

(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2005-519636

(P2005-519636A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 5 0
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-503917 (P2004-503917)	(71) 出願人	504174618
(86) (22) 出願日	平成14年11月12日 (2002.11.12)		プロテオロジックス, インク.
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月6日 (2004.7.6)		PROTEOLOGICS, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/036366		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 109
(87) 国際公開番号	W02003/095971		62 オレンジバーグ スイート 10
(87) 国際公開日	平成15年11月20日 (2003.11.20)		ラムランド ロード サウス 40
(31) 優先権主張番号	60/345,846		40 Ramland Road Sou
(32) 優先日	平成13年11月9日 (2001.11.9)		th, Suite 10, Orang
(33) 優先権主張国	米国 (US)		eburg, NY 10962 (US
(31) 優先権主張番号	60/364,530)
(32) 優先日	平成14年3月15日 (2002.3.15)	(74) 代理人	100127878
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 遠藤 淳二
		(74) 代理人	100095577
			弁理士 小西 富雅

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 POSH核酸、ポリペプチド及び関連する方法、関連する用途

(57) 【要約】

本願は、ウイルス再生を含む種々の生物学的プロセスに関与する、新規なポリペプチド及び核酸を開示している。関連する方法及び組成物もまた記載されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

4つのSH3ドメインを含み、配列番号2又はその相補配列に少なくとも90%一致するポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離された核酸。

【請求項 2】

前記ポリペプチドは、配列番号2に少なくとも95%一致する、請求項1に記載の核酸。

【請求項 3】

前記ポリペプチド配列は、更にRINGドメインを含む、請求項1に記載の核酸。

【請求項 4】

前記核酸は、細胞内の機能表現型のPOSH喪失を軽減する、請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項 5】

機能表現型のPOSH喪失がHIVウイルス様粒子産生の減少である、請求項4に記載の単離された核酸。

【請求項 6】

少なくとも4つのSH3ドメインを含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離された核酸であって、単離された核酸配列は、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号1の相補配列、及び配列番号3の相補配列からなる群から選択される核酸にハイブリダイズする、単離された核酸。

【請求項 7】

配列番号1、配列番号1の相補配列、配列番号3、及び配列番号3の相補配列からなる群から選択される核酸配列を含む、単離された核酸。

【請求項 8】

前記ポリペプチドをコードする配列が少なくとも1つのイントロンによって分断される、請求項1～7のいずれかに記載の核酸配列。

【請求項 9】

前記ヌクレオチド配列に作動可能に結合した転写調節配列をさらに含み、前記核酸を発現ベクターとして好適に使用されるようにしている、請求項1～7のいずれかに記載の核酸。

【請求項 10】

請求項1～7のいずれかに記載の核酸を含む発現ベクター

【請求項 11】

原核細胞及び真核細胞の少なくとも1つにおいて複製する、請求項10に記載の発現ベクター。

【請求項 12】

請求項10に記載の発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 13】

前記細胞がPOSHポリペプチドを発現する、請求項12に記載の宿主細胞。

【請求項 14】

請求項13に記載の前記宿主細胞によって発現された、精製されたPOSHポリペプチド。

【請求項 15】

請求項13に記載の細胞をPOSHポリペプチドの発現に好適な細胞培養培地中で培養することを含む、組換え型POSHポリペプチドの作製方法。

【請求項 16】

前記POSHポリペプチドの純度を高めるための精製処理をさらに含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

融合蛋白質をコードする核酸であって、前記核酸は、第1の核酸配列と第2の核酸配列

10

20

30

40

50

とを含み、前記第 1 の核酸配列は、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の核酸であり、前記第 2 の核酸配列は、非相同のポリペプチドをコードし、前記第 1 の核酸配列及び第 2 の核酸配列は、融合蛋白質をコードするように位置している、核酸。

【請求項 18】

前記非相同のポリペプチドは、(i) 検出可能な標識、又は(ii) マトリクス結合ドメインである、請求項 17 に記載の核酸。

【請求項 19】

配列番号 1 及び/又は 3、又はその相補配列に少なくとも 90% 一致する核酸配列の 5 ~ 1000 の連続するヌクレオチドを含み、細胞に導入されたとき、POSH mRNA 及び/又は POSH ポリペプチドのレベルを減少させる、リボ核酸。

10

【請求項 20】

配列番号 1 及び/又は 3、又はその相補配列の 5 ~ 1000 の連続するヌクレオチドを含む、請求項 19 に記載のリボ核酸。

【請求項 21】

配列番号 1 及び/又は 3、又はその相補配列の 15 ~ 30 の連続するヌクレオチドを含む、請求項 19 に記載のリボ核酸。

【請求項 22】

リボ核酸が二本鎖リボ核酸である、請求項 19 に記載のリボ核酸。

【請求項 23】

siRNA 及びリボザイムから選択される、請求項 19 に記載のリボ核酸。

20

【請求項 24】

配列番号 15、16、18、19、21、22、24 及び 25 のいずれをも含む群から選択される配列を含む、請求項 19 に記載のリボ核酸。

【請求項 25】

請求項 19 に記載のリボ核酸と、ならびに、リポソーム及び薬学的に有効な添加剤からなる群から選択される追加化合物とを含む、組成物。

【請求項 26】

局部投与用に製剤された、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

a) 配列番号 2 に少なくとも 91% 一致するアミノ酸配列、
b) 高ストリンジェントな条件下で配列番号 1 又は 3 のいずれかの核酸にハイブリダイズする核酸によってコードされたアミノ酸配列、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、任意に (i) 前記ポリペプチドは、POSH-AP と相互作用し、及び/又は(ii) 前記ポリペプチドのダウンレギュレーションがウイルス成熟を低下させる、単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 28】

前記ポリペプチドのダウンレギュレーションが、エンベロープウイルス、レトロイドウイルス及び RNA ウイルスからなる群から選択されるウイルスの成熟を低下させる、請求項 27 に記載の単離されたポリペプチド。

40

【請求項 29】

a) 前記レトロイドウイルスがレンチウイルスである、
b) 前記レトロイドウイルスが HIV 1 型レンチウイルスである、
c) 前記 RNA ウイルスがフィロウイルスである、または、
d) 前記 RNA ウイルスがエボラフィロウイルスである、請求項 28 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 30】

前記ポリペプチドのダウンレギュレーションが、PTAP または PPEY モチーフ含有ウイルスのウイルス成熟を低下させる、請求項 27 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 31】

50

前記ポリペプチドは、4つのSH3ドメイン及び/又はRINGドメインを含む、請求項27～30のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項32】

前記ポリペプチドは、乾燥重量で少なくとも80%まで精製される、請求項27～30のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項33】

前記ポリペプチドは、E2、POSHポリペプチド、ユビキチン及びGTPaseからなる群から選択されるPOSH-APと相互作用する、請求項27～30のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項34】

前記GTPaseがRacである、請求項33に記載のポリペプチド。

【請求項35】

前記RacがRac1である、請求項33に記載のポリペプチド。

【請求項36】

前記ポリペプチドが融合蛋白質である、請求項27～30のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項37】

前記融合蛋白質は、2-ハイブリッドスクリーニングアッセイにおいて機能的である、請求項36に記載のポリペプチド。

【請求項38】

配列番号2、配列番号26及び配列番号30からなる群から選択される配列のエピトープと特異的に免疫反応する、単離された抗体、またはそのフラグメント。

【請求項39】

配列番号2のポリペプチドとPOSH-APとの相互作用を破壊する、請求項38に記載の抗体。

【請求項40】

前記抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fabフラグメントおよび一本鎖抗体からなる群から選択される、請求項38に記載の抗体。

【請求項41】

前記抗体は、検出可能な標識で標識されている、請求項38に記載の抗体。

【請求項42】

前記POSH-APは、E2、POSHポリペプチド、ユビキチン及びGTPaseからなる群から選択される、請求項39に記載の抗体。

【請求項43】

前記GTPaseがRacであり、前記Racが任意にRac1である、請求項43に記載のポリペプチド。

【請求項44】

(i)請求項38～39のいずれか1項に記載の抗体、及び(ii)前記抗体を検出するための検出可能な標識を含む、ヒトPOSHポリペプチドを検出するためのキット。

【請求項45】

POSHポリペプチド及び試験化合物を提供すること、及びPOSHポリペプチドと相互作用する試験化合物を同定することを含む、抗ウイルス薬を同定するための方法。

【請求項46】

前記POSHポリペプチドは、配列番号2、5、7、9および11、及び配列番号2、5、7、9および11のいずれかに記載の少なくとも20の連続するアミノ酸を含むフラグメントからなる群から選択される、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記POSHポリペプチドが細胞内で発現される、請求項45に記載の方法。

【請求項48】

10

20

30

40

50

前記 P O S H ポリペプチドが精製されたポリペプチドである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 P O S H ポリペプチドは、S H 3 ドメイン及び R I N G ドメインからなる群から選択される、請求項 4 6 ~ 4 8 のいずれかに記載の核酸。

【請求項 5 0】

前記試験物質は、S H 3 ドメイン及び R I N G ドメインからなる群から選択されるドメインに結合する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記試験物質は、ポリペプチド、抗体、小分子またはペプチドミメティクスである、請求項 4 8 に記載の方法。 10

【請求項 5 2】

P O S H と相互作用する試験物質が、P T A P または P P E Y モチーフを含有するウイルスの成熟を低下させる、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 3】

P O S H 媒介性ウイルス放出ポリペプチドおよび試験物質を提供すること、及び P O S H 媒介性ウイルス放出ポリペプチドと相互作用する試験物質を同定することを含む、抗ウイルス薬を同定するための方法。

【請求項 5 4】

前記 P O S H 媒介性ウイルス放出ポリペプチドは、P O S H、P O S H マルチマー、R I N G ドメインと S H 3 ドメインとを含むポリペプチド、Brca1、Bard1、Nef、Rac、Rac1、PAK1、PAK2、PAKファミリー、Vav、Cdc42、PI3K、Nedd4、src、srcファミリーポリペプチド、gag、tsg101、VASP、RNB6、WASP、N-WASP、KIAA0674 からなる群から選択される、請求項 5 3 に記載の方法。 20

【請求項 5 5】

前記試験物質は、ポリペプチド、抗体、小分子またはペプチドミメティクスである、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

P O S H 核酸及び試験化合物を提供すること、及び P O S H 核酸と結合する試験化合物を同定することを含む、抗ウイルス薬を同定するための方法。 30

【請求項 5 7】

前記 P O S H 核酸は、配列番号 1、3、4、6、8 及び 10 からなる群から選択される、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記試験物質は、リボ核酸、アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNA i コンストラクト、DNA 酵素及びリボザイムである、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記試験物質と前記 P O S H 核酸との結合によって、P O S H 転写のレベルを低下させる、請求項 5 9 に記載の方法。 40

【請求項 6 0】

P O S H 媒介性ウイルス放出核酸及び試験物質を提供すること、及び P O S H 媒介性ウイルス放出核酸と相互作用する試験物質を同定することを含む、抗ウイルス薬を同定するための方法。

【請求項 6 1】

前記 P O S H 媒介性ウイルス放出核酸は、P O S H、P O S H マルチマー、R I N G ドメインと S H 3 ドメインとを含むポリペプチド、Brca1、Bard1、Nef、Rac、Rac1、PAK1、PAK2、PAKファミリー、Vav、Cdc42、PI3K、Nedd4、src、srcファミリーポリペプチド、gag、tsg101、VASP、RNB6、WASP、N-WASP、KIAA0674 からなる群から選択される、請求項 6 0 に記載の方法。 50

【請求項 6 2】

前記試験物質は、リボ核酸、アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNAi コンストラクト、DNA 酵素及びリボザイムである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

試験物質を含む組成物をウイルスゲノムの少なくとも 1 部でトランスフェクトされた細胞に投与すること、及び

試験物質の、ウイルス又はウイルス様粒子産生への影響を測定すること、をさらに含む請求項 4 5 ~ 6 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 4】

抗ウイルス薬は、エンベロープウイルス、レトロイドウイルス及び RNA ウイルスからなる群から選択されるウイルスに対して有効である、請求項 4 8 ~ 6 2 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 6 5】

- a) 前記レトロイドウイルスがレンチウイルスである、
- b) 前記レトロイドウイルスが HIV 1 型レンチウイルスである、
- c) 前記 RNA ウイルスがフィロウイルスである、または、
- d) 前記 RNA ウイルスがエボラフィロウイルスである、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

配列番号 2 に少なくとも 8 0 % 一致する POSH ポリペプチド及び試験物質を提供すること、及び 20

前記 POSH ポリペプチドと結合する試験物質を同定すること、を含む、抗アポトーシス薬を同定する方法。

【請求項 6 7】

前記試験物質が SH3 ドメインおよび RING ドメインからなる群から選択されるドメインと結合する、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記ポリペプチドは、細胞中で発現される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記 POSH ポリペプチドが精製されたポリペプチドである、請求項 6 6 に記載の方法。 30

【請求項 7 0】

POSH 核酸と結合する試験物質を同定することを含む、抗アポトーシス薬を同定するための方法。

【請求項 7 1】

前記試験物質は、リボ核酸である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記試験物質を、POSH ポリペプチドを過剰発現する細胞に投与すること、及び試験物質の POSH 誘導性アポトーシスを測定することをさらに含む、請求項 6 6 ~ 7 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 3】

POSH 活性を阻害する物質の有効量を投与することを含む、それを必要とする被験体における感染を阻害する方法。 40

【請求項 7 4】

前記物質は、POSH ポリペプチドのユビキチンリガーゼ活性を阻害する、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記物質は、小分子、抗体、抗体のフラグメント、ペプチドミメティクス及びポリペプチドである、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記物質は、POSH ポリペプチドと POSH -A P との間の相互作用を阻害する、請 50

求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記 P O S H - A C は、E 2、P O S H ポリペプチド、ユビキチン及びGTPaseからなる群から選択される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記GTPaseがRacである、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記Rac がRac1である、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記物質は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNA i コンストラクト、DNA 酵素 およびリボザイムからなる群から選択される、請求項 7 3 に記載の方法。 10

【請求項 8 1】

前記RNA i コンストラクトが、配列番号 1 5、1 8、1 8、1 9、2 1、2 2、2 4 及び 2 5 のいずれをも含む群から選択される、請求項 8 0 に記載のリボ核酸。

【請求項 8 2】

前記物質はP O S H mRNAのレベルを減少させる、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 3】

P O S H 遺伝子の 1 以上の組換えコンストラクトを含有する、複数の細胞を含む非ヒトトランスジェニック動物であって、前記P O S H 遺伝子の発現が機能表現型のP O S H 喪失を軽減する、非ヒトトランスジェニック動物。 20

【請求項 8 4】

前記 1 以上の組換えコンストラクトが胚形成期の前記動物または前記動物の祖先に導入される、請求項 8 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 8 5】

請求項 8 3 に記載のトランスジェニック動物の単離された細胞。

【請求項 8 6】

前記細胞が生殖細胞である、請求項 8 5 に記載の細胞。

【請求項 8 7】

前記細胞が体細胞である、請求項 8 5 に記載の細胞。

【請求項 8 8】

全ての生殖細胞および体細胞が前記P O S H 遺伝子の 1 以上の組換えコンストラクトを含む、請求項 8 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。 30

【請求項 8 9】

前記組換えコンストラクトは、マクロインジェクション、エレクトロポレーション、又はリポフェクションによって胚に導入される、請求項 8 4 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 9 0】

