-like particles from the plasma membrane of *gag*-transfected cells. Example 1 demonstrates that Gag^{p6} binds to
20 Tsg101, a protein that affects trafficking of membrane-associated proteins. In this example, it is demonstrated that Tsg101 deficiency induced by functional inactivation of Tsg101 mRNA by an antisense transcript prevented Gag protein maturation in a cellular fraction enriched in plasma membranes and reduced virus particle release, suggesting that Tsg101 is required for normal Gag trafficking and processing. Paradoxically, overexpression of
25 Tsg101 also inhibited the release of virus particles but did not affect exit of Gag_{Δp6}, which does not bind Tsg101. Inhibition was reduced by mutation of the Tsg101 C-terminal steadiness box (SB) domain, which is required for proper autoregulation of Tsg 101 decay. However, while the SB mutation decreased the ability of overexpressed Tsg101 to interfere with virus particle release, maturation of the particle-associated Gag precursor protein was
30 defective. The results in this example suggest that Tsg101 has a role in both the maturation and release of HIV particles, potentially providing a novel target for interfering with HIV-1 production.

Materials And Methods

35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

Plasmids. *pgp-RRE-r* (Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, *J. Virol.* **64**, 2743-2750), encoding wild-type *gag*, *pol*, and *vif* was used as a template to synthesize Pr55 Gagap6 by engineering three point mutations in the first codon of p6 by PCR, converting it to a stop (ochre) codon. The 5' primer

5 (GGAAGATCTGGCCCTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATT, SEQ ID NO:37) anneals to nt 1637 to 1687 of BH10 gag (Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K. & et al., 1985, *Nature* **313**, 277-284) and includes a unique BglII site. The 3' primer (CCATGTATTGATAGATAACTATGTCTG, SEQ ID NO:38) anneals to nt 2655 to 2682

10 in the *pol* gene downstream of a unique EcoRV site. The *pgp-RRE-r* plasmid and the fragment produced from PCR were cut with BglII and EcoRV and the desired fragments were ligated. The mutation was confirmed by sequencing with ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA). pIND-hTsg101-FLAG (wild-type human Tsg101) and pIND-SD5-59-FLAG, in which Gly

15 replaces amino acids 348-351, are described (Feng, G.H., Lih, C.-J., & Cohen, S.N., 2000, *Cancer Research* **60**, 1736-1741).

Cell culture, transfection, and preparation of cytoplasmic extracts. COS-1 cells were cultured in DMEM supplemented with fetal bovine serum and antibiotics to 60%

20 confluency at 37°C. The cells were transfected with wild-type or mutated pIND-hTsg101-FLAG, pVgRXR, pCMV-*rev*, and wild-type or mutated *pgp-RRE-r* in various combinations using the FuGene 6 reagent (Roche). *Rev* is a HIV-1-encoded protein required for expression of *gag* and *pol* (Frankel, A. D. & Young, J. A., 1998, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 1-25). PVgRXR encodes both monomers of a heterodimeric ecdysone-inducible receptor that,

25 together with the hormone, form a transcriptional activator complex that binds the promoter driving *tsg101* expression. Treating the transfected cells with the ecdysone analogue, pronasterone, for 24 hr at 24 hr after transfection induced expression of Tsg101. At 48 hr post-transfection, the cells were harvested by scraping into the media and collected by centrifugation. The pelleted cells were washed three times with cold PBS, swollen in 1 ml

30 of cold hypotonic buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM MgCl₂) containing protease inhibitors (15 min, 4°C) and disrupted with 35 strokes of a Dounce homogenizer (type B pestle). The lysate was spun 10 min, 1,000 x g at 4°C to remove unbroken cells, nuclei, and mitochondria. NIH 3T3 and SL6 cells were maintained at 37°C in DMEM supplemented with antibiotics and fetal bovine serum. SL6 cells are 3T3 derivatives that have undergone

35 functional inactivation of the *tsg101* gene by antisense RNA using a previously described

WO 02/094314

PCT/US02/15965

random homozygous knockout (RHKO) procedure (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* 85, 319-329). These cells were transfected with pHIV-AP Δ env (Sutton, R.E., Wu, H.T., Rigg, R., Bohnlein, E. & Brown, P.O., 1998, *J. Virol.* 72, 5781-5788) and, where indicated in the text, with pME VSV G (Sutton, R.E., Wu, H.T., Rigg, R., Bohnlein, E. & Brown, P.O., 5 1998, *J. Virol.* 72, 5781-5788) using the FuGene 6 reagent. Fractionation into total cytoplasm (S1), nuclei/Golgi-enriched (P1), soluble (S100) and plasma membrane-enriched (P100) fractions was performed as described (L. Alland, S. M. Peseckis, R. E. Atherton, L. Berthiaume & Resh, M.D., 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 16701-16705). Virus particles were isolated from culture supernatant passed through a 0.45 μ m filter by ultracentrifugation 10 through a cushion of 20% sucrose at 30,000 rpm for 80 min at 4°C (Beckman SW41 rotor). The pelleted viral particles were resuspended in 1 ml of phosphate buffered saline by gentle shaking at 4°C. Infectivity of VSV G pseudotyped virus preparations was assessed using the MAGI assay (Vodicka, M.A., Goh, W.C., Wu, L.I., Rogel, M.E., Bartz, S.R., Schweickart, V.L., Raport, C., & Emerman, M., 1997, *Virol.* 233, 193-198).

15
Immunoprecipitation assay. Protein A agarose beads (Pierce), pre-washed with non-denaturing hypotonic (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM MgCl₂) buffer containing protease inhibitors (Roche), were incubated with the appropriate antibody, added to cytosolic extracts and rotated at 4°C for 60 min. Immunoprecipitates were washed in hypotonic 20 buffer, boiled in SDS sample buffer with 5% mercaptoethanol, resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with the antibodies indicated in the text.

Protein detection. Proteins were separated by electrophoresis through 12.5% SDS-polyacrylamide gels. Following electrophoresis, the gels were transferred to nitrocellulose 25 and analyzed by Western blotting. The following antibodies were used, as specified in the text: anti-Tsg101 mouse monoclonal antibody (Santa Cruz, Inc); anti-Tsg101 rabbit polyclonal antipeptide antibody raised against amino acids 383-391; anti-FLAG mouse monoclonal (obtained from Sigma); anti-CA rabbit polyclonal antibody raised against a native form of the CA protein (Ehrlich, L.S., Krausslich, H.-G., Wimmer, E. & Carter, C.A., 30 1990, *AIDS & Hum. Retro.* 6, 1169-1175.); anti-CA mouse monoclonal antibody (NEN-DuPont); anti-p6 rat monoclonal antibody (ABI). Proteins were visualized by chemiluminescence using Lumi-Light reagents (Roche).