前記非ヒト動物は、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、雌牛及びサルから選択される、請求項 8 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 9 1】

前記P O S H 遺伝子がヒトP O S H トランスジーンである、請求項 8 3 に記載の非ヒト動物。 40

【請求項 9 2】

P O S H トランスジーンを凍結卵子に導入すること、および前記凍結卵子を移植することを含む、請求項 8 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法。

【請求項 9 3】

機能表現型の前記P O S H 喪失は、ウイルス/ウイルス様粒子の産生を低下させる、請求項 8 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法。

【請求項 9 4】

請求項 8 3 に記載の非ヒト動物に試験化合物を投与すること、及び機能表現型のP O S 50

H喪失を促進するときの前記試験化合物の効果をアッセイすることを含む、ウイルス感染を治療するために使用される物質をスクリーニングする方法。

【請求項 9 5】

(i) 請求項 8 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物を、エンベロープウイルス、レトロイドウイルスおよびRNAウイルスから選択されるウイルスで感染させること、(i i) ステップ (i) の非ヒトトランスジェニック動物を試験化合物と接触させること、及び(i i i) 治療された動物からのサンプルにおけるウイルス様粒子の作製と、治療されていないトランスジェニック動物又は対照物質を用いて治療されたトランスジェニック動物からのサンプルにおけるウイルス様粒子の作製とを比較することを含み、治療された動物のウイルス様粒子の作製の、治療されていないもしくは対照物質を用いて治療された場合のウイルス様粒子の作製の違いが、抗ウイルス可能性を示す、試験化合物の抗ウイルス可能性を評価する方法。

10

【請求項 9 6】

(i) ヒトPOSHトランスジーンを発現する生殖細胞系列と体細胞、またはそれに由来する細胞のサンプルを持つ、請求項 8 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物をエンベロープウイルス、レトロイドウイルスおよびRNAウイルスから選択されるウイルスで感染させること、

(i i) ステップ (i) の非ヒトトランスジェニック動物もしくはサンプルを試験化合物と接触させること、及び

(i i i) トランスジェニック動物からの検体中又はその細胞のサンプル中におけるウイルス様粒子の生成を測定することを含み、ウイルス様粒子の生成の、試験化合物を含まないウイルス様粒子の生成に対する、相対的な統計学的に重要な減少を示す、試験化合物の抗体ウイルス活性を評価する方法。

20

【請求項 9 7】

a) 前記レトロイドウイルスがレンチウイルスである、

b) 前記レトロイドウイルスがHIV 1型レンチウイルスである、

c) 前記RNAウイルスがフィロウイルスである、または、

d) 前記RNAウイルスがエボラフィロウイルスである、請求項 9 4 ~ 9 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 8】

POSHポリペプチドのユビキチン関連活性を阻害することを含む、ウイルス成熟を阻害する方法。

30

【請求項 9 9】

前記POSHポリペプチドが、配列番号 2、5、7、9 及び 1 1 からなる群から選択され、フラグメントが配列番号 2、5、7、9 及び 1 1 のいずれかに示された少なくとも 2 0 のアミノ酸を含む、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記POSHポリペプチドの前記RINGドメインの活性を阻害することを含む、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

小分子、抗体、ペプチドミメティクスおよびポリペプチドからなる群から選択される物質を投与することによってウイルス成熟が阻害される、請求項 9 8 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 2】

前記物質が、配列番号 3 0 に記載のエピトープと特異的に免疫反応する抗体もしくはそのフラグメントである、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNA i コンストラクト、DNA 酵素及びリボザイムからなる群から選択される物質を投与することによってウイルス成熟が阻害される、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

50

前記RNAiコンストラクトが、配列番号15、18、18、19、21、22、24及び25のいずれをも含む群から選択される、請求項103に記載の方法。

【請求項105】

エンベロープウイルス、レトロイドウイルスおよびRNAウイルスから選択されるウイルスの成熟を阻害することを含む、請求項98に記載の方法。

【請求項106】

- a) 前記レトロイドウイルスがレンチウイルスである、
- b) 前記レトロイドウイルスがHIV1型レンチウイルスである、
- c) 前記RNAウイルスがフィロウイルスである、または、
- d) 前記RNAウイルスがエボラフィロウイルスである、請求項105に記載の方法。

10

【請求項107】

ユビキチン関連活性と互換可能な、ユビキチン、E1、E2及びPOSHポリペプチドを含む混合物を形成すること、及び前記ユビキチンが前記POSHポリペプチドに結合するかどうかを検出することを含む、POSHポリペプチドのユビキチン関連活性を試験する方法。

【請求項108】

前記POSHポリペプチドが、配列番号2、5、7、9、11及び26からなる群から選択される、請求項107に記載の方法。

【請求項109】

前記ユビキチンが検出可能に標識されている、請求項107に記載の方法。

20

【請求項110】

前記POSHポリペプチドが検出可能に標識されている、請求項107に記載の方法。

【請求項111】

前記標識が、放射性同位体、蛍光化合物、酵素及び酵素コファクターから選択される、請求項109又は110に記載の方法。

【請求項112】

(i) ユビキチン、E2およびPOSHポリペプチドを含む混合物を、POSHポリペプチドのユビキチン化を促進する条件下で提供すること、
 (ii) 前記ユビキチン接合系を試験化合物と接触させること、
 (iii) 試験化合物の存在下での前記POSHポリペプチドのユビキチン化のレベルを測定すること、及び
 (iv) 試験化合物の存在下での、ユビキチン化の測定されたレベルと、好適な参照とを比較することを含み、候補物質の存在下での前記POSHポリペプチドのユビキチン化の低下が調節蛋白質のユビキチン化の阻害を示す、POSHポリペプチドのユビキチン関連活性の阻害を同定するアッセイ。

30

【請求項113】

前記ユビキチンは、
 -ユビキチン接合系がE1およびアデノシン三リン酸をさらに含む場合、非接合型ユビキチン、
 -活性化されたE1：ユビキチン接合体、および
 -活性化されたE2：ユビキチンチオエステル複合体から選択される、請求項112に記載のアッセイ。

40

【請求項114】

前記ユビキチンが検出可能に標識される、請求項112に記載のアッセイ。

【請求項115】

前記POSHポリペプチドが検出可能に標識される、請求項112に記載のアッセイ。

【請求項116】

POSHポリペプチド、配列番号26に示されたポリペプチド、及び配列番号30に示されたポリペプチドのいずれか1つの阻害剤ならびに薬学的に許容できる添加剤を含む、

50

治療的組成物。

【請求項 1 1 7】

前記阻害剤が、小分子、抗体、ポリペプチド及びペプチドミメティクスからなる群から選択される、請求項 1 1 6 に記載の治療的組成物。

【請求項 1 1 8】

前記阻害剤が、POSHポリペプチドとPOSH-APの間の相互作用を破壊し、及び/又はPOSHポリペプチドのユビキチン関連活性を阻害する、請求項 1 1 6 に記載の治療的組成物。

【請求項 1 1 9】

前記阻害剤は、配列番号 3 0 に示されたポリペプチドである、請求項 1 1 6 に記載の治療的組成物。 10

【請求項 1 2 0】

前記阻害剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、DNA酵素、RNAiコンストラクトおよびリボザイムからなる群から選択される、請求項 1 1 6 に記載の治療的組成物。

【請求項 1 2 1】

前記RNAiコンストラクトが、配列番号 1 5、1 8、1 8、1 9、2 1、2 2、2 4及び2 5のいずれをも含む群から選択される、請求項 1 1 6 に記載の治療的組成物。

【請求項 1 2 2】

POSHポリペプチド及びユビキチンを含む組成物。

【請求項 1 2 3】

POSHポリペプチド-ユビキチン接合体。 20

【請求項 1 2 4】

POSHポリペプチド及びPOSH-APを含む複合体。

【請求項 1 2 5】

物質を、それを必要とする被験体に投与することを含み、前記物質がPOSH媒介性のウイルス放出を阻害する、ウイルス感染を阻害する方法。

【請求項 1 2 6】

前記物質が、POSH媒介性ウイルス放出ポリペプチドを阻害する、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記POSH媒介性ウイルス放出ポリペプチドは、POSH、POSHマルチマー、RINGドメインとSH3ドメインとを含むポリペプチドをコードする核酸、Brca1、Bard1、Nef、Rac、Rac1、PAK1、PAK2、PAKファミリー、Vav、Cdc42、PI3K、Nedd4、src、srcファミリーポリペプチド、gag、tsg101、VASP、RNB6、WASP、N-WASP、KIAA0674からなる群から選択される、請求項 1 2 6 に記載の方法。 30

【請求項 1 2 8】

POSHポリペプチドまたはPOSH媒介性ウイルス放出ポリペプチドのいずれかと関連するポリペプチドを同定することを含む、治療的インターベンションのための標的を同定する方法。

【請求項 1 2 9】

前記POSH媒介性ウイルス放出ポリペプチドは、POSH、POSHマルチマー、RINGドメインとSH3ドメインとを含むポリペプチドをコードする核酸、Brca1、Bard1、Nef、Rac、Rac1、PAK1、PAK2、PAKファミリー、Vav、Cdc42、PI3K、Nedd4、src、srcファミリーポリペプチド、gag、tsg101、VASP、RNB6、WASP、N-WASP、KIAA0674からなる群から選択される、請求項 1 2 8 に記載の方法。 40

【請求項 1 3 0】

ユビキチン、E 1、E 2 及びPOSHポリペプチドを含む混合物を形成すること、試験化合物を添加すること、および

前記POSHポリペプチドのユビキチンリガーゼ活性を検出することを含み、

前記POSHポリペプチドのリガーゼ活性を減少させる化合物が潜在的抗ウイルス薬で 50

ある、化合物の抗ウイルス可能性を評価するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2001年11月9日に出願された米国仮特許出願第60/345,846号及び2002年3月15日に出願された米国仮特許出願第60/364,530号の出願日の利益を主張する。これらの出願の内容全体を本明細書中に引用によって援用する。

【背景技術】

【0002】

潜在的な薬物標的の評価は、DNA、RNA又は蛋白質分子が疾患のプロセスに関連しているかどうか、したがって、新たな治療薬開発のための好適な標的となるかどうかを決定することを含む。薬物の発見、それによって生理活性化合物が同定され、特徴づけられるプロセスは、ヒト疾患の新たな治療の開発における重要なステップである。薬物発見の背景は、ゲノム化学の革命のために劇的に変化している。DNA及び蛋白質配列は、新たな薬物標的の宿主及び無数の関連情報を生み出している。

【0003】

種々の疾患状態、又は炎症や免疫反応などの重要な生物学的プロセスに關与する遺伝子及び蛋白質の同定は、薬物設計プロセスに不可欠の部分である。もし適切な分子標的を同定することができ、適切なアンタゴニストを開発することができれば、その状態の分子的病因に関わる1以上の遺伝子の発現を減少させることによって、多くの疾患及び障害を治療又は予防することができるであろう。例えば、1以上の細胞発癌遺伝子が活性化され、その結果として細胞周期プロセスの抑制されない進行が生じる癌を、適切な細胞周期コントロール遺伝子をアンタゴナイズすることによって治療することができるだろう。さらに、ハンチントン病のような、多くのヒト遺伝子病ならびに遺伝子的及び後成的因子の双方の影響を受けるいくつかのプリオン状態は、その機能の完全な喪失に反するような、ポリペプチドの不適切な活性によって生じる。したがって、そのような突然変異遺伝子の異常な機能をアンタゴナイズすることは、治療の手段を提供するだろう。さらに、そのような遺伝子の異常な機能は、治療手段を提供するだろう。さらに、HIVのような感染症は、HIVプロテアーゼまたは逆転写酵素などの特異的な必須のレトロウイルス蛋白質を標的とした分子アンタゴニストによる治療が功を奏してきた。そのような疾患及び障害を治療するための薬物療法は、疾患遺伝子のポリペプチド産物を標的とする分子アンタゴニストを頻用してきた。しかしながら、関連する遺伝子又は蛋白質標的の発見は、困難であり、時間がかかることが多い。

【0004】

特に興味深い領域の1つは、ウイルスの生命周期中、ウイルスによって協調される宿主遺伝子及び蛋白質の同定である。多くのウイルス中に見られる高い突然変異の率と組み合わせられた多くのウイルス病の重篤かつ不治の性質によって、抗ウイルス薬の同定が世界の健康の増進の最優先事項となっている。ウイルスの生命周期に關与する遺伝子及び蛋白質も研究対象となってきた。なぜなら、そのような遺伝子及び蛋白質は宿主の細胞中に典型的に付加的活性をもたらし、他の非ウイルス病の状態に役割を果たすかもしれないからである。

【0005】

ウイルス成熟はGag蛋白質の蛋白分解処理と種々の宿主蛋白質の活性に關与する。エクソ/エンドサイト-シス及びユビキチン結合のための細胞の仕組みがその成熟に關与しているかもしれないと考えられている。特に、構築、出芽、及びそれに続くレトロイドウイルス、RNAウイルス及び種々のレトロウイルス、ラプトウイルス、レンチウイルス及びフィロウイルスなどのエンベロープウイルスの放出には、Gagポリ蛋白質が關与するかもしれない。合成後、Gagは、原形質膜を標的とし、そこで新生ウイルス粒子の出芽を誘導する。

10

20

30

40

50

【0006】

ウイルスの構築におけるユビキチンの役割は、成長したウイルス粒子が非結合型ユビキチンに富んでいることを観察したDuniganら(1988, *Virology* 165, 310, Meyersら、1991, *Virology* 180, 602)によって示唆された。より最近になって、プロテアソーム阻害剤が、HIV-1、HIV-2及びSIV及びRSV Gag由来のウイルス様粒子の放出を抑制することがわかった。また、阻害剤は、Gagプロセシング及び感染粒子への成長に影響を及ぼす(Schubertら、2000, *PNAS* 97, 13057, Hartyら、2000, *PNAS* 97, 13871, Strackら、2000, *PNAS* 97, 13063, Patnaikら、2000, *PNAS* 97, 13069)。

【0007】

ユビキチン媒介性の蛋白質分解は、真核細胞の細胞間蛋白質の選択的な、制御された分解のための経路である。細胞内の種々の蛋白質標的ユビキチン改変は、遺伝子発現、細胞周期の調節、細胞表面受容体の改変、リボゾームの生合成、DNA修復の調節など多くの基礎的な細胞機能において重要と思われる。ユビキチン媒介系の主要な機能の1つは、細胞蛋白質の半減期の制御である。様々な蛋白質の半減期は、数分から数日の範囲となることができ、細胞のタイプ、栄養及び環境条件ならびに細胞周期の段階にかなり依存して変化することができる。

【0008】

恐らくユビキチン依存性プロテアソームの活性を介して選択的分解を行う標的蛋白質は、ユビキチンのC-末端グリシル残基と基質蛋白質の特異的なリシル残基との間のイソペプチド結合の形成を介してユビキチンで共有的にタグを付ける。このプロセスは、ユビキチン活性化酵素(E1)及びユビキチン接合酵素(E2)によって触媒され、いくつかの例においては、このプロセスは、補助的な基質認識蛋白質(E3)も必要である。第1のユビキチン鎖の連結、ユビキチンの追加的な分子は、枝分かれした多ユビキチン鎖を形成するための、あらかじめ結合した部分のリジン側鎖に付着するのかもしれない。