Results
35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

Effect of Tsg101 deficiency on virus production. Example 1 has demonstrated that Tsg101 associates specifically with the L domain in HIV-1 Pr55 Gag⁶, a region that directs exocytosis of mature viral particles from infected cells (Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, *J. Virol.* **69**, 6810-6818). To investigate the role of this interaction in viral production, the effect of modulating *tsg101* expression on viral particle release was determined. As an initial approach, virus production was examined in a NIH 3T3-derived cell line (SL6) in which Tsg101 expression has been reduced to ~30% of normal levels using an antisense strategy (Li, L. & Cohen, S. N., 1996, *Cell* **85**, 319-329).

For these experiments, Gag and all of the other viral proteins except Nef and Env were expressed from pHIV-AP Δ env (Sutton, R.E., Wu, H.T., Rigg, R., Bohnlein, E. & Brown, P.O., 1998, *J. Virol.* **72**, 5781-5788) and the virus particles released into the media were assessed by Western blotting. pHIV-AP Δ env contains the human placental alkaline phosphatase gene in place of the *nef* gene and the *env* gene has been deleted. Growth conditions were identified to obtain cell cultures matched for extent of confluency as measured by total protein staining and Western blot analysis of specific subcellular compartment markers. In control experiments, it is ascertained that SL6 was transfected as efficiently as 3T3 using the Fugene6 reagent. Cytoplasmic (S1) extracts prepared from matched cultures of transfected parental and mutant cells and exhibiting total protein values within +/- 0.01 μ g of each other showed identical Coomassie blue stained protein patterns (Fig. 5A, lanes 1, 2) and comparable expression of Na⁺K⁺ATPase and actin (lanes 3,4). In contrast, as previously reported, SL6 cells accumulated Tsg101 at ~30% the level of the parental cells, as determined by comparative semi-quantitative Western analysis using an anti-Tsg101 monoclonal.

Analysis of cell-associated Gag protein in 3T3 and SL6 cells. To determine the effect of Tsg101 deficiency on the intracellular accumulation of Gag, the transfected cells were subjected to differential centrifugation and the amount of viral protein was assessed in the S1 lysate and in subcellular fractions. The S1 lysate prepared from transfected 3T3 cells, but not mock-treated cells, contained mature CA protein (FIG. 5C, lanes 1, 2), which accumulated in the plasma membrane-enriched P100 fraction (*inset* to FIG. 5C). This fraction was identified by localization of Na⁺K⁺ATPase, an integral plasma membrane protein (see, e.g., L. Alland, S. M. Peseckis, R. E. Atherton, L. Berthiaume & Resh, M.D., 1994, *J. Biol. Chem.* **269**, 16701-16705). In contrast, no mature CA was detected in the S1

WO 02/094314

PCT/US02/15965

fractions prepared from mock-treated or transfected SL6 cells (FIG. 5C, lanes 3, 4). Further analysis of the S1 and P1 fractions from the SL6 cells using an antibody that recognizes the Gag precursor confirmed the absence of virus-specific protein in the S1 fractions prepared from these untreated or transfected SL6 cells (FIG. 5D, lanes 1,2). In contrast, the antibody
5 revealed the full-length Gag precursor in the P1 fraction (lane 4), which is enriched in filamentous actin-, Golgi complex-, and nuclear proteins (see, e.g., L. Alland, S. M. Peseckis, R. E. Atherton, L. Berthiaume & Resh, M.D., 1994, *J. Biol. Chem.* **269**, 16701-16705). These results suggest that the block to virus release in SL6 cells resulted from defective transport of the Gag precursor to the plasma membrane where it normally
10 assembles, and consequently implicate Tsg101 in this transport function.

Effect of Tsg101 overproduction on release of HIV-1 particles. The steady-state level of Tsg101 protein is maintained within a narrow range during cell growth by a post-translational mechanism involving protein degradation (Feng, G.H., Lih, C.-J., & Cohen, S.N., 2000, *Cancer Research* **60**, 1736-1741). Overexpression of a FLAG-tagged Tsg101
15 protein leads to accelerated turnover of both the endogenous and FLAG-tagged protein (Feng, G.H., Lih, C.-J., & Cohen, S.N., 2000, *Cancer Research* **60**, 1736-1741). Use of a pIND-h-Tsg101-FLAG construct (Feng, G.H., Lih, C.-J., & Cohen, S.N., 2000, *Cancer Research* **60**, 1736-1741) enables inducible expression of FLAG-tagged Tsg101 under
20 control of a modified promoter containing *Drosophila* ecdysone-responsive DNA elements. In preliminary experiments using the ecdysone analog, pronasterone inducer (hereinafter "pa"), the conditions that allowed to overproduce FLAG-tagged Tsg101 without drastic perturbation of the steady-state level of endogenous protein was identified. As shown in Figure 6A, Western analysis using anti-Tsg101 antibody detected an endogenous protein
25 band migrating at the expected ~46 kDa position and increasing amounts of a protein that migrated more slowly. Re-probing the blot with antibody against the eight residue FLAG sequence confirmed that the more slowly migrating protein was FLAG-tagged Tsg101 derived from expression of the induced plasmid encoding the protein.

As previously demonstrated, plasmid *pgp-RRE-r*, when co-expressed in COS cells
30 with the HIV-1 regulatory protein, Rev, allows assembly and release of virus-like particles that are indistinguishable from mature HIV-1 (Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L. & Rekosh, D., 1990, *J. Virol.* **64**, 2743-2750, Ebbets-Reed, D., Scarlata, S. & Carter, C.A. *Biochem.* **35**, 14268-14275). To ensure the specificity of any Tsg101-related effects we observed, the HIV-1 Gag Δ p6 mutant was examined in parallel. The mutated Gag protein (*i*)
35 lacks the p6 domain that binds Tsg101; (*ii*) assembles particles that fail to complete

WO 02/094314

PCT/US02/15965

proteolytic maturation; and (iii) is released inefficiently (see, Example 1; Göttinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3195-3199; Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O., 1995, *J. Virol.* 69, 6810-6818). It was found that particles containing Gag Δ p6 are released at 50% wild-type efficiency, as measured by comparing accumulation in the cytoplasm and media. The effect of increasing amounts of Tsg101 on release of virus particles was determined by adding the pa inducer at 0, 1, and 5 μ M to cells transfected with a constant amount of pIND-h-Tsg101-FLAG DNA, *rev*, *pol* and *gag* or *gag* Δ 6 and examining the culture media for virus-like particles. As expected, no virus-specific protein was released from cells expressing only *rev* (Figure 6B, lane 1). Viral particles released from cells treated with 0 μ M pa contained the expected band of mature CA protein (lane 2). The virus released from cells treated with 1 or 5 μ M pa exhibited the same mature CA composition, but the amount was reduced to ~60% and ~30%, respectively, of the control (0 μ M pa) level (lanes 3 and 4, respectively). Addition of 5 μ M pa in the absence of pIND-h-Tsg101-FLAG had no inhibitory effect. Release of immature particles containing bands identified as the truncated Gag Δ p6 precursor protein and MA-CA was not significantly affected by Tsg101 overexpression and remained essentially unchanged (lanes 5-7). The results indicate that increased intracellular levels of Tsg101 interfered with release of wild-type Pr55^{Gag} particles and that this inhibition required the presence of an intact p6 domain in Gag.

Effect of mutation of the Tsg101 SB domain. Taken together, the results above suggested that both Tsg101 deficiency and overproduction could impair mature virus particle release. However, it was also possible that the over-expressed FLAG-tagged Tsg101 protein was acting as a dominant-negative inhibitor that interfered with normal trafficking. As described above, the C-terminally located SB domain regulates the steady-state level of Tsg101 post-translationally by affecting degradation of the Tsg101 protein (Feng, G.H., Lih, C.-J., & Cohen, S.N., 2000, *Cancer Research* 60, 1736-1741), and recent evidence has implicated the 26S proteasome in this process (Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T.W., & Cohen, S.N., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1619-1624). It is hypothesized that the observed reduction in viral particle release upon Tsg101 over-expression may result from adventitious degradation of Tsg101-associated Gag protein due to events associated with autoregulation. This notion predicts that over-expression of Tsg101 proteins mutated in the SB region and deficient in Tsg101 autoregulation should not lead to inhibition of virus release. The Tsg101 mutant SD5-59 protein contains a highly localized mutation in which a glycine residue replaces 4 aa (residues 348-351) in the SB domain and consequently is

WO 02/094314

PCT/US02/15965

partially defective in its ability to down-regulate the Tag101 protein (Feng, G.H., Lih, C.-J., & Cohen, S.N., 2000, *Cancer Research* **60**, 1736-1741). Western blot analysis confirmed that this protein accumulated following addition of the pa inducer or in response to transfection of increasing amounts of the mutated Tsg101-FLAG DNA (Fig. 7A).

5 The effect of increasing expression of SD5-59 on release of virus particles was determined by adding pa at 0, 1, and 5 μ M to COS cells transfected with the mutant and *rev*, *pol* and *gag* or *gaga6* and examining the culture media for virus-like particles. As expected, no virus-specific protein was released from cells expressing only *rev* (FIG. 7B, lane 1). The particles released from cells treated with 0 μ M pa exhibited the CA composition of the mature virus particle (lane 2), consistent with the results described above (Figure 6B, lane 2). Consistent with the hypothesis that events related to Tsg101 autoregulation interfere with virus production, expression of increasing amounts of the SD5-59 mutant protein-- which is inefficient in regulation--permitted release of virus particles (lanes 3,4). Surprisingly, however, expression of the mutated Tsg101 protein also resulted in
15 accumulation of particle-associated uncleaved Gag precursor. In contrast, particles assembled by Gagap6 were identical to those detected when wild-type *tsg101* was over-expressed (lanes 5-7). The observation that overexpression of the Tsg101 mutant resulted in release of particles containing unprocessed Gag suggests that the mutation, while allowing normal virus release, disengaged the usual coupling of virus release and Gag
20 processing.

Deletion of aa348-351 is not expected to affect Tsg101 interaction with Gag because the binding site for Gag in Tsg101 resides in the N-terminal Ub E2 variant (UEV) domain. C-terminally truncated proteins lacking residues 348-351 bind Gag^{p6} as efficiently as the intact protein in a 2-hybrid assay. As shown in FIG. 8, Western analysis using anti-p6
25 antibody indicated that the Gag^{p6} precursor and the NC-p6 cleavage product accumulated in cytoplasmic extracts prepared from induced cells transfected with *gag* and 2 μ g of either the wild-type or mutated *tsg101* DNA (FIG. 8A, lanes 3,4). Anti-Tsg101 antibody immunoprecipitated the viral proteins in the 2 extracts to a comparable extent (FIG. 8B, lanes 3,4), indicating that expression of the exogenous proteins did not change the amount
30 of Gag bound to Tsg101. Re-probing the blot with antibodies against the FLAG tag (FIG. 8C) or the full-length Tsg101 protein (FIG. 8D) confirmed the presence of the exogenous (FLAG-tagged) and native Tsg101 proteins in the immune precipitate (lanes 1-4). These results indicate that lack of effect of the SD5-59 mutation on Gag release were not due to abrogation of the Tsg101-Gag interaction.

35 To further test the supposition that the inhibition of virus particle release by

WO 02/094314

PCT/US02/15965

overexpression of the wild-type Tsg101 protein results from events associated with Tsg101 autoregulation, the steady-state level of viral protein under conditions where the greatest effect on release was detected was assessed. As shown in Fig. 9A, control cells transfected with *gag*, *pol*, and *rev* but no exogenous *tsg101* accumulated high levels of viral protein in both the S1 and P1 fractions, as revealed by Western analysis with anti-CA antibody (lanes 2, 4). In contrast, cells transfected with *gag*, *pol*, *rev* and wild-type *tsg101-FLAG* DNA under conditions that yielded the greatest inhibition (*c.f.* Figure 6B, lane 4) contained no detectable viral protein in the S1 or P1 fractions, suggesting that extensive degradation of viral protein had occurred (Fig. 9B, lanes 1, 3). This effect required the p6 domain of Gag, as Gag Δ p6 was detected in both S1 and P1 fractions (lanes 2,4). Under the same conditions, cells expressing the SD5-59 mutant instead of the wild-type Tsg101 protein accumulated detectable levels of viral protein in the S1 fraction (panel C, lane 1), although no protein was found in the P1 compartment (lane 3). In contrast, Gag Δ p6 accumulated at higher levels in both fractions (lanes 2,4). The results support the hypothesis that the Tsg101 autoregulatory mechanism affects the steady-state level of intracellular Gag.

Discussion

In this example, it is shown that perturbation of the steady-state level of Tsg101 by under- or over- expression of the protein negatively affected release of mature HIV-1 virus-like particles from murine and primate cells. Mutation of the Tsg101 SB region, which has been implicated in Tsg101-mediated post-translational autoregulation of its steady-state protein level reduced the ability of the over expressed Tsg101 protein to block virus particle release, as did mutation of the p6 domain. These results link the production of HIV-1 virus particles directly to a cellular protein (*i.e.*, Tsg101) that binds the Gag L domain, which controls egress of mature virus, and provide strong evidence that the Gag-Tsg101 interaction plays a specific and significant role in HIV-1 propagation. The fact that modulation of Tsg101 expression in both murine (SL6) and primate (COS) cells affected virus release indicates that Tsg101 is an important cofactor in HIV-1 virus assembly in diverse intracellular environments.

The observation that over expression of a Tsg101 protein mutated in the SB domain resulted in release of virus particles containing Gag that was not proteolytically processed indicates that Tsg101 is involved in the Gag protein maturation associated with virus particle release. The effect of Tsg101 on release of mature virions may be a consequence of Tsg101's proposed regulation of the endocytic pathway (Lemmon, S. K. & Traub, L. M.,

WO 02/094314

PCT/US02/15965

2000, *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 457-466). Interestingly, the mutation in SD5-59 that partially inactivates the autoregulatory mechanism lies in a region that is required for interaction with another endocytic sorting protein, Vps28 (Bishop N and Woodman P., 2001, *J Biol Chem.* **276**:11735-42), which is included with Tsg101 in a complex that
5 functions in trafficking of proteins between the plasma membrane and endocytic vesicles (Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* **1**, 242-258).