【0009】

ユビキチンと蛋白質基質との結合は、マルチステッププロセスである。最初のATP要求ステップにおいて、ユビキチンのC末端とE1酵素の内部システイン残基との間にチオエステルが形成される。その後、活性化されたユビキチンは、複数のE2酵素のうちの1つの上の特異的なシステインに移されるようである。最後に、これらのE2酵素は、典型的には、ユビキチン酵素としても知られているC3蛋白質の援助を介して、ユビキチンを蛋白質基質に提供する。いくつかの例では、基質は、ユビキチン結合E2酵素によって直接的に認識される。

【0010】

ユビキチン系は、細胞周期の進行、アポトーシス、及び多くの膜受容体の代謝回転を含む広範な細胞プロセスにおいて役割を果たす。ウイルス感染において、ユビキチン系は、構築、出芽及び放出のみならず、ウイルス誘導性新生物を導くこともあるp53のような宿主蛋白質の抑制にも関与する。HIV Vpu蛋白質は、I κ B分解を調節するE3蛋白質と相互作用し、NF- κ B活性を間接的に阻害することによって、感染した細胞のアポトーシスを促進すると考えられている(Bourら(2001) *J Exp Med* 194: 1299-311; 米国特許第5,932,425号)。ユビキチン系は、モノ-ユビキチン化(ubiquitination)及びポリユビキチン化(ubiquitination)の双方によって蛋白質機能を調節する。そして、ポリユビキチン化(ubiquitination)は、主に蛋白質分解と関連する。

【0011】

小胞輸送システムは、細胞小器官、原形質膜及び細胞外媒体における蛋白質の分配の主要経路である。小胞輸送システムは、直接的又は間接的に種々の疾患の状態に関与している。真核生物の細胞の主要な小胞輸送システムは、クラスリンコートされた小胞及びコートマーコートされた小胞によって媒介される系を含む。クラスリンコートされた小胞は、原形質膜と初期のエンドソームとの間の、ならびにトランス-ゴルジ体ネットワークからエンドソームへのエンドサイトーシスを媒介する受容体などの場合、通常輸送に関与する。コートマーコートされた小胞は、コート蛋白質I(COP-1)コートされた小胞及び

COP-I Iコートされた小胞を含み、その両方は、ERとゴルジ体システムの間の種々の分子の輸送を媒介する傾向がある。それぞれの場合において、小胞は、コート蛋白質でコートされた膜の蛋白質から出芽させることによって形成され、小胞は、標的分子に融合する前にそのコートを脱落させる。

【0012】

クラスリンは、細胞質の膜表面の構築物をコートし、最終的に摘み取られて小胞となるピットを形成する。クラスリン自身は、クラスリン三本脚を形成する、クラスリン重鎖とクラスリン軽鎖の2つのサブユニットで構成される。クラスリンは、アッセンブリ蛋白質、AP180、アダプタ複合体 (AP1、AP2、AP3及びAP4)、 α -アレスチン、アレスチン3、オーキシリン (auxilin)、エプシン、Eps15、v-SNARE、アンピフィシン (amphiphysins)、ダイナミン、シナプトジャミン (synaptojanin) 及びエンドフィリンを含む他の蛋白質の宿主と関連する。アダプタ複合体は、クラスリンケージ形成を促進し、クラスリンが膜、膜蛋白質及び前述の成分の多くと結合するのを助ける。AP1は、トランス-ゴルジ体ネットワーク由来のクラスリンコート小胞と関与し、 α 1、 μ 1及び σ 1ポリペプチド鎖を含有する。AP2は、エンドサイトーシス性クラスリンコート小胞と関与し、 α 2、 μ 2及び σ 2ポリペプチド鎖を含有する。クラスリン複合体及び他の蛋白質との相互作用は、SH3 (Srcホモロジー3)ドメイン、PH (プレクトリンホモロジー)ドメイン、EHドメインおよびNPFドメインなどの複合体蛋白質に見いだされる種々のドメインによって媒介される (Marshら、(1999) Science 285:215-20; Pearseら、(2000) Curr Opin Struct Biol 10(2):220-8)。

10

20

【0013】

コートマーでコートされた小胞の形成は、その同族のグアニンヌクレオチド交換ファクタ (例えば、SEC12、GEA1、GEA2) によって、小さなGTPase (例えば、ARF又はSAR) を補充することによって開始される。最初の複合体は、コート蛋白質複合体 (COP I又はCOP II) によって認識される。その後コートは、膜全体に成長し、種々のcargo蛋白質が成長ネットワーク中に封入される。最終的に、膜は隆起し、小胞となる。コート蛋白質は、GTPaseのGTPase活性を刺激し、GTPの加水分解によって、コート蛋白質は、複合体から放出され、小胞を脱コートする。コートマーでコートされた小胞と関連する他の蛋白質には、v-SNAREs、Rab GTPases及び、適切なcargo蛋白質の補充を助ける種々の受容体が含まれる (Springerら、(1999) Cell 97: 145-48)。

30

【0014】

とりわけ、薬物スクリーニング方法において、これらのプロセスの1以上に関連する蛋白質を同定することは有益である。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0015】

部分的に、本願は、新規なユビキチンリガーゼ、POSH (SH3ドメインに富んだ) 核酸配列、及びそれによってコードされた蛋白質を提供する。いくつかの態様において、POSHは、ウイルス成熟において役割を果たす。任意に、POSHは、ウイルス放出を媒介する複合体の構築又は輸送において作用する。1つの態様において、POSHポリペプチドは、いくつかの蛋白質のユビキチン化を刺激するか、又は膜融合を刺激するか、又はその両方を行うことができる。当該技術の当業者が容易に理解できるであろうように、POSH蛋白質は、多数の異なる複合体を異なる時期に形成することができる。いくつかの態様において、本発明は、POSH (POSH AP) と関連するポリペプチド及びPOSHが媒介する生物学的プロセスに関与するポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、POSHポリペプチドは、小胞輸送において機能を果たす。更なる態様において、POSHポリペプチドは、Racシグナリング経路を調節する。さらに別の態様において、POSHポリペプチドは、JNK経路を調節する。さらに別の態様において、POSHポリペプチドは、NF-kBを調節する。別の態様において、POSHポリペプチドは、アポトーシスを調節する。

40

50

【0016】

いくつかの局面において、本発明は、核酸配列及びそれによってコードされる蛋白質、ならびにその核酸配列に由来するオリゴヌクレオチド、コードされた蛋白質に対する抗体、POSHを調節する物質を同定するためのスクリーニングアッセイ、ならびにウイルス、好ましくはエンベロープウイルス、RNAウイルス及び特にレトロイドウイルスに感染した細胞を検出する診断方法を提供する。

【0017】

ある局面において、本発明は、配列番号1、3、4、6、8及び/又は10の配列又はそれらの相補配列にストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸を提供する。関連する態様において、核酸は、配列番号1、3、4、6、8及び/又は10又はその相補配列の、少なくとも約12、少なくとも約15、少なくとも約25、少なくとも約40、少なくとも約100、少なくとも約300、少なくとも約500、少なくとも約1000、又は少なくとも約2500の連続するヌクレオチドから全長までに対応する配列に少なくとも約80%、90%、95%又は97~98%又は100%一致する核酸である。

10

【0018】

ある局面において、本発明は、配列番号31~35の配列又はその相補配列にストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸を提供する。関連する態様において、核酸は、配列番号31~35の配列又はその相補配列の、少なくとも約12、少なくとも約15、少なくとも約25の連続するヌクレオチドから全長までに対応する配列に少なくとも80%、90%、95%又は97~98%又は100%一致する。

20

【0019】

他のいくつかの態様において、本発明は、配列番号1、3、4、6、8、及び/又は10の配列又はその相補配列にストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、又は配列番号1、3、4、6、8及び/又は10又はその相補配列の、少なくとも約12、少なくとも約15、少なくとも約25、少なくとも約40、少なくとも約100、少なくとも約300、少なくとも約500、少なくとも約1000、又は少なくとも約2500の連続するヌクレオチドから全長までに対応する配列に少なくとも80%、90%、95%又は97~98%又は100%一致するヌクレオチド配列、及び前記ヌクレオチド配列に作動可能に連結し、そのヌクレオチド配列を発現ベクターとして好適に使用できるようにした転写調節配列を含む核酸を提供する。別の態様において、核酸は、原核細胞又は真核細胞において複製することが可能な発現ベクター中に含まれていてもよい。関連する態様において、本発明は、発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

30

【0020】

さらに別の態様において、本発明は、配列番号1、3、4、6、8及び/又は10、又はその相補配列の少なくとも約12、少なくとも約15、少なくとも約25、少なくとも約40の連続するヌクレオチドから、前記配列がそのフラグメントである遺伝子の全長までに対応する、核酸プローブにストリンジентな条件下でハイブリダイズする、略純粋な核酸を提供する。本発明はまた、配列番号1及び/又は3、又はその相補配列の、少なくとも12、少なくとも25又は少なくとも50の連続するヌクレオチド全長までに対応するストリンジентな条件下でハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドアナログを提供する。

40

【0021】

さらに別の態様において、本発明は、配列番号2、5、7、9又は11のいずれか、又はその相補配列に示されたアミノ酸配列をコードする核酸を含む核酸を提供する。関連する態様において、コードされたアミノ酸配列は、配列番号2、5、7、9又は11の、少なくとも約12、少なくとも約15、少なくとも約25、又は少なくとも約40、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400又は少な

50

くとも約500の連続するアミノ酸から全長までに対応する配列に少なくとも約80%、90%、95%又は97~98%又は100%一致する。

【0022】

別の態様において、本発明は、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含むプローブ/プライマーを提供する。前記オリゴヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、3、4、6、8及び/又は10又はその相補配列から選択されるセンスまたはアンチセンス配列の、少なくとも約12、少なくとも約15、少なくとも約25、少なくとも約40の連続するヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含有する。好ましい態様において、プローブは、標的核酸に選択的にハイブリダイズする。別の態様において、プローブは、そこに付着され、取り外すことができる標識基を含んでもよい。該標識基は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素及び酵素コファクターから選択される。本発明はさらに、固体支持体に付着された、上記の少なくとも約10、少なくとも約25、少なくとも約50、又は少なくとも約100の異なるプローブのアレイをさらに提供する。

10

【0023】

別の態様において、本発明は、ポリペプチドを提供する。ある態様において、本発明は、配列番号1、3、4、6、8及び/又は10、又はその相補配列、又はそれらの少なくとも約25、又は少なくとも約40のアミノ酸を含むフラグメントに、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされたアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。

20

【0024】

好ましい態様において、POSHポリペプチドは、配列番号2、5、7、9又は11のいずれかに一致する又は相同の配列を含む。例えば、POSHポリペプチドは、好ましくは配列番号2、5、7、9又は11のいずれかによって表されるポリペプチドに少なくとも60%相同する、及び、例えば、80%、90%又は95%といった、より高い配列相同性を持つポリペプチドもまた意図されている。POSHポリペプチドは、配列表に表されているような全長蛋白質を含むことができる。あるいは、それはフラグメント、例えば、少なくとも5、10、20、50、100、150、200、250、300、400又は500、又はそれ以上の長さのアミノ酸を含むことができる。

【0025】

別の態様において、本願は、配列番号26~30のいずれかに80%、90%又は95%一致する、又は相同する配列を含むポリペプチドを提供する。

30

【0026】

別の好ましい態様において、本発明は、POSHポリペプチドの精製されたポリペプチドもしくは組換えポリペプチドを特徴とする。そのポリペプチドは、野生型POSH蛋白質の活性を調節、例えば、模倣もしくはアンタゴナイズする能力を有している。好ましくは、ポリペプチドフラグメントは、配列番号2、5、7、9又は11のいずれかに示されたアミノ酸配列に一致するもしくは相同する配列を含む。

【0027】

さらに、以下に示すように、POSHポリペプチドは、天然に存在する形態の蛋白質、例えば、ポリペプチドの生物学的活性の、アゴニスト(例えば、模倣物)あるいはアンタゴニストとなり得る。例えば、POSH蛋白質又はPOSH複合体の、固有の生物学的活性、例えば、酵素活性、他の細胞成分への結合、細胞の区分化、膜認識などを調節することができる。

40

【0028】

対象の蛋白質は、融合蛋白質の形態などのキメラ分子として提供することもできる。例えば、POSHポリペプチドは、第2のポリペプチド部分、例えば、例えば、POSHに関連しない(非相同の)アミノ酸配列を持つ第2のポリペプチドを含む組換え融合蛋白質として提供することができる。例えば、第2のポリペプチド部分は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼである、例えば、第2のポリペプチド部分は、アルカリホスファター

50

ぜのような酵素活性がある。例えば、第2のポリペプチド部分は、エピトープタグ標識である。

【0029】

本発明のさらに別の局面は、免疫原調製においてPOSHポリペプチドを含む免疫原に関する。その免疫原は、POSHポリペプチドに特異的な免疫反応、例えば、液性応答、例えば、抗体反応、例えば、細胞反応を誘発することができる。好ましい態様において、免疫原は、配列番号2で表される蛋白質からの抗原決定基、例えば、独特の決定基を含む。

【0030】

さらに別の局面において、本発明は、1以上のPOSHポリペプチドと免疫反応する抗体を提供する。1つの態様において、抗体は、POSHポリペプチド由来のSH3ドメイン又はRINGドメインに特異的である。1つのより具体的な態様において、ドメインは、配列番号2に示されたアミノ酸配列の一部である。一連の対応の例において、抗体は、配列番号2のアミノ酸137~192、199~258、448~505及び832~888及び、配列番号27~20のいずれかによって示される1以上のSH3ドメインに結合する。別の実施態様例において、抗体は、配列番号2のアミノ酸12~52によって表され、配列番号26に示されている、RINGドメインに結合する。別の態様において、抗体は、配列番号2に示されているアミノ酸配列に少なくとも80%一致する、少なくとも90%一致する、又は少なくとも95%一致するアミノ酸配列を持つ1以上の蛋白質と免疫反応する。他の態様において、抗体は、配列番号2に示されているアミノ酸配列に少なくとも85%、90%、95%、98%、99%又は一致するアミノ酸配列を持つ1以上の蛋白質と免疫反応する。

【0031】

いくつかの態様において、対象となるPOSH核酸は、転写調節配列、例えば、少なくとも1つの転写プロモーター又は転写エンハンサー配列を含む。その調節配列は、作動可能にPOSH配列と結合している。そのような調節配列は、POSH配列を発現ベクターとして好適使用できるものとしている。

【0032】

さらに別の局面において、本発明は、POSHポリペプチドと、GTPase又はレトロウイルスのようなRNAウイルスの後のドメイン領域などのPOSH関連蛋白質(POSH-AP)との間の相互作用の阻害剤または促進剤としての試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。例えば方法は、(i)POSH-AP、POSHポリペプチド及び試験化合物を、例えば、試験化合物のない状態で、POSHポリペプチド及びPOSH-APが相互作用できる条件で混合するステップ、及び(ii)POSHポリペプチド及びPOSH-APを含む複合体の形成を検出するステップを含む。試験化合物の存在下での複合体の形成における、(試験化合物の非存在下で観察されるものに比べての)統計的に有意な変化、例えば減少は、POSHポリペプチド及びPOSH-AP間の相互作用の調節、例えば、阻害を示すものである。

【0033】

さらに別の態様において、本発明は、POSHポリペプチド及びPOSH-AP間の相互作用を阻害もしくは強化する試験化合物を同定するためのアッセイを提供する。それは、(a)POSHポリペプチド、POSH-AP及び試験化合物の反応混合物を作製すること、及び前記POSHポリペプチドと前記POSH-APとの結合を検出することを含む。試験化合物の存在下での前記POSHポリペプチドと前記POSH-APとの結合の、試験化合物の非存在下での結合に対する相対的な変化は、前記試験化合物が、POSHポリペプチドとPOSH-APとの間の結合を促進または阻害することを示す。

【0034】

更なる態様において、本発明は、(a)POSHポリペプチド、POSH-AP及び試験化合物を含む反応混合物を形成すること、ならびに(b)該反応混合物と試験化合物とを接触させること、(c)試験化合物の1以上の活性を測定することを含む蛋白質複合体

10

20

30

40

50

のモジュレーターを同定する方法に関する。活性の例としては、蛋白質複合体のレベルの変化、複合体の酵素活性の変化、反応混合物が細胞全体である場合は、複合体又はその成分の細胞質膜における局在性の変化、又は P O S H ポリペプチドと P O S H - A P の間の相互作用の変化を含む。

【 0 0 3 5 】

更なる態様は、P O S H ポリペプチドと P O S H - A P の間の相互作用を阻害するもしくは促進する物質を同定するためのスクリーニングアッセイであって、配列番号 2 の P O S H ポリペプチド部分を含む第 1 の融合蛋白質及び P O S H - A P 部分を含む第 2 の融合蛋白質を含む 2 - ハイブリッドアッセイシステムを、前記 2 つのハイブリッドアッセイが前記第 2 の融合蛋白質の P O S H ポリペプチド部分と前記第 2 のポリペプチドの前記 P O H S - A P 部分との相互作用に対して感受性を有する条件下において提供すること；試験化合物の存在下及び不存在下で前記融合蛋白質間の相互作用のレベルを測定すること；ならびに、前記融合蛋白質間の相互作用のレベルどうしを比較することを含み、相互作用のレベルの減少は、P O S H ポリペプチドと P O S H - A P 間の相互作用を阻害する物質であることを示す、スクリーニングアッセイである。

10

【 0 0 3 6 】

更なる局面において、本発明は、P O S H ポリペプチドと少なくとも 1 つの P O S H - A P の組合せを含む単離された蛋白質複合体を提供する。いくつかの態様において、P O S H 複合体は、クラスリンで覆われた小胞体の形成に関する。更なる態様において、P O S H 複合体は、Gag のようなウイルス蛋白質を含む。いくつかの態様において、P O S H 複合体は、ユビキチンを含む P O S H 複合体（例えば、共有もしくは非共有の P O S H ユビキチン接合体）、E2、E1 又はユビキチン化された標的における場合のように、P O S H のユビキチン関連活性に関する。

20

【 0 0 3 7 】

更なる局面において、本発明は、P O S H を操作するための核酸治療を含む。ある態様において、本発明は、配列番号 1 及び / 又は 3 又はその相補配列に少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 % 又は任意に 1 0 0 % 一致する核酸配列の 5 ~ 1 0 0 0 の連続するヌクレオチドを含むリボ核酸を提供する。任意にリボ核酸は、少なくとも 1 0、1 5、2 0、2 5 又は 3 0 の連続するヌクレオチド、及び P O S H 核酸の 1 0 0 0、7 5 0、5 0 0 及び 2 5 0 以下の連続するヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、リボ核酸は、R N A i オリゴマー又はリボザイムである。好ましくは、リボ核酸は、P O S H m R N A のレベルを減少させる。リボ核酸は、配列番号 1 5、1 6、1 8、1 9、2 1、2 2、2 4 及び 2 5 のいずれかから選択される配列を含むことが好ましい。

30

【 0 0 3 8 】

本発明はまた、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、雌牛、又はトランスジェーンを持つ非ヒト霊長類、例えば、本明細書に記載の異種の形態の P O S H 遺伝子を含む（好ましくは発現する）動物である、トランスジェニック非ヒト動物を特徴とする。そのようなトランスジェニック動物は、H I V 感染などのウイルス感染の研究の、又は、ウイルス感染のスクリーニングに用いる動物モデルとしての役割を果たす。

【 0 0 3 9 】

更なる局面において、本発明は、核酸治療の送達のための組成物、例えば、リポソーム及び / 又は薬学的に許容できる添加物もしくは担体を含む組成物を提供する。

40

【 0 0 4 0 】

本発明のプラクティスは、特に記載のない限り、当該技術の技量の範囲内の、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換え D N A 及び免疫学の常法を採用する。そのような技法は、文献に十分に説明されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual、第 2 版、Sambrook、Fritsch 及び Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press : 1989) ; DNA Cloning、I、II 巻 (D. N. Glover ed .、1985) ; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed .、1984) ; Mullis ら、米国特許第 4,683,195 号 ; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds.

50

1984) ; Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984) ; Culture Of Animal Cells (R.1. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986) ; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ; Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wuら, eds.) , Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer 及び Walker, eds., Academic Press, London, 1987) ; Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir 及び C. C. Blackwell, eds., 1986) ; Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986) を参照されたい。 10

【 0 0 4 1 】

本発明の他の特徴及び利点は、下記の詳細な説明及び請求の範囲から明らかとなるであろう。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 4 2 】

1. 定義

用語「結合」は、生理学的条件下での、例えば、共有結合、静電結合、疎水結合、イオン結合及び/又は水素結合相互作用による2つの分子間の直接的な会合を意味する。

【 0 0 4 3 】

「キメラ蛋白質」又は「融合蛋白質」は、ポリペプチドをコードする第1のアミノ酸配列と、第1のアミノ酸配列のいずれのドメインとも異なり、実質的に相同でないドメインを定める第2のアミノ酸配列との融合である。キメラ蛋白質は、(異なる蛋白質中ではあるが)微生物中に見出される外来ドメインを提示することもあるし、又は、異なる種類の微生物によって発現される蛋白質構造の「種間」、「遺伝子間」融合などのこともある。

【 0 0 4 4 】

用語「化合物」、「試験化合物」及び「分子」は、本明細書において互換可能に用いられており、それは、限定されないが、ペプチド、核酸、炭水化物、有機小分子、天然産物の抽出ライブラリー、及び他のあらゆる分子(限定されないが、化学物質、金属及び有機金属化合物を含む)を含むことが意図されている。 30

【 0 0 4 5 】

「保存アミノ酸置換基」という表現は、いくつかの共通の特性を基礎としたアミノ酸の分類を意味する。個別のアミノ酸どうしの共通の特徴を定義するための機能的な方法は、相同微生物の対応する蛋白質の間のアミノ酸の変化の正規度数を分析することである (Schulz, G. E. 及び R. H. Schirmer., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。そのような分析にしたがって、アミノ酸の基を定義することができる。1つのグループ内のアミノ酸は、互いに交換でき、したがって、蛋白質構造全体に及ぼす影響において互いに多くの点で類似している (Schulz, G. E. 及び R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。アミノ酸のグループの例としては、

- (i) Glu 及び Asp, Lys, Arg 及び His からなる荷電グループ、 40
- (i i) Lys, Arg 及び His からなる正に荷電したグループ、
- (i i i) Glu 及び Asp からなる負に荷電したグループ、
- (i v) Phe, Tyr 及び Trp からなる芳香族グループ、
- (v) His 及び Trp からなる窒素環グループ、
- (v i) Val, Leu 及び Ile からなる大脂肪族非極性グループ、
- (v i i) Met 及び Cys からなる微極性グループ、
- (v i i i) Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln 及び Pro からなる小残グループ

(i x) Val, Leu, Ile, Met 及び Cys からなる脂肪族グループ、ならびに

(x) Ser 及び Thr からなる小ヒドロキシルグループ、があげられる。 50

【0046】

上で示したグループに加えて、それぞれのアミノ酸残基は、それ自身のグループを形成することができ、その個別のアミノ酸によって形成されたグループは、単純に当該技術において通常用いられる1及び/又は3文字の短縮記号で表すことができる。

【0047】

「保存残基」は、類似の蛋白質の範囲全体にわたって、比較的不変のアミノ酸である。しばしば、保存残基は、「保存アミノ酸置換基」について上記したように、類似のアミノ酸によって置換されることによるのみ変化する。

【0048】

本明細書に用いられる、「ドメイン」という語は、特定の構造を含み、及び/又は、特定の機能を果たす蛋白質の領域を意味する。

10

【0049】

本明細書で用いられる、「エンベロープウイルス」という語は、ウイルス放出プロセスにおいて、細胞膜及び/又はあらゆる細胞小器官膜を用いるあらゆるウイルスを意味する。

【0050】

「相同性」又は「同一性」又は「類似性」は、2つのペプチド間又は2つの核酸分子間で類似した配列を意味する。相同性及び同一性は、比較する目的で並べることができる各配列中の位置を比較することによって決定することができる。比較された配列中の等しい位置が、同じ塩基もしくはアミノ酸で占められているとき、分子はその位置において同一である。等しい部位が同じもしくは類似のアミノ酸残基（例えば、立体的性質、電気的性質）で占められているとき、その分子は、その位置において相同（類似）であると言える。相同性/類似性又は同一性のパーセンテージとしての表現は、比較する配列によって共有される位置における、同一もしくは類似のアミノ酸数の関数を基準とする。「関連がない」又は「非相同の」配列は、本発明の配列との同一性が40%未満、好ましくは25%未満の配列である。2つの配列を比較する際、残基（アミノ酸又は核酸）の不存在又は余剰残基の存在によっても相同性/類似性が減少する。

20

【0051】

用語「相同性」は、類似の機能又はモチーフを有する遺伝子又は蛋白質を同定するために用いられる配列の類似性の数学的に基礎付けられた比較を説明する。本発明の核酸配列及び蛋白質配列は、例えば、他のファミリーメンバー、関連する配列もしくはホモログを同定するための「クエリー配列」として用いられることもある。そのような検索は、Altschulら（1990）*J Mol. Biol.* 215:403-10のNBLASTプログラム及びXBLASTプログラム（バージョン2.0）を用いて行われる。BLASTヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム（スコア=100、ワード長=12）を用いて行うことができる。BLAST蛋白質検索は、本発明の蛋白質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム（スコア=50、ワード長=3）を用いて行うことができる。比較の目的で、ギャップのある配列を得るために、Gapped BLASTを、Altschulら（1997）*Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402に記載のように用いることができる。BLASTプログラムとGapped BLASTプログラムを用いる際、それぞれのプログラム（例えば、XBLAST及びBLAST）のデフォルトパラメータを用いることができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

30

40

【0052】

本明細書において用いられる「同一性」は、配列のマッチングを最大限するように、即ち、ギャップ及び挿入を考慮して配列を並べたとき、2以上の配列の対応する部分における、同一のヌクレオチド又はアミノ酸残基のパーセンテージを意味する。同一性は、限定されないが、*Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., 及びGriffin, H. G., eds., Humana Press, Ne

50

w Jersey、1994; Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje、G.、Academic Press、1987; and Sequence Analysis Primer、Gribskov、M.及びDevereux、J.、eds.、M Stockton Press、New York、1991; ならびに Carillo、H.及びLipman、D.、SIAM J. Applied Math.、48: 1073 (1988)に記載の方法を含む公知の方法によって容易に計算することができる。同一性を決定するための方法は、試験される配列の間のマッチングを最大限にするように設計される。さらに、同一性を決定するための方法は、公に入手可能なコンピュータプログラムに体系的にまとめられている。2つの配列の間の同一性を決定するためのコンピュータプログラム方法としては、限定されないが、GCGプログラムパッケージ (Devereux、J.ら、Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984))、BLAST P、BLASTN、及びFASTA (Altschul、S. F.ら、J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990) 及びAltschulら、Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))があげられる。BLAST Xプログラムは、NCBIやその他のソースから公に入手可能である (BLAST Manual、Altschul、S.ら、NCBI NLM NIH Bethesda、Md. 20894; Altschul、S.ら、J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。公知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性の決定に用いることができる。

【0053】

用語「イントロン」は、最初はRNAに転写されるが、後に除去され、その大半がプロセシングされたmRNA中には表れない核酸の部分と言う。イントロンの除去は、一般的にそれぞれ5'及び3'スプライス部位と言われる、5'末端及び3'末端における反応によって起こる。異なるスプライス部位の選択的な使用によって、スプライスバリエーションが生じる。イントロンは必ずしも2つの「エクソン」の間、又はアミノ酸をコードする部分の間に位置する必要はなく、代わりに、例えば、プロモーターと第1のエクソンの間に位置していてもよい。イントロンは、自己スプライシングすることもあり、mRNAからスプライスされることに細胞成分を要求することもある。「非相同のイントロン」は、天然にはコード配列に結合しないコード配列に挿入されるイントロンである。さらに、非相同のイントロンは、スプライス部位の1もしくは双方が望ましい資質を提供するように変化した、例えば、スプライス効率を上昇させる、もしくは減少させる、通常天然のイントロンでもよい。非相同のイントロンはしばしば、例えば、非相同の宿主中の遺伝子の発現を向上させるため、又はあるスプライスの他のスプライスに対する変形を増加させるために挿入される。一例として、ウサギ グロブリン遺伝子を用いることができ、それは、Promega Inc.からpCIベクターにおいて購入することができる。イントロンの他の例が、Lacy-Hulbertら、2001) Gene Ther 8(8):649-53に提供されている。

【0054】

本明細書において対象としている蛋白質及び蛋白質複合体に関して用いられる「単離された」という用語は、例えば、その蛋白質又は蛋白質複合体が内因的に見出される細胞環境中で、蛋白質又は複合体とともに通常存在するであろう蛋白質を本質的に含まない蛋白質及び蛋白質複合体の調製を意味する。したがって、単離された蛋白質複合体は、通常「混入する」であろう又はそのモジュレーターをスクリーニングするときの単離物内の複合体の研究の妨げとなるであろう細胞成分から単離されている。しかしながら、そのような「単離された」複合体は、対象となる蛋白質又は蛋白質複合体によって、その調節が研究される他の蛋白質を組み込んでもよい。

【0055】

DNA又はRNAのような核酸に関して本明細書で用いられている「単離された」という用語は、天然に存在しない形態の分子を意味する。さらに、「単離された核酸」は、フラグメントとして天然に存在しない、天然の状態で存在しないであろう核酸フラグメントを含むことが意図される。