Potentially, the SD5-59 mutation may have disengaged Tsg101 from the endocytic sorting machinery, causing Gag to bypass a processing site and be released in an uncleaved form. This possibility is supported by the observation that the Gag Δ p6 mutant, which does
10 not bind Tsg101 and would therefore not engage the machinery, is also released in an unprocessed form.

In this regard, it is noteworthy that Tsg101-deficient SL6 cells exhibited defects in sorting and proteolytic maturation of the lysosomal hydrolase cathepsin D that are presumed to be due to failure to deliver the enzyme to the processing site in the lysosome (Babst, M.,
15 Odorizzi, G., Estepa, E. J. & Emr, S. D., 2000, *Traffic* **1**, 242-258). The results in this example also associate Tsg101 deficiency with defective transport of Gag precursors to their normal plasma membrane maturation site. Impaired trafficking of Gag in SL6 cells may limit the pool of Gag precursors available at the membrane budding site, resulting in reduction in the amount of released particles, as we observed. As Gag lacking p6 associates
20 with the membrane efficiently (see, e.g., Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3195-3199) even though it is released less effectively (Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3195-3199), transport to a *specific* processing site or membrane compartment, rather than membrane localization *per se*, may be the Gag-related event that requires normal levels of the native Tsg101 protein. Alternatively, as
25 proteolytic processing requires the viral protease-containing Gag-Pol precursor (Swanstrom, R. & Wills, J. W., 1997, in *Retroviruses*, eds. Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 263-334), the change in efficiency of proteolytic processing mediated by the SD5-59 mutant may reflect differential effects of
30 Tsg101 on Gag^{pro} but not Gag-Pol (which lacks p6). In any case, the fact that a mutation that may have disengaged Tsg101 from the endocytic machinery reduced the efficiency of proteolytic processing in the particles assembled in COS-1 cells links proteolytic maturation and release of HIV-1 Gag to proper functioning of proteins in the endocytic machinery. Perhaps the putative processing compartment or differential trafficking event whose
35 existence is suggested by our results indirectly involves the proteasome, as proteasome

WO 02/094314

PCT/US02/15965

inhibitors were found to prevent cell-mediated degradation of Tsg101 (Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T.W., & Cohen, S.N., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1619-1624) and viral protease-mediated processing of Gag (Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13057-13062).

Regarding Tsg101 control of virus release, these results suggest that the Tsg101 steady-state level and the efficiency of mature virus release are tightly coupled. Tsg101 deficiency and overproduction resulted in similar outcomes, *i.e.*, reduced Gag accumulation in the plasma membrane-enriched S1 fraction. This example demonstrates that Tsg101 over-expression correlated with apparent degradation of Gag and that the lessened inhibitory effect of the SD5-59 mutant protein was related to reduced effects on Gag imposed by autoregulation of Tsg101. Interestingly, under the conditions of these experiments, Gag was much more affected by over-expression of an exogenously-derived *tsg101* gene than was the endogenous Tsg101 protein. This observation suggests that the form of Gag that binds Tsg101 is a multimer and that Tsg101 interaction with a subset of molecules in the multimer was sufficient to induce the observed inhibitory effects on Gag accumulation and release. This seems consistent with previous observations that efficient particle release does not require that every Gag molecule possess an L domain (Wills, J. W., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P. & Leis, J., 1994, *J. Virol.* **68**, 6605-6618), the binding site of Tsg101 in Gag as shown in Example 1. The observation also may suggest that only a subpopulation of Tsg101 molecules can form productive complexes with Gag, as the inhibition of mature virus production was aggravated by greater accumulation of the wild-type FLAG-tagged Tsg101 protein. Recent evidence indicates that Tsg101 can interact with Ub ligases Mdm2 (Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T.W., & Cohen, S.N., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1619-1624) and Nedd4. These enzymes monoubiquitinate substrates destined for transport by the endocytic machinery (Shih, S. C., Sloper-Mould, K. E. & Hicke, L., 2000, *EMBO. J.* **19**, 187-198) and polyubiquitinate cargo intended for proteasomal degradation (Hershko, A. & Ciechanover, A., 1998, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479), possibly including Tsg101 itself when it is overproduced. The notion that Tsg101 functions in concert with Ub ligases is supported by studies that implicate the Ub machinery in L domain function and viral exocytosis (Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. & Yewdell, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13057-13062, Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13063-13068; Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

WO 02/094314

PCT/US02/15965

97, 13069-13074; Ott, D. E., Coren, L. V., Chertova, E. N., Gagliardi, T. D. & Schubert, U.,
2000, *Virology* **278**, 111-121; Vogt, V. M., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12945-
12947). Tsg101 interaction with Ub ligases may bring these enzymes into proximity with
assembling Gag particles. Gag may require tight Tsg101-mediated control to promote
5 transport vs. degradation.

Precisely how Tsg101 might mediate trafficking of Gag is unclear. Possibly,
Tsg101 controls trafficking of a membrane-associated cellular protein that regulates
exocytosis. It is also noteworthy that the invagination event associated with formation of
the sorting multi vesicular body (MVB) that Tsg101 is believed to regulate (Lemmon, S. K.
& Traub, L. M., 2000, *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 457-466) is the only example in the cell,
10 other than virus budding, where vesicle formation is directed *away* from the cytoplasm.
Thus Gag, through its interaction with Tsg101, may become linked to other *vps* homologues
that determine formation of the sorting MVB and may cause the machinery to direct
invagination out of the cell of vesicles containing virus particles. If this strategy is indeed
15 unique to the virus, the requirement for the interaction may provide a potential target for
interfering with HIV propagation.

7. REFERENCES CITED

All references cited herein are incorporated herein by reference in their entirety and
20 for all purposes to the same extent as if each individual publication or patent or patent
application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its
entirety for all purposes.

Many modifications and variations of this invention can be made without departing
from its spirit and scope, as will be apparent to those skilled in the art. The specific
25 embodiments described herein are offered by way of example only, and the invention is to
be limited only by the terms of the appended claims along with the full scope of equivalents
to which such claims are entitled.