【0056】

レンチウイルスとしては、霊長類レンチウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルスI型及び2型(HIV-1/HIV-2);チンパンジー(SIVcpz)、スーティーマンガベイ(SIVsmm)、アフリカミドリザル(SIVagm)、Syke'sサル(SIVs

y k)、マンドリル(S I V m n d)及びマカキー(S I V m a c)からのサル免疫不全ウイルス(S I V)がある。レンチウイルスにはまた、ネコレンチウイルス、例えば、ネコ免疫不全ウイルス(F I V);ウシレンチウイルス、例えば、ウシ免疫不全ウイルス(B I V);ヒツジレンチウイルス、例えば、マエディノビスナウイルス(M V V)及びヤギ関節炎脳炎ウイルス(C A E V)、ならびにウマレンチウイルス、例えば、ウマ感染性貧血ウイルス(E I A V)が含まれる。全てのレンチウイルスは、G a g、P o l及びE n v蛋白質に加えて、少なくとも2つの異なる調節蛋白質(T a t、R e v)発現する。霊長類レンチウイルスは、N e f、V p r、V p u、V p x及びV i fを含む他のアクセサリー蛋白質を含む。通常、レンチウイルスは、免疫不全症に加えて、神経性変性症及び関節炎を含む種々の疾患の原因物質である。種々のレンチウイルスのヌクレオチド配列は、下記のアクセッションナンバー(from J. M. Coffin、S. H. Hughes、及びH. E. Varmus、"Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press、199、7 p 804)でジーンバンクに見出すことができる: 1) H I V - 1: K03455、M19921、K02013、M3843 1、M38429、K02007及びM17449; 2) H I V - 2: M30502、J04542、M30895、J04498、M15390、M31113及びL07625; 3) S I V: M29975、M30931、M58410、M66437、L06042、M3262、M19499、M32741、M31345及びL03295; 4) F I V: M25381、M36968 及びUI 1820; 5) B I V: M32690; 6) E I A V: M16575、M87581及びU01866; 6) V i s n a: M10608、M51543、L06906、M60609及びM60610; 7) C A E V: M33677; ならびに8) ヒツジレンチウイルスM31646及びM34193。レンチウイルスD N Aは、American Type Culture Collection(A T C C)から入手することもできる。例えば、ネコ免疫不全ウイルスは、A T C C登録ナンバーVR-2333及びVR-3112で入手可能である。ウマ感染性貧血ウイルスAは、A T C C登録ナンバーVR-778で入手可能である。ヤギ関節炎脳炎ウイルスは、A T C C登録ナンバーVR-905で入手可能である。ビスナウイルスは、A T C C登録ナンバーVR-779で入手可能である。本明細書で用いられるところの「核酸」という語は、デオキシリボ核酸(D N A)、適切な場合には、リボ核酸(R N A)のようなポリヌクレオチドを意味する。この用語はまた、ヌクレオチド類似体によって作製されるR N AまたはD N Aの類似体、また、記載の態様に適用可能であるように、一本鎖(センスまたはアンチセンスなど)および二本鎖ポリヌクレオチドを等価物として含むことを理解すべきである。

10

20

30

40

50

【0057】

本明細書で用いられている「成熟」という用語は、産生、転写後プロセッシング、構築、及び/又はウイルス粒子を形成する蛋白質の放出を意味する。したがって、これは、細胞膜から新生のビリオンのウイルス蛋白質を摘み出す処理を含む。

【0058】

「膜結合蛋白質」は、内在性膜蛋白質である蛋白質ならびに安定に膜に結合している蛋白質を意味する。

【0059】

本明細書で用いられている「p6」又は「p6gag」は、ウイルスLドメインを含む蛋白質を意味する。p6ドメインに結合する抗体は、「抗p6抗体」と称する。p6はまた、人工的に作製された、例えば、一連のLモチーフを含むLドメインを含む蛋白質を意味する。「Gag蛋白質」又は「Gagポリペプチド」は、Gag活性を有するポリペプチド及び好ましくはL(即ちlate)ドメインを有するポリペプチドを意味する。Gag蛋白質の例としては、PXXP、PPXY、RXXPPXP、RPDPTAP、RPLPVPAP、RPEPTAP、YEDL、PTAPPEY 及び/又はRPEPTAPPEEなどのモチーフがあげられる。H I V p24は、Gagポリペプチドの例である。

【0060】

「POSH核酸」は、配列番号1、3、4、6、8及び10のいずれかに示されている配列ならびに本明細書に記載のバリエーションのいずれかを含む核酸である。

【0061】

「POSHポリペプチド」又は「POSH蛋白質」は、配列番号2、5、7、9及び11のいずれかに示されている配列、ならびに本明細書に記載の変形のいずれかを含むポリペプチドである。

【0062】

「POSH関連蛋白質」又は「POSH-AP」は、POSHポリペプチドと相互作用する及び/又は結合することが可能な蛋白質を意味する。通常、POSH-APは、POSHポリペプチドと直接的又は間接的に相互作用することができる。POSH-APの例を全体において述べる。

【0063】

ペプチド、蛋白質及びポリペプチドという語は、互換可能に用いられる。

【0064】

「精製された蛋白質」という語は、蛋白質又は好ましくは単離された形態、もしくは細胞又は細胞ライセート中の蛋白質と通常関連する他の細胞蛋白質を実質的に含まない蛋白質の調製物を意味する。「他の細胞蛋白質を実質的に含まない」（本明細書では「他の混入蛋白質が実質的に存在しない」とも言う）は、蛋白質を（乾燥重量で）20%未満、好ましくは5%未満の混入蛋白質を含む、それぞれの成分蛋白質の別個の調製を包含するものであると定義される。機能的な形態のそれぞれの成分蛋白質は、添付の実施例に記載のようなクローニングされた遺伝子を用いることによって、精製された調製物として調製することができる。「精製された」は、再構成された蛋白質混合物を生成するために用いられる成分蛋白質調製について言う場合、提示の分子が、他の蛋白質（特に、精製された調製物として、又は対象となる再構成された混合物の機能において、実質的に、成分蛋白質の特徴をマスクする、減少させる、混乱させる又は変更する他の蛋白質）のような他の生物学的高分子が実質的に存在しない状態で存在することを意味する。本明細書で用いられ

10

20

【0065】

「受容体」又は「受容体の機能を持つ蛋白質」は、細胞外リガンドもしくは細胞内であるが位相学的に細胞外の空間と等価の空間（例えば、ゴルジ体内部、核膜内部、リソソーム内部あるいは輸送小胞など）にあるリガンドと相互作用する蛋白質である。受容体の例は、本明細書において、種々の公的なデータベースと同様に注釈で示す。受容体はしばしば膜ドメインを持つ。

30

【0066】

「組換え核酸」は、組換えDNA技術によって別の核酸に隣接して配置されたあらゆる核酸である。「組み換えられた核酸」はまた、例えば、形質転換や統合、トランスポゾンホッピング（transposon hopping）あるいはウイルス挿入などの実験室遺伝子的技術によって、第2の核酸の隣に配置されたあらゆる核酸である。一般的に、組み換えられた核酸は、第2の核酸に天然には隣接して位置づけられない。

【0067】

用語「組換え蛋白質」は、組換えDNA技術によって作製された本発明の蛋白質を意味する。そこでは、通常、発現された蛋白質をコードするDNAが、宿主細胞を形質転換して、非相同の蛋白質を作製するために使用されることになる好適な発現ベクターに挿入される。さらに、組換え蛋白質をコードする組換え遺伝子に関する「～に由来する」という語は、「組換え蛋白質」の意味において、天然の蛋白質のアミノ酸配列、又は天然に存在する蛋白質の置換、欠失を含む突然変異によって生成されたものに類似するアミノ酸配列をもつ蛋白質を意味する。

40

【0068】

「RINGドメイン」又は「リングフィンガー」は、所定のオクテットのシステイン及びヒスチジン残基をもつ亜鉛結合ドメインである。いくつかのRINGドメインは、以下に示すコンセンサス配列（アミノ酸の名称は、表1に示す）：Cys Xaa Xaa Cys Xaa₁₀ .

50

${}_{20}$ Cys Xaa His Xaa $_{2-5}$ Cys Xaa Xaa Cys Xaa $_{13-50}$ Cys Xaa Xaa Cys or Cys Xaa Xaa Cys Xaa $_{10-20}$ Cys Xaa His Xaa $_{2-5}$ His Xaa Xaa Cys Xaa $_{13-50}$ Cys Xaa Xaa Cysを含む。いくつかのRINGドメインは、配列番号2及び配列番号26のアミノ酸12~52に少なくとも80%一致するアミノ酸配列として表される。好ましいRINGドメインは、配列番号26のアミノ酸配列に85%、90%、95%、98%及び最も好ましくは、100%一致する。本発明の好ましいRINGドメインは、種々の蛋白質パートナーと結合し、ユビキチンリガーゼ活性を持つ複合体を形成する。RINGドメインは、好ましくは少なくとも1つの下記の蛋白質型：Fボックス蛋白質、E2ユビキチン結合酵素及びcullinsと相互作用をする。

【0069】

「RNA干渉」又は「RNAi」は、標的細胞又は1以上の関連する遺伝子（特に対象となっている遺伝子のメッセンジャーRNA）に相同な二本鎖RNAを導入することによって、遺伝子もしくは遺伝子産物の発現が減少するあらゆる方法を言う。

【0070】

本明細書で用いられる「小分子」は、分子量が約5kD未満、最も好ましくは2.5kD未満の組成物を意味することが意図されている。小分子は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチドミメティクス、炭水化物、脂質又はその他の有機（炭素含有）もしくは無機分子であることができる。多くの製薬会社は、小分子、しばしば、真菌、細菌、もしくは藻類抽出物のアレイを含む、化学的及び/又は生物学的混合物の広範囲にわたるライブラリを持っており、それは、本発明のアッセイのいずれを用いてもスクリーニングすることができる。

【0071】

「SH3」又は「Src Homology3」ドメインは、通常約60のアミノ酸残基の蛋白質ドメインであり、複数の原形質蛋白質チロシンキナーゼ（例えば、Src、Abl、Lck）の非触媒部分における保存配列として最初に同定される。SH3ドメインは、プロリンに富むペプチドとの結合を介して特異的な蛋白質複合体の構築を媒介する。SH3ドメインの例としては、配列番号2のアミノ酸137~192、199~258、448~505及び832~888によって表され、配列番号27~30に示されている。いくつかの実施形態において、SH3ドメインは、コンセンサス配列RXaaXaaPXaaX6P（下記の表1に示されているように、X6は疎水性アミノ酸である）。いくつかの実施形態において、SH3ドメインは、P(T/S)AP、PFRDY、RPEPTAP、RQGPKEP、RQGPKEPFR、RPEPTAPEE及びRPLPVAPの配列の1以上と相互作用する。

【0072】

本明細書で用いられている、「特異的にハイブリダイズする」という語は、本発明の核酸プローブ/プライマーが、POSH配列又はその相補配列或いはその天然型変異体の少なくとも12、15、20、25、30、35、40、45、50又は100の連続するヌクレオチドにハイブリダイズし、POSH遺伝子以外の細胞性核酸（例えばmRNA又はゲノムDNA）に対するバックグラウンドのハイブリダイゼーションが15%未満、好ましくは10%未満、より好ましくは5%未満を持つ。種々のハイブリダイゼーション条件を用いて、特異的なハイブリダイゼーションを検出することができ、ストリンジェンシーは、主にハイブリダイゼーションアッセイの洗浄段階によって決定される。通常、高温、低塩濃度によって、高ストリンジェンシーとなり、一方、低温、高塩濃度によって低ストリンジェンシーとなる。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、例えば、約2.0×SSC、50での洗浄によって達成され、高ストリンジェンシーは、約0.2×SSC、50で達成される。以下において、ストリンジェンシーについてさらに説明する。

【0073】

ポリペプチドに適用されるとき、「実質的な配列同一性」は、例えば、デフォルトギャップを用いたプログラム、GAP又はBESTFITなどにより、最適に並べたとき、2つのペプチド配列が少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の配列同一性、より好ましくは

10

20

30

40

50

少なくとも99%以上の配列同一性を持つことを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換によって異なった状態となっている。例えば、電荷もしくは極性などの類似の化学的特性を持つアミノ酸の置換基は、蛋白質の特性に影響を与える可能性は低い。例としては、アスパラギンをグルタミンに、又はアスパラギン酸をグルタミン酸に置換することを含む。

【0074】

「転写調節配列」は、それらが作動可能に結合した配列をコードする蛋白質の転写を誘導又は制御する、開始シグナル、エンハンサー及びプロモーターなどのDNA配列を意味するために本明細書全体において用いられる一般用語である。好ましい態様において、組換え蛋白質遺伝子の転写は、発現が意図される細胞タイプにおける組換え遺伝子の発現を制御するプロモーター配列（又は他の転写調節配列）の制御下にある。組換え遺伝子は、天然に存在する形態の蛋白質の転写を制御する配列と同じ、又は異なる転写調節遺伝子が転写調節配列によって制御されることが理解され得るであろう。

10

【0075】

本明細書で使用される「トランスジェニック動物」は、該動物の細胞の1個もしくはそれ以上が、人為的に、例えば、当該技術分野において公知のトランスジェニック技術によって導入された異種核酸を含有するあらゆる動物、好ましくは、非ヒト哺乳動物、鳥類、両生類である。細胞の前駆体に直接的もしくは間接的に導入することによって、組換えウイルスを用いたマイクロインジェクションもしくは感染といった意図的な遺伝子操作によって、核酸を細胞に導入する。遺伝子操作という語は、古典的な交差交配又はインビトロの受精を含まず、むしろ、組換えDNA分子の導入を指す。この分子は、染色体内に組み込まれてもよいし、又は染色体外でDNAを複製するものでもよい。本明細書に記載されている典型的なトランスジェニック動物においては、導入遺伝子が細胞に組換えヒトPOSH蛋白質を発現させる。本発明の「非ヒト動物」は、げっ歯類、非ヒトの霊長類、ヒツジ、イヌ、雌牛、両生類、爬虫類などの脊椎動物が挙げられる。好ましい非ヒト動物は、ラットもしくはマウスのようなげっ歯類から選択される。最も好ましくはマウスであるが、アフリカツメガエル属のメンバーのようなトランスジェニック両生類、及びトランスジェニックニワトリもまた、例えば、胚形成及び組織形成を理解するための重要なツールを提供し得る。用語「キメラ動物」は、組換え遺伝子が見出される、又は、組換えが動物の全てではなく一部において発現する動物を意味するものとして本明細書では用いられている。用語「組織特異的キメラ動物」は、組換えヒトPOSH遺伝子が、いくつかの組織だけにおいて存在し及び/又は発現していることを示す。

20

30

【0076】

本明細書において用いられている「導入遺伝子」は、（例えば、ヒトPOSHポリペプチドをコードする）核酸配列を意味し、それは、部分的もしくは全体的に異種、すなわち、それが導入されるトランスジェニック動物もしくは細胞と異なる、又は、それが導入されるトランスジェニック動物もしくは細胞の内在遺伝子と同種であるが、該動物のゲノムに、それが導入された細胞のゲノムを変えるように、導入されることが意図されている、もしくは導入される（例えば、それは、天然の遺伝子とは異なる位置において導入されている、又はその挿入の結果がノックアウトである）。導入遺伝子は、1以上の転写調節配列及び、選択された核酸の好適な発現に必要なイントロンのような他の任意の核酸を含むことができる。

40

【0077】

よく知られているように、特定のポリペプチドの遺伝子は、単一又は多数のコピーにおいて、個体のゲノム内に存在することができる。そのような重複遺伝子は、同一であってもよく、又はヌクレオチド置換、付加又は欠失を含む特定の変形であってもよい。その全ては依然として、実質的に同じ活性を持つポリペプチドをコードする。

【0078】

「ビリオン」は、完全なウイルス粒子；核酸及びカプシド（及びいくつかのウイルス中の脂質エンベロープ）である。

50

【 0 0 7 9 】

【 表 1 】

【表1】 アミノ酸のクラスの短縮形*

シンボル	カテゴリー	表されるアミノ酸
X1	アルコール	Ser, Thr
X2	脂肪族	Ile, Leu, Val
Xaa	全て	Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr
X4	芳香族	Phe, His, Trp, Tyr
X5	荷電	Asp, Glu, His, Lys, Arg
X6	疎水性	Ala, Cys, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Thr, Val, Trp, Tyr
X7	負に荷電	Asp, Glu
X8	極性	Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr
X9	正に荷電	His, Lys, Arg
X10	小	Ala, Cys, Asp, Gly, Asn, Pro, Ser, Thr, Val
X11	極小	Ala, Gly, Ser
X12	回転形状 (Turnlike)	Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr
X13	アスパラギン-アスパラ ギン酸	Asn, Asp

10

20

30

40

アミノ酸のクラスの短縮形は、

http://smart.embl-heidelberg.de/SMART_DATA/alignments/consensus/grouping.htmlから採用した。

【 0 0 8 0 】

2 . 概説

50

いくつかの局面において、本発明は、新規なヒト P O S H 核酸及び蛋白質、ならびに関連する方法及び組成物に関する。いくつかの局面において、本発明は、いくつかの疾患の状態と P O S H 核酸及び蛋白質との間の新規な関連性に関する。P O S H は、P O S H ポリペプチドのレベル及び/又は活性に影響を及ぼすことによって操作されうる広範な重要な細胞機能と相互作用し、及びそれを調節する。いくつかの局面において、ヒト P O S H 遺伝子を同定することによって、本発明は、P O S H 遺伝子の欠損と関連する疾患を同定するための方法及びそのような疾患を回復するための方法を提供する。さらに別の局面において、本発明は、核酸物質（例えば、RNA i プローブ、アンチセンス）、抗体関連物質、小分子及び他の P O S H 機能に影響を及ぼす物質を提供する。さらに別の局面において、本発明は、P O S H 機能及び P O S H と関連する及び/又は P O S H 介在プロセスに

10

【0081】

いくつかの局面において、本発明は、P O S H ポリペプチドがユビキチン系において、E3 酵素として機能することの発見に関する。したがって、P O S H ユビキチンリガーゼ活性のダウンレギュレーション又はアップレギュレーションを使用して蛋白質ユビキチン化によって影響を受ける生物学的プロセスを操作することができる。ダウンレギュレーション又はアップレギュレーションは、P O S H 形成及び転写調節、翻訳調節又は翻訳後調節を含む、調節のあらゆる段階において達成することができる。例えば、P O S H 転写レベルは、P O S H 遺伝子配列を標的とした RNA i によって減少することもある。別の例

としては、P O S H ユビキチンリガーゼ活性は、P O S H を P O S H R I N G ドメインもしくは標的蛋白質（P O S H 活性によって少なくとも部分的にユビキチン化された蛋白質）との相互作用を媒介する P O S H のドメインに結合して干渉する抗体に接触させることによって阻害することができる。別の例として、P O S H もしくはその活性部分の発現を増加させることによって P O S H 活性を高めることができる。P O S H のようなユビキチンリガーゼは、ウイルスの細胞への浸入、ウイルス蛋白質の作製、ウイルス蛋白質の構築及び細胞からのウイルス粒子に放出などの、例えば、ウイルス生命の 1 以上の種々の段階を含む生物学的プロセスに関与することもある。P O S H は、例えば、痴呆（例えば、アルツハイマー病やピック病）、封入体筋炎、及びミオパシー、ポリグルコサン体ミオパシーならびにいくつかの形態の筋萎縮性側索硬化症などの、ユビキチン化された蛋白質

の蓄積によって特徴付けられる疾患に関与することもある。P O S H は、過剰又は不適切なユビキチン活性及び/又は蛋白質分解によって特徴付けられる疾患に関与することもある。さらに、P O S H は、細胞分解制御系の不全、細胞死の調節系の不全、及び機能亢進性の膜結合成長因子受容体などの機能亢進性の発癌遺伝子のダウンレギュレーション不全を含む腫瘍学的プロセスに関与することもある。いくつかの P O S H ポリペプチドをユビキチンリガーゼとして同定することによって、本発明の局面は、当該技術分野の当業者が

改変された P O S H ユビキチンリガーゼ活性と関連する疾患を同定することを可能とする。

20

30

【0082】

いくつかの局面において、本発明は、特定の P O S H ポリペプチドが、ウイルス粒子中

での蛋白質の作製、転写後プロセス、構築及び/又は放出を含むウイルス成熟に関与することの発見に関する。したがって、ウイルス感染は、P O S H の活性（例えば、ユビキチンリガーゼ活性又は標的蛋白質の相互作用）を阻害することによって改善することができる。そして、好ましい態様において、該ウイルスは、レトロイドウイルス、RNA ウイルス、ならびに HIV、Ebola、HBV、HCV 及び HTLV を含むエンベロープウイルスである。更なるウイルス種を以下により詳細に示す。いくつかの例において、P O S H 機能の減少は、ウイルス粒子の放出中に P O S H を用いるウイルスに感染した細胞にとって致命的である。メカニズムに拘束されることを望むわけではないが、そのような細胞における P O S H 機能の喪失は、細胞中におけるウイルス粒子もしくはその部分の過剰蓄積を通して細胞死を導く。いくつかの態様において、例えば、siRNA ノックダウンによる

40

50

P O S H 活性の阻害を用いて、感染された細胞、ほぼ潜伏しているウイルスさえ破壊することができる。なぜなら、そのような細胞は、結果として生じる、ウイルス粒子もしくはその部分の過剰蓄積によって死ぬからである。

【 0 0 8 3 】

いくつかの局面において、本発明は、h P O S H が Rac、小 GTPase と相互作用することの発見に関連する。Rho、Rac 及び Cdc42 は一緒に作用し、アクチン細胞骨格及び J N K M A P キナーゼ経路の組織化を調節する。マウス P O S H (“ m P O S H ”) の異所性発現は、J N K 経路を活性化し、N F - B の核局在化を起こす。線維芽細胞中の m P O S H の過剰発現は、アポトーシスを刺激する (Tapon ら、(1998) E M B O J . 17 : 1395 - 404) 。
 ショウジョウバエにおいて、P O S H は、別の GTPase、Ras と相互作用するか、そうでなければ、そのシグナリングに影響を及ぼす (Schnorr ら、(2001) G e n e t i c s 159 : 609 - 22) 。J N K 経路及び N F - B は、例えば、免疫反応、炎症、細胞増殖及びアポトーシスに
 10
 関与する重要な種々の遺伝子を調節する。例えば、N F - B は、インターロイキン 1、インターロイキン 8、腫瘍壊死因子及び多くの細胞接着分子の生成を調節する。N F - B は、細胞中でアポトーシス促進性及び抗アポトーシス性の両方の役割を果たす (例えば、F A S 誘導性細胞死及び T N F シグナリングのそれぞれにおいて) 。N F - B は、インヒビター蛋白質 I B 及び I B (まとめて、「I B」と称する) によって部分的にマイナス
 20
 方向に調節される。I B のリン酸化は、N F - B の活性化及び核局在化を可能にする。I B のリン酸化は、ユビキチン系によるその分解を引き起こす。したがって、さらに別の態様において、P O S H ポリペプチドは、J N K 経路を刺激する。さらに別の態様において、
 P O S H ポリペプチドは、N F - B の核局在化を促進する。さらに別の態様において、P O S H レベル及び / 又は活性の操作を用いてアポトーシスを操作することもできる。P O S H をアップレギュレーションすることによって、アポトーシスをいくつかの細胞において
 30
 刺激することができる。これは、通常過剰細胞増殖によって特徴付けられる状態 (いくつかの癌) において望ましい。P O S H をダウンレギュレーションすることによって、アポトーシスは、いくつかの細胞において減少するかもしれない。そしてこれは通常、過剰な細胞死によって特徴付けられる状態、例えば、心筋梗塞、発作、筋肉及び神経の変性疾患、ならびに移植前の臓器の保存にとって望ましいであろう。更なる態様において、P O S H ポリペプチドは、クラスリン含有複合体もしくはコートマー含有複合体、及び、特に核
 及び / 又はゴルジ体に局在化する輸送複合体などの小胞輸送複合体と関連する。
 40

【 0 0 8 4 】

3 . 核酸の例及び発現ベクターの例

いくつかの局面において、本発明は、例えば、配列番号 2、5、7、9、11、26、27、28、29 及び 30 などの、P O S H ポリペプチドをコードする核酸を提供する。本発明の核酸は、更に配列番号 1、3、4、6、8、10、31、32、33、34 及び 35 のバリエーションを含む核酸を含むと理解される。バリエーションヌクレオチド配列は、対立遺伝子のバリエーションのような 1 以上のヌクレオチドの置換、付加又は欠失によって、異なる配列を含む。したがって、例えば、遺伝子コードの縮重によって、配列番号 1、3、4、6、8、10、31、32、33、34 及び 35 に示されたコード配列のヌクレオチド配列とは異なるコード配列を含むであろう。別の態様において、バリエーションはまた、高ストリンジェントな条件下で配列番号 1、3、4、6、8、10、31、32、33、34 及び 35 のいずれかに示されたコード配列のヌクレオチド配列にハイブリダイズする配列をも含む。本発明の好ましい核酸は、例えば、配列番号 1、3、4、6、31、32、33、34、35 及びそのバリエーション、ならびに配列番号 2、5、7、26、27、28、29 及び 30 から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸を含むヒト P O S H 配列である。
 40

【 0 0 8 5 】

D N A ハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシー条件は変更され得ることは当該技術の当業者は容易に理解するであろう。例えば、6 . 0 × 塩酸ナトリウム / クエン酸ナトリウム (S S C) で約 4 5 でハイブリダイゼーションし、続いて 2 . 0
 50

×SSCで約50で洗浄することができるであろう。例えば、洗浄ステップでの塩濃度は、約2.0×SSC、約50の低ストリンジェンシーから、約0.2×SSC、約50の高ストリンジェンシーの中から選択することができる。さらに、洗浄ステップの温度は、室温(約22)の低ストリンジェンシー条件から、約65の高ストリンジェンシー条件に上昇させることができる。温度及び塩濃度の両方を変更させてもよい。又は、他の変数を変化させながら、温度又は塩濃度を一定に保ってもよい。ある態様において、本発明は、6×SSC、室温、続いて2×SSC、室温で洗浄するという低ストリンジェンシー条件でハイブリダイズする核酸を提供する。

【0086】

遺伝子コードの縮重によって、配列番号1、3、4、6、8、10、31、32、33、34及び35とは異なる、単離された核酸も本発明の範囲に含まれる。例えば、アミノ酸の数は、1より多くのトリプレットによって指定される。同じアミノ酸を規定するコドン、すなわちシノニム(同義コドン)(例えば、CAUとCACはヒスチジンにとって同義コドンである)も、蛋白質のアミノ酸配列に影響を及ぼさない「サイレント」変異を結果として生じることがある。しかしながら、対象の蛋白質のアミノ酸配列に変化を導くDNA配列の遺伝子多型は、哺乳動物の細胞中に存在するであろう。当該技術の当業者は、天然の対立遺伝子の変形によって、特定の蛋白質をコードする核酸の1以上のヌクレオチド(ヌクレオチドの約3~5%まで)におけるこれらの変形が所定の種の個体中に存在するかもしれないということを理解するであろう。そのようなヌクレオチドのあらゆる変形及び得られたアミノ酸遺伝子多型は、本発明の範囲である。

10

20

【0087】

任意に、本発明のPOSH核酸は、細胞中の機能表現型のPOSH喪失を、部分的もしくは完全に、遺伝子的に補完するであろう。例えば、本発明のPOSH核酸は、内因性POSHがRNAiによって減少した細胞において発現することができる。また、導入されたPOSH核酸は、RNAiに由来する表現型を緩和するであろう。機能表現型のPOSH喪失の例としては、ウイルスベクター、任意には、HIVベクターを用いてトランスフェクトされた細胞中のウイルス様粒子産生の減少がある。いくつかの態様において、POSH核酸は、効果的なレベルで細胞中に発現すると、アポトーシスを誘導する。

【0088】

本発明の別の局面は、アンチセンス、RNAi又はリボザイムに用いられるPOSH核酸に関する。本明細書において用いられているところの、核酸治療とは、細胞条件下で対象となるPOSHポリペプチドの1つをコードする細胞mRNA及び/又はゲノムDNAに特異的にハイブリダイズする(例えば、結合する)核酸もしくはその誘導体を、投与又はin situ発生させ、例えば、転写及び/又は翻訳を阻害することによって蛋白質の産生を阻害することを意味する。該結合は、通常塩基対相補性、又は例えば、DNA二本鎖に結合する場合は、二重螺旋の主溝における特異的な相互作用によるものであるかもしれない。

30

【0089】

本発明の核酸治療の構成物は、例えば、細胞内で転写される場合、POSHポリペプチドをコードする細胞mRNAの少なくとも1つの特有の部分に相補的なRNAを作製する発現プラスミドとして送達することができる。あるいは、該構成物は、ex vivoで生成され、細胞中に導入されたとき、POSHポリペプチドをコードするmRNA及び/又はゲノム配列をハイブリダイズすることによって発現を阻害するオリゴヌクレオチドである。そのようなオリゴヌクレオチドプローブは、任意に改変されたオリゴヌクレオチドであり、それは、内在性ヌクラーゼ、例えば、エキソヌクラーゼ及び/又はエンドヌクラーゼに対して抵抗性があり、したがってインピボで安定している。アンチセンスオリゴヌクレオチドに用いる核酸分子の例は、DNAのホスホラミデート(phosphoramidate)、ホスホチオエート及びメチルホスホネート類似物である(米国特許第5,176,996号;第5,264,564号および第5,256,775号参照)。さらに、核酸治療に有用なオリゴマーを構築するための通常のアプローチを、例えば、van der Krolら、(1988) Biotechniques 6:958-9

40

50

76及びSteinら、(1988) Cancer Res 48:2659-2668.によって検討した。

【0090】

したがって、本発明の改変されたオリゴマーは、治療的、診断的及び研究的意味において有用である。治療的用途において、該オリゴマーは、核酸治療に一般的に適する方法で利用される。

【0091】

治療における利用に加えて、本発明のオリゴマーは、それらが特異的に結合する、POSH DNA又はRNA配列の存在もしくは不存在を検出するため、例えば、本発明の遺伝子の発現のレベルを決定するため、もしくは本発明の遺伝子が遺伝的病変を含むかどうかを検出するための診断的試薬として使用することもできる。

10

【0092】

本発明の別の局面において、対象となる核酸は、対象となるPOSHポリペプチドをコードする配列を含み、少なくとも1つの調節配列に作動可能に結合した発現ベクターにおいて提供される。調節配列は、当該技術分野において認識されており、POSHポリペプチドの発現を導くために選択される。したがって、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御エレメントを含む。調節配列の例は、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。例えば、作動可能に結合されたとき、DNA配列の発現を制御する、広範な発現制御配列のいずれも、POSHポリペプチドをコードするDNA配列を発現するためのこれらのベクターに用いることができる。そのような有用な発現制御配列は、例えば、SV40の初期及び後期のプロモーター、tetプロモーター、アデノウイルスもしくはサイトメガロウイルス最初期プロモーター、lac系、trp系、TACもしくはTRC系、T7 RNAポリメラーゼによってその発現が導かれるT7プロモーター、ファージラムダの主要なオペレーター及びプロモーター領域、fdコート蛋白質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼもしくは他の糖分解酵素のためのプロモーター、酸ホスファターゼのプロモーター、例えば、Pho5、酵母接合型因子のプロモーター、バキュロウイルス系の多面体プロモーター、及び原核細胞又は真核細胞又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られているその他の配列、ならびにそれらの種々の組み合わせを含む。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択及び/又は発現されることが望ましい蛋白質の種類を選択といった因子に依存するかもしれないことを理解する必要がある。さらに、ベクターのコピー数、そのコピー数と、該ベクターによって他のあらゆる蛋白質、例えば、抗菌マーカーを制御する能力も考慮する必要がある。