30 SEQ. ID. NO. 1:
MAVSESQLKK MMSKYKYRDL TVRQTVNVIA MYKDLKPVLD SYVPNDGSSR ELVNLGTIP 60
VRYRGNINYI PICLWLLDTY PYNPPICFVK FTSSMTIKTG KHV DANGKIY LPYLHDWKHP 120
RSELLELIQI MIVIFGEEPP VFSRPTVSAS YPPYTATGPP NTSYMPGMPF GISAYPSGYF 180
PNFSGYFGCP YPPAGFYFAT TSSQYPSQPP VTTVGP SRDG TISED TIRAS LISAVSDKLR 240
WRMKEEMDGA QABL NALKRT EEDLKKGHQK LEEMVTRLDQ EVAEVDKNIE LLKKKDEELS 300
SALEKMEHQF ENNDIDEVII PTAPLYKQIL NLYAEENAI E DTI FYLGEAL RRGVIDLDVF 360
35 LKHVRLLSRK QFQLRALMQK ARKTAGLSDL Y 391

WO 02/094314

PCT/US02/15965

SEQ. ID. NO. 2
 MAVSESQLKK MVSQYKYRDL TVRETVNVIT LYKDLKPVLQ SYVENDGSSR ELMNLGTIP 60
 VFYRGNTYNI PICLWLLDTY PYNPPICFVK PTSSMTIKTG KHVVDANGKIY LPYLHEWKHP 120
 QSDLLGLIQV MIVVFGDEPP VFSRPIASAY PYPQATGPPN TSYMPCMPGG ISPVPSGYPP 180
 NFGSYFGCPY PFGGYPYPAT SSQYPSQPPV TTVGFSRDGT ISEDTIRASL ISAVSOKLRW 240
 5 RMKEEMDRAQ AELNALKRTE EDLKKGHQKL EEMVTRLDQE VAEVDRNIEL LKKKDEELSS 300
 ALEKEMENQSE NNDIDEVIIIP TAPLYKQILN LYAEENAIED TIFYLGEALR RGVIDLDFVL 360
 KHVRLLSRQ FQLRALMQKA RKTAGLSDLV 390

SEQ. ID. NO:3
 PTAPP 5

10 SEQ ID NO:4
 ALQSRPEPTA PFEES 15

15

20

25

30

35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, wherein the peptide or fragment is effective in reducing HIV particle production, said method comprising:
- 5
- (a) introducing an expression construct into a mammalian cell or cells, wherein the expression constructs comprises a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene;
 - 10 (b) introducing one or more expression constructs into the mammalian cell or cells, wherein the one or more expression constructs comprises the HIV *gag*, *pol*, and *rev* coding sequences;
 - 15 (c) incubating the transfected mammalian cell or cells in a suitable media for a sufficient time and at a temperature of about 37C to obtain a mammalian cell culture comprising mammalian cells which express a gene product encoded by the portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene and gene products encoded by the HIV *gag*, *pol* and *rev* genes;
 - 20 (d) measuring the level of particle associated p24 in the mammalian cell culture; and
 - (e) correlating a reduced level of particle-associated p24, when compared to a control mammalian cell culture which has not been transfected with the expression construct comprising a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene, with the
25 identification of a peptide or fragment effective in reducing HIV particle production.
2. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, wherein the peptide or fragment is effective in reducing HIV particle production, said method comprising:
- 30
- (a) introducing an expression construct into a mammalian cell or cells, wherein the expression construct comprises a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene;
 - 35 (b) introducing HIV into the mammalian cell or cells;

WO 02/094314

PCT/US02/15965

- 5 (c) incubating the transfected and infected mammalian cell or cells in a suitable media for a sufficient time and at a temperature of about 37C to obtain a mammalian cell culture comprising mammalian cells which express a gene product encoded by the portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene and which produce HIV particles;
- (d) measuring the level of particle associated p24 in the mammalian cell culture; and
- 10 (e) correlating a reduced level of particle-associated p24, when compared to a control mammalian cell culture which has not been transfected with the expression construct comprising a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene, with the identification of a peptide or fragment effective in reducing HIV particle production.
3. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian
15 *Tsg101* protein, wherein the peptide or fragment is effective in reducing HIV particle production, said method comprising:
- (a) introducing an expression construct into a mammalian cell or cells, wherein the
20 expression construct comprises a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene;
- (b) introducing HIV into the mammalian cell or cells;
- 25 (c) incubating the transfected mammalian cell or cells in a suitable media for a sufficient time and at a temperature of about 37C to obtain a mammalian cell culture comprising mammalian cells which express a gene product encoded by the portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene and which produce HIV particles.
- (d) quantifying the HIV particles released from the cells; and
- 30 (e) correlating a reduction in HIV particle production, when compared to a control mammalian cell culture which has not been transfected with the expression construct comprising a portion of the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene, with the identification of a peptide or fragment effective in reducing HIV particle production.
- 35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

4. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, wherein the peptide or fragment is effective in reducing HIV particle production, said method comprising:

- 5 (a) introducing one or more expression constructs into the mammalian cell or cells, wherein the one or more expression constructs comprises the HIV *gag*, *pol*, and *rev* coding sequences;
- (b) introducing into the mammalian cell or cells; a peptide or fragment derived from a
10 mammalian Tsg101 protein;
- (c) incubating the mammalian cell or cells transfected with the one or more expression constructs and permeated with a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 peptide, in a suitable media for a sufficient time and at a temperature of about 37C to
15 obtain a cell culture;
- (d) measuring the level of particle associated p24 in the mammalian cell culture; and
- (e) correlating a reduced level of particle-associated p24, when compared to a control
20 mammalian cell culture which has not been permeated with a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, with the identification of a peptide or fragment effective in reducing HIV particle production.

5. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian
25 Tsg101 protein, wherein the peptide or fragment is effective in reducing HIV particle production, said method comprising:

- (a) introducing HIV into a mammalian cell or cells;
- 30 (b) introducing into the mammalian cell or cells; a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein;
- (c) incubating the mammalian cell or cells transfected with HIV and permeated with a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein in a suitable media for a
35 sufficient time and at a temperature of about 37C to obtain a cell culture;

WO 02/094314

PCT/US02/15965

- (d) measuring the level of particle associated p24 in the cell culture; and
- (e) correlating a reduced level of particle-associated p24, when compared to a control mammalian cell culture which has not been permeated with a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, with the identification of a peptide or fragment effective in reducing HIV particle production.
- 5
6. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, wherein the peptide or fragment is effective in reducing HIV particle production, said method comprising:
- 10
- (a) introducing HIV into a mammalian cell or cells;
- (b) introducing into the mammalian cell or cells, a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein;
- 15
- (c) incubating the mammalian cell or cells transfected with HIV and permeated with a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein in a suitable media and for a sufficient time, at a temperature of about 37C;
- 20
- (d) quantifying the HIV particles released from the cells; and
- (e) correlating a reduction in HIV particle production, when compared to a control mammalian cell culture which has not been permeated with a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, with the identification of a peptide or fragment effective in reducing HIV particle production.
- 25
7. The method of any one of claims 1, 2 or 3 wherein the coding sequence for a mammalian *tsg101* gene is from the UEV A domain of *Tsg101*.
- 30
8. A peptide or fragment useful for reducing HIV particle production, said peptide comprising at least four contiguous amino acids of a mammalian Tsg101 protein and identified by the method of any one of claims 1-6.
- 35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

9. The peptide or fragment of claim 8 wherein the mammalian Tsg101 protein is a mouse Tsg101 protein (SEQ ID NO:1), human Tsg101 protein (SEQ ID NO:2) or other mammalian Tsg101 protein.
- 5 10. The peptide or fragment of claim 8 wherein the four contiguous amino acids are from the UEV A domain of a mammalian Tsg101 protein.
11. The peptide of claim 8 wherein the peptide reduces HIV particle production by at least about three-fold.
- 10 12. A pharmaceutical composition useful for reducing HIV particle production, said composition comprising one or more pharmaceutically acceptable carriers or diluents and a mammalian Tsg101 protein or a fragment thereof.
- 15 13. A pharmaceutical composition useful for reducing HIV particle production, which comprises one or more pharmaceutically acceptable carriers or diluents and a peptide according to claim 8.
14. The pharmaceutical composition of claim 13 wherein the Tsg101 protein is a
20 mouse Tsg101 protein (SEQ ID NO:1).
15. The pharmaceutical composition of claim 13 wherein the Tsg101 protein is a human Tsg101 protein (SEQ ID NO:2).
- 25 16. The pharmaceutical composition of claim 13 wherein the four contiguous amino acids are from the UEV A domain of a mammalian Tsg101 protein.
17. A method for identifying a peptide comprising the HIV-1 Gagp6 late (L) domain, PTAPP (SEQ ID NO:3), wherein the peptide inhibits interaction between a Tsg101
30 protein and HIV Gag, said method comprising:
- (a) immobilizing on at least a first and second solid support or surface, a peptide comprising the HIV-1 Gag or HIV-1 Gagp6 late (L) domain, wherein the immobilized peptide is linked to a specific anti-Gag or L domain antibody or other linker;
- 35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

- (b) incubating at about 4C for a sufficient time, a first reaction mixture comprising labeled Tsg101 protein, a suitable buffer, and a peptide which comprises at least four contiguous amino acids of the HIV-1 Gagp6 late (L) domain;
- 5 (c) incubating at about 4C for a sufficient time, a second reaction mixture comprising labeled *tsg101* and a suitable buffer;
- (d) adding the first reaction mixture of step (b) to the first solid support or surface mixture of step (a) and incubating in a liquid phase at a temperature of about 4C for a
10 sufficient time;
- (e) adding the second reaction mixture of step (c) to the second solid support or surface mixture of step (a) and incubating in a liquid phase at a temperature of about 4C for a sufficient time;
- 15 (f) separating the first solid support or surface from the liquid phase of step (d) to obtain a first solid phase;
- (g) separating the second solid support or surface from the liquid phase of step (e) to
20 obtain a second solid phase;
- (h) determining the amount of labeled *tsg101* in the first solid phase of step (f) and in the second solid phase of step (g); and
- 25 (i) correlating a decrease in the amount of labeled *tsg101* in the first solid phase of step (f) when compared to the amount of labeled *tsg101* in the second solid phase of step (g) with the identification of a peptide comprising at least four contiguous amino acids of the HIV-1 Gagp6 late (L) domain wherein said peptide inhibits interaction
30 between a Tsg101 protein and HIV Gag.
18. The method of claim 17 wherein the Tsg101 protein is a mouse, human, or other mammalian Tsg101 protein.
- 35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

19. A peptide useful for inhibiting interaction between Tsg101 protein and HIV Gag, said peptide comprising at least four contiguous amino acids of the HIV-1 Gagp6 late (L) domain, PTAPP (SEQ ID NO:3) and identified by the method of claim 17.
- 5 20. The peptide of claim 19 further comprising at least five contiguous amino acids of ALQSRPEPTAPPEES (SEQ ID NO:4).
21. The peptide of claim 19 or 20 wherein the peptide causes at least about a three-fold reduction in TSG101-HIV Gag interaction.
- 10 22. A pharmaceutical composition useful for inhibiting interaction between TSG101 and HIV Gag, said composition comprising one or more pharmaceutically acceptable carriers or diluents and a peptide according to claim 19 or 20.
- 15 23. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a peptide according to claim 8.
24. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a peptide according to claim 9.
- 20 25. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a peptide according to claim 10.
- 25 26. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a peptide according to claim 11.
- 30 27. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a peptide according to claim 19 or 20.
- 35 28. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition according to claim 12.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

29. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition according to claim 13.

5 30. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition according to claim 14.

10 31. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition according to claim 15.

15 32. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition according to claim 16.

20 33. A method of treating a patient infected with HIV or other retrovirus which comprises administering a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition according to claim 22.

25 34. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, wherein said peptide or fragment is effective in reducing HIV particle production, said method comprising:

(a) measuring a level of HIV particles released in a culture of mammalian cells, wherein said mammalian cells comprise an expression construct comprising a portion of the coding sequence of a mammalian *tsg101* gene such that said mammalian cells express a gene product encoded by said portion of said coding sequence of said mammalian *tsg101* gene and are infected by HIV virus; and

30 (b) comparing said level of HIV particles to a level of HIV particles released in a culture of control mammalian cells under similar conditions, wherein said control mammalian cells do not comprise an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene and are infected by HIV virus,

35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

wherein said level of HIV particles measured in step (a) compared to said level of HIV particles of said culture of control mammalian cells below a predetermined threshold level identify said gene product encoded by said portion of said coding sequence of said mammalian *tsg101* gene as effective in reducing HIV particle production.

5

35. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, wherein said peptide or fragment is effective in reducing HIV particle production, said method comprising:

10 (a) measuring a level of HIV particles released in a culture of mammalian cells, wherein said mammalian cells comprise (i) an expression construct comprising a portion of the coding sequence of a mammalian *tsg101* gene and (ii) one or more expression constructs comprising the HIV *gag*, *pol*, and *rev* coding sequences such that said mammalian cells express a gene product encoded by said portion of said coding sequence of said mammalian *tsg101* gene and gene products encoded by said HIV *gag*, *pol* and *rev* genes; and

(b) comparing said level of HIV particles released to a level of HIV particles released in a culture of control mammalian cells under similar conditions, wherein said control mammalian cells comprise one or more expression constructs comprising the HIV *gag*, *pol*, 20 and *rev* coding sequences such that said mammalian cells express gene products encoded by said HIV *gag*, *pol* and *rev* genes, and wherein said control mammalian cells do not comprise an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene,

25 wherein said level of HIV particles measured in step (a) compared to said level of HIV particles released in said culture of control mammalian cells below a predetermined threshold level identify said gene product encoded by said portion of said coding sequence of said mammalian *tsg101* gene as effective in reducing HIV particle production.