20

30

【0093】

明らかのように、対象となる遺伝子コンストラクトは、培養物中に繁殖した細胞中で対象となるPOSHポリペプチドの発現を引き起こすために、精製のため、例えば、融合蛋白質又はポリペプチドを含む蛋白質又はポリペプチドを作製するために用いることができる。

【0094】

本発明は、1以上の対象となるPOSHポリペプチドのコード配列を含む、組換え遺伝子でトランスフェクトされた宿主細胞に関する。宿主細胞は、原核細胞、真核細胞のいずれでもよい。例えば、本発明のポリペプチドは、E. coliのような細菌細胞、昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス発現系を用いる)、酵母又は哺乳動物細胞において発現させることもできる。他の好適な宿主細胞は、当業者に公知である。

40

【0095】

したがって、本発明は、さらに対象となるポリペプチドを作成する方法に関する。例えば、POSHポリペプチドをコードする発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞は、適切な条件下で培養され、ポリペプチドの発現を起こすことができる。ポリペプチドは、ポリペプチドを含有する細胞混合物及び培地から分泌し、単離してもよい。あるいは、該ポリペプチドは、細胞質内に保留してもよい。そして、細胞を回収し、溶菌し、蛋白質を単離することができる。細胞培養液は、宿主細胞、培地及び他の副産物を含む。細胞

50

培養のための好適な培地は、当該技術において公知である。ポリペプチドは、細胞培養液、宿主細胞又はその両方から、イオン変換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動法、及びポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体を用いた免疫親和性生成を含む蛋白質を精製するための技術において公知の技術を用いて単離することができる。好ましい態様において、POSHポリペプチドは、その精製を容易にするドメインを含有する、POSH-GST融合蛋白質、POSH-インテイン融合蛋白質、POSH-セルロース結合ドメイン蛋白質、POSH-ポリヒスチジン融合蛋白質などの融合蛋白質である。

【0096】

POSHポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、微生物又は真核細胞プロセスを介して、組換え形態の蛋白質を作製するのに用いることができる。ポリヌクレオチド配列を、発現ベクターのような遺伝子コンストラクトに連結し、宿主、真核生物（酵母、鳥類、昆虫もしくは哺乳類）の細胞又は原核生物（細菌）の細胞に形質転換もしくはトランスフェクトすることは、標準的な手順である。

【0097】

組換えPOSH核酸は、クローニングされた遺伝子又はその一部を、原核細胞、真核細胞又はその両方において発現させるのに好適なベクターに連結することによって作製することができる。組換えPOSHポリペプチドの発現媒介物は、プラスミド及び他のベクターを含む。例えば、POSHポリペプチドの発現のための好適なベクターは、*E. coli*のような原核細胞における発現のためのpBR322-由来のプラスミド、pEMBL-由来のプラスミド、pEX-由来のプラスミド、pBTac-由来のプラスミド及びpUC-由来のプラスミドといった種類のプラスミドを含む。

【0098】

酵母中、組換え蛋白質の発現のために、多くのベクターが存在する。例えば、YEP24、YIP5、YEP51、YEP52、pYES2、及びYRP17をクローニングし、そして発現媒介物は遺伝子コンストラクトを*S. cerevisiae*（例えば、Broachら、(1983)、*Experimental Manipulation of Gene Expression*, ed. M. Inouye Academic Press, p. 83、引用によって本明細書に援用）に導入するのに有用である。これらのベクターは、pBR322 oriの存在により、*E. coli*中で複製することができ、酵母2ミクロンプラスミドの複製決定基によって*S. cerevisiae*で複製することができる。さらにアンピシリンのような薬物耐性マーカーを用いることができる。

【0099】

好ましい哺乳動物発現ベクターは、細菌中でのベクターの増殖を促進するための原核生物の配列と、真核細胞中で発現する1以上の真核転写ユニットとの双方を含む。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo及びpHyg由来のベクターは、真核細胞のトランスフェクションに好適な哺乳動物発現ベクターの例である。これらのベクターのいくつかは、複製及び、原核細胞及び真核細胞の両方における薬物耐性の選択を促進するために、pBR322のような細菌プラスミドからの配列を用いて改質される。あるいは、ウシパピローマウイルス(BPV-1)、又はエプスタイン・バーウイルス(pHEBo、pREP-由来及びp205)などのウイルスの誘導体を真核細胞の蛋白質の一過性の発現のために用いることができる。他のウイルス(レトロウイルスを含む)の発現系の例は、下記の遺伝子治療送達系において見出すことができる。プラスミド及び宿主生物の形質転換の調製に採用される種々の方法は、当該技術において公知である。他の原核細胞及び真核細胞の双方ならびに一般的な組換え操作のための好適な発現系としては、*Molecular Cloning A Laboratory Manual*、第2版、Sambrook編、Fritsch及びManiatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、16、17章を参照されたい。いくつかの例において、バキュロウイルス発現系を用いて組換えPOSHポリペプチドを発現させることが望ましいかもしれない。そのようなバキュロウイルス発現系の例には、pVL-由来ベクター(例えば、pVL1392、pVL1393及びpVL941)、pAcUW-由来ベクター(例えば、pAcUW1)、及びpBlueBac-由来ベクター(例えば、-gal含有pBlueBac II

1) が含まれる。

【0100】

N末端位のメチオニンは、酵素メチオニンアミノペプチダーゼ(MAP)を用いて酵素的に切断されることは当該技術において公知である。MAPを*E. coli* (Ben-Bassatら、(1987) *J. Bacteriol.* 169:751-757)及びネズミチフス菌からクローニングし、そのインビトロ活性を組換え蛋白質において実証した(Millerら、(1987) *PNAS USA* 84:2718-1722)。したがって、望ましければ、N末端メチオニンを、そのような組換えポリペプチドをMAPを作製する宿主(例えば、*E. coli* もしくはCM89もしくは*S. S. cerevisi*)において発現させることによってインビボで、又は生成されたMAPを用いてインビトロで(例えば、Millerらの処置)で達成することができる。

10

【0101】

あるいは、ポリペプチドのコード配列を、異なるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む融合遺伝子の一部として組み込むことができる。この種の発現系は、例えば、POSHポリペプチドの免疫原性のフラグメントを作製することが望ましい条件下で有用とすることができる。例えば、ロタウイルスのVP6カプシド蛋白質を、単一形態もしくはウイルス粒子の形態のいずれかで、ポリペプチド部分の免疫性の担体蛋白質として用いることができる。抗体が対するPOSHポリペプチドの部分に対応する核酸配列は、ワクシニアウイルス構造蛋白質のコード配列を含む融合遺伝子コンストラクトに組み込まれ、蛋白質の一部をビリオンの一部として含む融合蛋白質を発現する1セットの組換えウイルスを作製することができる。B型肝炎表面抗原も同様にこの役割に用いることができる。

20

【0102】

ペプチドベースの免疫化のための多数抗原ペプチド(Multiple Antigen Peptide)系を用いることができ、そこでは、POSHポリペプチドの望ましい部分が、オリゴマー分枝リジンコア上のペプチドの有機化学合成で直接的に得られる(例えば、Posnettら、(1988) *JBC* 263:1719及びNardelliら、(1992) *J. Immunol.* 148:914)。POSHポリペプチドの抗原決定基はまた、細菌細胞によって発現及び提示することができる。

30

【0103】

別の態様において、組換え蛋白質の望ましい部分のN末端におけるポリ-(ヒス)/エンテロキナーゼ切断部位配列のような精製リーダー配列をコードする融合遺伝子は、発現された融合蛋白質をNi²⁺金属樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製することを可能とする。精製リーダー配列をその後、引き続きエンテロキナーゼを用いた処理によって除去し、精製されたPOSHポリペプチドを作成することができる(例えば、Hochuliら、(1987) *J. Chromatography* 411:177; 及びJanknechtら、*PNAS USA* 88:8972)。

【0104】

融合遺伝子を作製する技術は公知である。本質的には、様々なポリペプチドをコードする種々のDNAフラグメントの結合が平滑末端と粘着末端の連結、適切な末端を提供するための制限酵素による消化、適切であれば付着末端の充填、望ましくない結合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、及び酵素的連結を用いる常法により行われる。別の態様において、融合遺伝子は、自動DNAシンセサイザーを含む、常法により合成することができる。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅を、2つの連続する遺伝子フラグメントの間に相補的なオーバーハングを生じさせるアンカープライマーを用いて行うことができ、それによって、続いてアニーリングされ、キメラ遺伝子配列が生成される(例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubelら、John Wiley & Sons: 1992参照)。

40

【0105】

50

【表 2】

【表 2】 POSH核酸の例

配列名	生物	アクセッションナンバー
cDNA FLJ11367 fis, クロ ーン HEMBA1000303	ヒト	AK021429
S H 3 ドメインに富んだ (POSH) mRNA	マウス	NM_021506
S H 3 に富んだ (POSH) mRNA	マウス	AF030131
S H 3 に富んだ (POSH) mRNA	キイロショウジョウバ エ	NM_079052
S H 3 に富んだ (POSH) mRNA	キイロショウジョウバ エ	AF220364

10

20

【 0 1 0 6 】

【表 3】

【表 3】 POSHポリペプチドの例

配列名	生物	アクセッションナンバー
SH3 ドメイン含有蛋白質 POSH	マウス	T09071
SH3 ドメインに富む	マウス	NP_067481
SH3 に富む ; POSH	マウス	AAC40070
SH3 に富む	キイロショウジョウバエ	AAF37265
LD45365p	キイロショウジョウバエ	AAK93408
POSH 遺伝子産物	キイロショウジョウバエ	AAF57833
SH3 に富む	キイロショウジョウバエ	NP_523776

10

20

【 0 1 0 7 】

さらに、下記の表は、核酸配列及び関連するヒト POSH 蛋白質のドメインの配列番号及び本願において用いられる配列同定番号の要約を示す。

【 0 1 0 8 】

【表 4】

【表 4】 核酸配列およびヒト POSH中のドメインの関連する配列番号

配列名	配列	配列番号
RING ドメイン	TGTCCGGTGTGTCTAGAGCGCCTTGATGCTTCTGCGAAGGTCT TGCCTTGCCAGCATACTGTTTTGCAAGCGATGTTTGCT GGGGATCGTAGGTTCTCGAAATGAACTCAGATGTCCCGAGT	31
第1の SH ₃ ドメイン	CCATGTGCCAAAGCGTTATACAATATGAAGGAAAAGAGCCTG GAGACCTTAAATTCAGCAAAGGCGACATCATCATTTTT GCGAAGACAAGTGGATGAAAATTGGTACCATGGGGAAGTCAAT GGAATCCATGGCTTTTTTCCCCACCAACTTTGTGCAGA TTATT	32
第2の SH ₃ ドメイン	CCTCAGTGCAAAGCACTTTATGACTTTGAAGTGAAAGACAAGG AAGCAGACAAAAGATTGCCCTTCCATTTGCAAAGGATGA TGTTCTGACTGTGATCCGAAGAGTGGATGAAAAGTGGGCTGAA GGAATGCTGGCAGACAAAATAGGAATATTTCCAATTT CATATGTTGAGTTTAAC	33
第3の SH ₃ ドメイン	AGTGTGTATGTTGCTATATATCCATACACTCCTCGGAAAGAGG ATGAACTAGAGCTGAGAAAAGGGGAGATGTTTTTAGT GTTTGAGCGCTGCCAGGATGGCTGGTTCAAAGGGACATCCATG CATACCAGCAAGATAGGGGTTTTTCCCTGGCAATTATG TGGCACCAGTC	34
第4の SH ₃ ドメイン	GAAAGGCACAGGGTGGTGGTTTTCTATCCTCCTCAGAGTGAGG CAGAACTTGAAGTTAAAGAAGGAGATATTGTGTTTGT TCATAAAAAACGAGAGGATGGCTGGTTCAAAGGCACATTACAA CGTAATGGGAAAAGTGGCCTTTTCCCAGGAAGCTTTG TGGAAAACA	35

10

20

30

40

【表 5】

【表 5】配列同定番号の概要

配列情報	配列同定番号(配列番号)
ヒト POSH コード配列	配列番号: 1
ヒト POSH アミノ酸配列	配列番号: 2
ヒト POSH cDNA 配列	配列番号: 3
ヒト POSH の 5' cDNA フラグメント	配列番号: 4
ヒト POSH の N 末端蛋白質フラグメント	配列番号: 5
ヒト POSH の 3' mRNA フラグメント	配列番号: 6
ヒト POSH の C 末端蛋白質フラグメント	配列番号: 7
マウス POSH mRNA 配列	配列番号: 8
マウス POSH 蛋白質配列	配列番号: 9
キイロショウジョウバエ POSH mRNA 配列	配列番号: 10
キイロショウジョウバエ POSH 蛋白質配列	配列番号: 11
ヒト POSH RING ドメイン アミノ酸 配列	配列番号: 26
ヒト POSH の第 1 の SH ₃ ドメイン アミノ酸配列	配列番号: 27
ヒト POSH の第 2 の SH ₃ ドメイン アミノ酸配列	配列番号: 28
ヒト POSH の第 3 の SH ₃ ドメイン アミノ酸配列	配列番号: 29
ヒト POSH の第 4 の SH ₃ ドメイン アミノ酸配列	配列番号: 30
ヒト POSH RING ドメイン核酸配列	配列番号: 31
ヒト POSH 1 st SH ₃ ドメイン核酸配列	配列番号: 32
ヒト POSH 2 nd SH ₃ ドメイン核酸配列	配列番号: 33
ヒト POSH 3 rd SH ₃ ドメイン核酸配列	配列番号: 34
ヒト POSH 4 th SH ₃ ドメイン核酸配列	配列番号: 35

10

20

30

【0110】

4. ポリペプチドの例

本発明はまた、単離された及び/又は精製された形態の、蛋白質もしくは、その蛋白質を含む特定の複合体と通常関連するかもしれない他の細胞内蛋白質から単離された、又はそうでなければ、それを含まない、対象の POSH ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、POSH ポリペプチドは、配列番号 2、5、7、9、11、26、27、28、29 及び 30 にいずれかに示されたアミノ酸配列に少なくとも 60% 一致するアミノ酸配列を有する。別の態様において、ポリペプチドは、配列番号 2、5、7、9、11、26、27、28、29 及び 30 にいずれかに示されたアミノ酸に少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は 100% 一致するアミノ酸配列を持つ。

40

【0111】

任意に、本発明の POSH ポリペプチドは、例えば、部分的もしくは完全に機能表現型の POSH 喪失を軽減することによって、内因性 POSH ポリペプチドの代わりに機能を果たすであろう。例えば、本発明の POSH ポリペプチドは、内因性 POSH ポリペプチドが RNAi によって減少した細胞において、産生されることもある。また、導入された

50

P O S Hポリペプチドは、RNAiから得られた表現型を軽減するであろう。機能表現型のP O S H喪失の例は、ウイルス性のベクター、任意にH I Vベクターによってトランスフェクトされた細胞中のウイルス様粒子産生の減少である。いくつかの態様において、P O S Hポリペプチドは、細胞中で効果的なレベルで産生されたとき、アポトーシスを誘導する。