30 36. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, wherein said peptide or fragment is effective in reducing HIV particle production, said method comprising:

(a) measuring a level of HIV viral particle released in a culture of mammalian cells, 35 wherein said mammalian cells comprise (i) an expression construct comprising a portion of

WO 02/094314

PCT/US02/15965

the coding sequence of a mammalian *tsg101* gene and (ii) an expression construct comprising the HIV *gag* coding sequence such that said mammalian cells express a gene product encoded by said portion of said coding sequence of said mammalian *tsg101* gene and a gene product encoded by said HIV *gag* gene; and

5

(b) comparing said level of HIV viral particle released to a level of HIV viral particle released in a culture of control mammalian cells under similar conditions, wherein said control mammalian cells comprise one or more expression constructs comprising said HIV *gag* coding sequence such that said mammalian cells express a gene product encoded by said HIV *gag* gene, and wherein said control mammalian cells do not comprise an expression construct comprising a portion of a coding sequence for a mammalian *tsg101* gene,

wherein said level of HIV viral particle measured in step (a) compared to said level of HIV viral particle released in said culture of control mammalian cells below a predetermined threshold level identify said gene product encoded by said portion of said coding sequence of said mammalian *tsg101* gene as effective in reducing HIV particle production.

37. The method of claim 34, 35, or 36, wherein said level of HIV particles released in a culture of mammalian cells and said level of HIV particles released in a culture of control mammalian cells are represented by measured levels of particle associated p24.

38. The method of claim 34, 35, or 36, wherein said portion of said coding sequence of said mammalian *tsg101* gene is a sequence in the UEV A domain of said *Tsg101* gene.

39. The method of claim 38, wherein said predetermined threshold level is a two-fold reduction of said level of HIV particles measured in step (a) compared to said level of HIV particles of said culture of control mammalian cells.

40. The method of claim 38, wherein said predetermined threshold level is a four-fold reduction of said level of HIV particles measured in step (a) compared to said level of HIV particles of said culture of control mammalian cells.

41. The method of claim 40, wherein said predetermined threshold level is a 90% reduction of said level of HIV particles measured in step (a) compared to said level of HIV particles of said culture of control mammalian cells.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

42. The method of claim 41, wherein said predetermined threshold level is a 95% reduction of said level of HIV particles measured in step (a) compared to said level of HIV particles of said culture of control mammalian cells.

5 43. The method of claim 42, wherein said predetermined threshold level is a 99% reduction of said level of HIV particles measured in step (a) compared to said level of HIV particles of said culture of control mammalian cells.

10 44. The method of claim 43, wherein said predetermined threshold level is a 99.5% reduction of said level of HIV particles measured in step (a) compared to said level of HIV particles of said culture of control mammalian cells.

15 45. A method for identifying a peptide or fragment derived from a mammalian Tsg101 protein, wherein said peptide or fragment is effective in reducing retrovirus production, said method comprising identifying a peptide that binds to a peptide comprising the PTAP motif of a retroviral protein.

46. The method of claim 45, wherein said retrovirus is a lentivirus.

20 47. The method of claim 46, wherein said lentivirus is HIV-1 virus.

48. The method of claim 46, wherein said lentivirus is HIV-2 virus.

25 49. The method of claim 46, wherein said lentivirus is simian immunodeficiency virus.

50. The method of claim 45, wherein said peptide comprising the PTAP motif is a HIV Gag protein.

30 51. The method of claim 45, wherein said peptide comprising the PTAP motif is the peptide of SEQ ID NO:4.

35 52. A method for identifying a peptide comprising a PTAP motif, wherein said peptide is effective in reducing retrovirus production, said method comprising identifying a peptide comprising a PTAP motif which binds to a TSG101 protein or a fragment thereof.

WO 02/094314

PCT/US02/15965

53. The method of claim 52, wherein said retrovirus is a lentivirus.

54. The method of claim 53, wherein said lentivirus is HIV-1 virus.

5 55. The method of claim 53, wherein said lentivirus is HIV-2 virus.

56. The method of claim 53, wherein said lentivirus is simian immunodeficiency virus.

10 57. The method of claim 52, wherein said peptide comprises the sequence of SEQ ID NO:4.

58. The method of any one of claims 34-36 and 45-57, wherein said tsg101 gene is a human tsg101 gene.

15

20

25

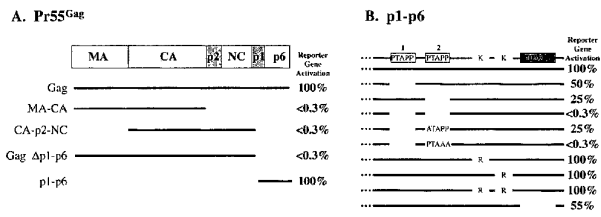
30

35

WO 02/094314

PCT/US02/15965

10784-013-228

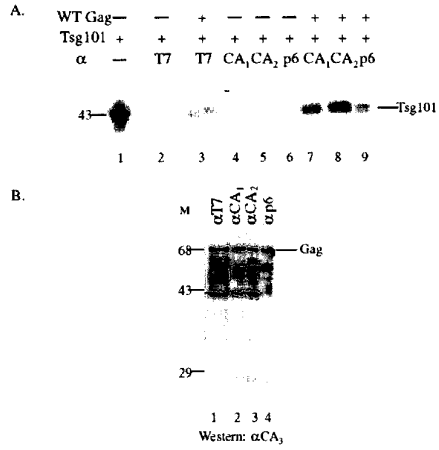


FIGS. 1A-1B

WO 02/094314

PCT/US02/15965

10784-013-228

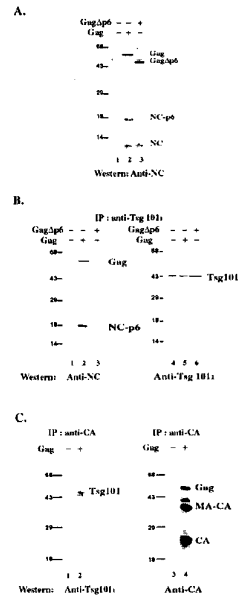


FIGS. 2A-2B

WO 02/094314

PCT/US02/15965

10784-013-228

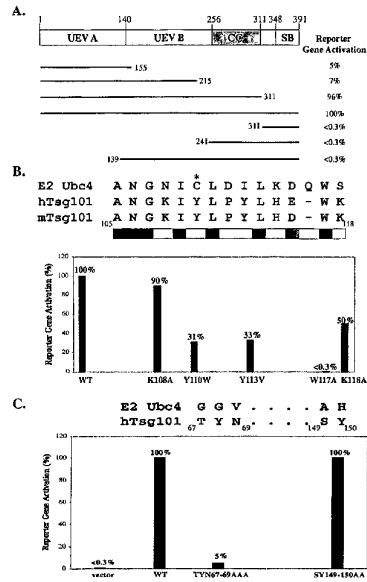


FIGS. 3A-3C

WO 02/094314

PCT/US02/15965

10784-013-228

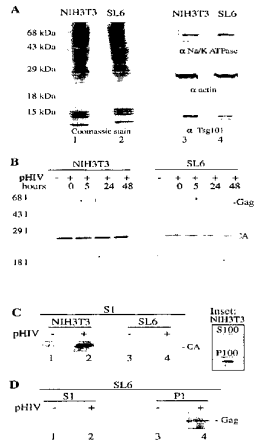


FIGS. 4A-4C

WO 02/094314

PCT/US02/15965

10784-013-228

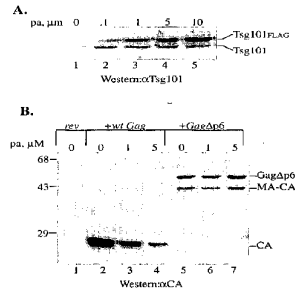


FIGS. 5A-5D

WO 02/094314

PCT/US02/15965

10784-013-228

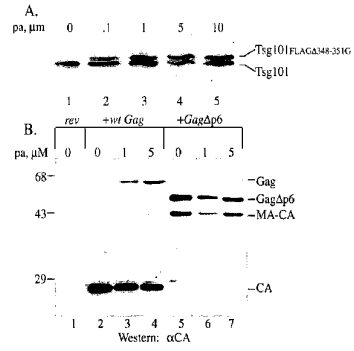


FIGS. 6A-6B

WO 02/094314

PCT/US02/15965

10784-013-228

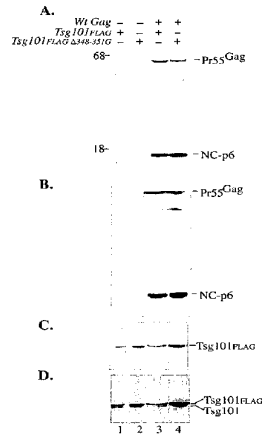


FIGS. 7A-7B

WO 02/094314

PCT/US02/15965

10784-013-228

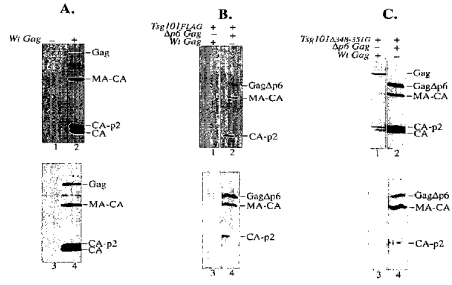


FIGS. 8A-8D

WO 02/094314

PCT/US02/15965

10784-013-228



FIGS. 9A-9C

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/16965		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :Please See Extra Sheet. US CL :424/208.1; 485/6, 7.1, 91.4, 320.1, 325, 456 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. : 424/208.1; 485/6, 7.1, 91.4, 320.1, 325, 456				
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				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	US 5,892,016 A (BRIE et al) 06 April 1999, please see entire document.	1-58		
A, P	US 6,248,523 B1, (COHEN et al) 19 June 2001, please see entire document.	1-58		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> *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 *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 *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 *Z* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*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 *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 *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 *Z* document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*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 *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 *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 *Z* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 30 JUNE 2002		Date of mailing of the international search report 20 AUG 2002		
Name and mailing address of the ISA/IUS Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703) 806-8280		Authorized officer LAURIE SCHEINER <i>Laurie Scheiner</i> Telephone No. (703) 806-0196		
Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/15965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7)

A61K 33/21; A01N 43/04; G01N 33/58; C12Q 1/68; C12N 15/00, 15/64, 5/00, 15/65

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 7/08	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00	A

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

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72)発明者 コーエン,スタンリー,エヌ.

アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 5 1 2 0 カリフォルニア州,スタンフォード,スタンフォード
ユニバーシティー,デパートメント オブ ジェネティクス スクール オブ メディシン

(72)発明者 カーター,キャロル

アメリカ合衆国 1 1 7 4 3 ニューヨーク州,ハンティントン,レンウィック アベニュー 3
3

(72)発明者 ゴフ,アーサー

アメリカ合衆国 1 1 7 6 4 ニューヨーク州,ミラー プレース,レイディオ アベニュー 2
7 9

(72)発明者 エールリッヒ,ローナ

アメリカ合衆国 1 1 7 8 6 ニューヨーク州,シヨアハム,コルゲート コート ナンバー 1

Fターム(参考) 2G045 BA13 BB20 CB01 CB17 CB21 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 EA02 EA04 FA02 GA11 HA11

4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ13 QQ42 QR33 QR48 QR59 QR77 QR80

QS05 QS36 QX02

4C084 AA02 BA01 BA08 BA18 BA22 BA23 BA44 CA53 DA01 NA14

ZB331 ZB332 ZC551 ZC552

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	TSG 101作为HIV生产的抑制剂		
公开(公告)号	JP2005500825A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2002591030	申请日	2002-05-21
[标]申请(专利权)人(译)	纽约州立大学的研究基金会		
申请(专利权)人(译)	纽约州立大学的研究基金会 科恩, 史丹利, NV.		
[标]发明人	コーエンスタンリーエヌ カーターキャロル ゴフアーサー エールリッヒローナ		
发明人	コーエン,スタンリー,エヌ. カーター,キャロル ゴフ,アーサー エールリッヒ,ローナ		
IPC分类号	A61K38/00 A61K38/17 A61P31/12 A61P31/18 C07H21/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/16 C07K14/47 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/1709 A61P31/12 A61P31/18 C07K14/005 C07K14/4702 C07K2319/00 C12N2740/16222 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N33/6878 G01N2333/16 G01N2333/161 G01N2500/02 G01N2500/10 G01N2500/20		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA A61P31/12 A61P31/18 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/47 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D A61K37/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QR33 4B063/QR48 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C084/ZC551 4C084/ZC552 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/292761 2001-05-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了鉴定哺乳动物Tsg101蛋白中与人免疫缺陷病毒1型 (HIV-1) 的PTAPP基序或L结构域结合的肽的方法。这些肽可用于抑制Tsg101-HIV Gag结合, 因此可有效减少HIV颗粒的产生。本发明还提供了通过本发明方法鉴定的肽和使用这些肽治疗HIV感染的方法。

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 31/12	4 B 0 2 4
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/18	4 B 0 6 3
A 6 1 P 31/18	C 0 7 K 7/06	4 C 0 8 4
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 7/08	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-591030 (P2002-591030)	(71) 出願人	503427072
(86) (22) 出願日	平成14年5月21日 (2002.5.21)		ザ リサーチ ファウンデーション オブ
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月20日 (2003.11.20)		ザ ステート ユニバーシティー オブ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/015965		ニューヨーク
(87) 国際公開番号	W02002/094314		アメリカ合衆国 1 2 2 0 1 - 0 0 0 9
(87) 国際公開日	平成14年11月28日 (2002.11.28)		ニューヨーク州, アルバニー, ビー. オ
(31) 優先権主張番号	60/282, 761		ー. ボックス 9
(32) 優先日	平成13年5月21日 (2001.5.21)	(71) 出願人	503427201
(33) 優先権主張国	米国 (US)		コーエン, スタンリー, エス.
			アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 5 1 2 0
			カリフォルニア州, スタンフォード, スタ
			ンフォード ユニバーシティー, アパート
			メント オブ ジェネティクス スクール
			オブ メディシン

最終頁に続く

(54) 発明の名称 H I V 産生のインヒビターとしての T S G L O 1