【0112】

いくつかの態様において、本発明のP O S Hポリペプチドは、1以上のS H 3ドメインを介して、ウイルス性のG a g蛋白質と相互作用する。更なる態様において、P O S Hポリペプチドはまた、選択的に、R I N Gドメインの活性を介して部分的にユビキチン化において機能を果たすこともある。

10

【0113】

別の局面において、本発明は、P O S Hポリペプチドのアゴニストもしくはアンタゴニストであるポリペプチドを提供する。P O S Hポリペプチドの変種及びフラグメントは、機能亢進性又は構成的な活性をもつか、又は一方、P O S Hポリペプチドが1以上の機能を行うのを阻害する。例えば、1以上のドメインを欠く切断型は、ドミナントネガティブ効果を持つこともある。

【0114】

本発明の別の局面は、全長P O S Hポリペプチドに由来するポリペプチドに関する。対象となる蛋白質の単離されたペプチジル部分は、ポリペプチドをコードする核酸の対応するフラグメントから組換え的に作製されたポリペプチドをスクリーニングすることによって得ることができる。さらに、フラグメントは、従来Merrifield solid phase f-Moc o r t-Boc chemistryのような、当該技術において公知の技法を用いて化学的に合成することができる。例えば、対象となる蛋白質のいずれか1つを所望の長さの任意にフラグメントに、フラグメントのオーバーラップなく、分割することができる。該フラグメントは、(組換えによって、又は化学的合成によって)作製することができ、特異的な蛋白質複合体又はより一般的にはP O S H複合体のアゴニスト又はアンタゴニストのいずれかとして機能することができるペプチジルフラグメントを同定するために、例えば、マイクロインジェクションアッセイによって、試験することができる。

20

【0115】

治療的又は予防的効果、又は安定性(例えば、生体外での有効期間及びインビボでの蛋白質分解に対する耐性)を高める目的などのために対象となるP O S Hポリペプチドの構造を改変することが可能である。蛋白質の天然に存在する形態の、少なくとも1つの活性を維持するように設計されたとき、そのような改変されたポリペプチドは、本明細書においてより詳細に記載されているP O S Hポリペプチドと機能的に等価であると考えられる。そのような改変されたポリペプチドは、例えば、アミノ酸の置換、欠失、又は付加によって作製することができる。

30

【0116】

例えば、ロイシンとイソロイシンもしくはバリン、アスパラギン酸とグルタミン酸、トレオニンとセリンとの単離された置換、又は、アミノ酸と構造的に関連するアミノ酸(例えば、保存的突然変異)との類似の置換は、得られた分子の生物学的活性に大きな影響を及ぼさないであろう。保存的置換とは、それらの側鎖において関連するアミノ酸のファミリー内で生じる置換である。遺伝的にコードされたアミノ酸は、4つのファミリーに分類することができる。すなわち、(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸；(2)塩基性=リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)無極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアミン、メチオニン、トリプトファン；及び(4)無電荷極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンは、ときに芳香族アミノ酸として合わせて分類される。同様に、アミノ酸のレパートリーは、下記のように分類される。すなわち、(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸；(2)塩基性=リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)脂肪族=グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン

40

50

、セリン、トレオニン、尚、セリン及びトレオニンは、任意に個別に、脂肪族 - ヒドロキシルとして分類される；(4) 芳香族 = フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン；(5) アミド = アスパラギン、グルタミン；及び(6) 硫黄含有 = システイン及びメチオニン（例えば、Biochemistry、第2版、L. Stryer編、W.H. Freeman and Co.、1981参照）。ポリペプチドのアミノ酸配列の変化によって、機能的相同体が得られたかどうかは、バリエーションのポリペプチドが細胞内において野生型の蛋白質と類似の反応を起こすことができる能力を評価することによって測定することができる。例えば、POSHポリペプチドのそのようなバリエーションは、例えば、それらが別のポリペプチド、例えば、別のPOSHポリペプチド又はウイルスの成熟に関する別の蛋白質と結合する能力について、評価される。複数の置換が生じるポリペプチドは、同様の方法で容易に試験することができる。

10

【0117】

本発明はさらに、対象となるPOSHポリペプチド複数のコンビナトリアル突然変異体、ならびに切断突然変異体を生成する方法を意図する。そしてそれは、特に潜在的なバリエーションの配列（例えば、ホモログ）を同定するために特に有用である。そのようなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする目的は、例えば、アゴニストもしくはアンタゴニストとして機能することができ、又は一方、新規な活性を全て一緒に処理するPOSHホモログを生成することである。コンビナトリアル由来のホモログは、天然に存在するPOSHポリペプチドに対して相対的な選択的特性を持つように生成することができる。そのような蛋白質は、組換えDNAコンストラクトから発現したとき、遺伝子治療プロトコルに用いることができる。

20

【0118】

同様に、変異原性は、対応する野生型蛋白質と比べて細胞内半減期が大幅に異なるホモログを発生させることができる。例えば、改変された蛋白質は、対象のPOSHポリペプチドの破壊、又はそうでなければ不活性化をもたらす蛋白質分解又は細胞プロセスに対してより安定な、又はあまり安定でなくすることができる。そのようなホモログ及びそれらをコードする遺伝子は、蛋白質の半減期を調節することによって、POSHレベルを改変するために用いることができる。例えば、短い半減期は、誘導性の発現系が細胞内で組換えPOSHレベルの制御をより緊密にすることができるとき、より一過性の生物学的効果を生じさせることができる。上記のように、そのような蛋白質及び特にそれらの組換え核酸コンストラクトは、遺伝子治療プロトコルにおいて用いることができる。

30

【0119】

同様に、POSHホモログは、現在のコンビナトリアルアプローチによって、それらが対応する野生型蛋白質が機能することができる能力と干渉することができるように、アンタゴニストとして機能するように生成されることができる。

【0120】

この方法の代表的な態様において、POSHホモログの集団のためのアミノ酸配列を並べる、好ましくは、相同性を可能な限り高くするように並べる。そのようなバリエーションの集団は、例えば、1以上の種からのホモログ、又は同じ種であるが突然変異によって異なっているホモログを含むことができる。並べられた配列の各位置に現れるアミノ酸を選択して、コンビナトリアル配列の縮重セットを生成することができる。好ましい態様において、コンビナトリアルライブラリーは、それぞれ潜在的POSH配列の少なくとも1部を含むポリペプチドのライブラリーをコードする遺伝子の縮重ライブラリーによって作製される。例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物は、潜在的なPOSHヌクレオチド配列の縮重セットが個別のポリペプチドとして、又はより大きな融合蛋白質として（例えば、ファージディスプレイのために）発現しうるように遺伝子配列に酵素的に連結されることができる。

40

【0121】

潜在的ホモログのライブラリーを縮重オリゴヌクレオチドから生成することができる多くの方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動DNAシンセサイザーによって行

50

い、次にその合成遺伝子を適切な発現のための遺伝子に連結する。遺伝子の縮重セットの目的は、1混合物において、潜在的 P O S H は配列の所望のセットをコードする全ての配列を提供することである。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当該技術において公知である（例えば、Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakuraら (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakuraら、(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakuraら、(1984) *Science* 198:1056; Ike ら、(1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477参照)。そのような技術は、他の蛋白質の指示された進化において用いられてきた（例えば、Scottら、(1990) *Science* 249:386-390; Robertsら、(1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlinら、(1990) *Science* 249: 404-406; Cwirlaら、(1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; ならびに米国特許第5,223,409号、第5,198,346号、及び第5,096,815号）。

【0122】

一方、他の形態の突然変異誘発を、コンビナトリアルライブラリーを生成するために用いることができる。例えば、P O S H ホモログ（アゴニスト及びアンタゴニストの双方）は、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発などを用いたスクリーニング（Rufら、(1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wangら、(1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balintら、(1993) *Gene* 137:109-118; Grodbergら、(1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima ら、(1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowmanら (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; 及びCunninghamら (1989) *Science* 244:1081-1085）、リンカースキャニング突然変異誘発（Gustinら、(1993) *Virology* 193:653-660; Brownら、(1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnightら、(1982) *Science* 232:316; 飽和突然変異誘発（Meyersら、(1986) *Science* 232:613）; P C R 突然変異誘発（Leungら、(1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19）; 又は、化学的突然変異誘発などを含むランダム突然変異誘発、（Millerら、(1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 及びGreenerら、(1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34）によって単離することができる。特にコンビナトリアル設定における、リンカースキャニング突然変異誘発は、切断型（生理活性）形態の P O S H ポリペプチドを同定するための魅力的な方法である。

【0123】

点突然変異及びトランケーションによって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングする技術、及び、そのために特定の特性を持つ遺伝子産物の c D N A をスクリーニングする技術において様々な技法が公知である。そのような技法は、通常、P O S H ホモログのコンビナトリアル突然変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリーの高速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために最も広範に用いられている技術は、典型的に、遺伝子ライブラリーを複製可能発現ベクターにクローニングすること、得られたベクターのライブラリーを持つ適切な細胞を形質転換すること、及び望ましい活性の検出によって、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの比較的容易な単離を容易にする条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現することを含む。下に示す例示的なアッセイのそれぞれは、コンビナトリアル突然変異誘発の技法によって生成された多数の縮重した配列をハイスループット解析に適している。

【0124】

スクリーニングアッセイの例示的な態様において、対象となる蛋白質の候補コンビナトリアル遺伝子産物を細胞又はウイルスの表面に表示し、特定の細胞又はウイルス粒子が P O S H ポリペプチドと結合する能力を「パニングアッセイ」において検出する。例えば、P O S H バリエーション変種のライブラリーを細菌細胞の表面膜蛋白質の遺伝子にクローニングすることができる（Ladnerら、WO 88/06630; Fuchsら、(1991) *Bio/Technology* 9:1370-1371; 及びGowardら、(1992) *TIBS* 18:136-140）、例えば、P O S H ポリペプチドに結合する、潜在的に機能的な相同体に刻み目を入れるために P O S H ポリペプチド蛍光標識された核を用いたパニングによって検出された、得られた融合蛋白質にクローニング

する。細胞を目視検査し、蛍光顕微鏡で分離することができる。又は、細胞の形態学から可能であれば、蛍光活性細胞ソーターで分離することができる。

【 0 1 2 5 】

類似の方法で、遺伝子ライブラリーを融合蛋白質として、ウイルス粒子の表面上で発現させることができる。例えば、繊維状ファージ系において、外来ペプチド配列を感染ファージの表面上で発現させ、それによって2つの重要な利益を付与することができる。第1に、これらのファージは、アフィニティマトリックスに非常に高濃度で適用することができるので、多数のファージを一度にスクリーニングすることができる。第2に、それぞれの感染ファージは、コンビナトリアル遺伝子産物をその表面に表示することができるので、もし特定のファージが、アフィニティマトリックスから低い収率で収集されれば、そのファージは、別の回の感染によって増幅することができる。ほぼ同一のE. coli 繊維状ファージである、M13、fd及びf1は、ファージディスプレイライブラリーに非常に頻繁に用いることができる。ファージ gIII又はファージgVIIIコート蛋白質は、ウイルス粒子の究極的なパッキングを破壊することなく、融合蛋白質を生成するのに使用することができる (Ladnerら、P C T国際公開W0 90/02909号; Garrardら、P C T国際公開W0 92/09690号; Marksら、(1992) J. Biol. Chem. 267:16007-16010; Griffithsら、(1993) EMBO J. 12:725-734; Clacksonら、(1991) Nature 352:624-628; 及びBarbasら、(1992) PNAS USA 89:4457-4461)。

10

【 0 1 2 6 】

本発明はまた、対象となるP O S Hポリペプチドを減少させ、ミメティクス、例えば、標品蛋白質と別の細胞パートナーとの結合を模倣することができるペプチド又は非ペプチド作用物質を生成する。そのような上記の突然変異誘発技法ならびにチオレドキシン系もまた、例えば、ウイルスの成熟に関与する蛋白質の互いに対する結合に関与する蛋白質-蛋白質相互作用に関与するP O S Hポリペプチドの決定因子をマッピングする上で特に有用である。例えば、基質タンパク質の分子認識に関与するP O S Hポリペプチドの重要な残基を決定し、基質蛋白質に結合し、また、P O S H結合を阻害することによって、その生物学的活性を阻害するために機能する、P O S Hポリペプチド由来のペプチドミメティクスを生成するために用いることができる。例えば、別のポリペプチドとの結合に関与するP O S Hポリペプチドのアミノ酸残基をマッピングするための、スキヤニング突然変異誘発を採用することによって、ペプチドミメティクス化合物を生成することができ、それは、結合に関与するそれらの残基に類似している。例えば、そのような残基の非加水分解可能なペプチドアナログは、ベンゾジアゼピン (例えば、Freidingerら、in Peptides: Chemistry and Biology、G.R. Marshall ed.、ESCOM Publisher: Leiden、Netherlands、1988参照)、アゼピン (例えば、Huffmanら、in Peptides: Chemistry and Biology、G.R. Marshall ed.、ESCOM Publisher: Leiden、Netherlands、1988)、置換されたラクタム環 (Garveyら、in Peptides: Chemistry and Biology、G.R. Marshall ed.、ESCOM Publisher: Leiden、Netherlands、1988)、ケトメチレンシュードペプチド (Ewensonら、(1986) J. Med. Chem. 29:295; 及びEwensonら、in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland、IL、1985)、b-回転ジペプチドコア (b-turn dipeptide cores) (Nagaiら、(1985) Tetrahedron Lett 26:647; 及びSatoら、(1986) J Chem Soc Perkin Trans 1:1231)、及びb-アミノアルコール (Gordonら、(1985) Biochem Biophys Res Commun 126:419及びDannら、(1986) Biochem Biophys Res Commun 134:71) を用いて生成することができる。

20

30

40

【 0 1 2 7 】

以下の表は、RINGドメイン及び種々のSH3ドメインの配列を示す。

【 0 1 2 8 】

【表 6】

【表 6】 ヒト POSH のドメインのアミノ酸配列及び関連する配列番号

配列名	配列	配列番号
RING ドメイン	CPVCLERLDASAKVLPCQHTFCKRCLLGIVGSRNELRC PEC	26
第 1 の SH ₃ ドメイン	PCAKALYNYEGKEPGDLKFSKGDIIILRRQVDENWYHG EVNGIHGFFPTNFVQIIK	27
第 2 の SH ₃ ドメイン	PQCKALYDFEVKDKKADKDCLPFAKDDVLTVIRRV DEN WAEGMLADKIGIFPISYVEFNS	28
第 3 の SH ₃ ドメイン	SVYVAIYPYTPRKEDELELRKEMFLVFERCQDGFVKG TSMHTSKIGVFPNGYVAPVT	29
第 4 の SH ₃ ドメイン	ERHRVVVSYPQSEAELELKEGDIVFVHKKREDGFVKG TLQRNGKTGLFPGSFVENI	30

10

20

【 0 1 2 9 】

5 . 抗体及びその使用

本発明の別の局面は、POSHポリペプチドと特異的に反応する抗体に関する。例えば、POSHポリペプチド由来の免疫原を用いることによって（例えば、cDNA配列に基づく）、抗蛋白質/抗ペプチド血清又はモノクローナル抗体を標準的なプロトコルによって作製することができる（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual、Harlow及びLane編（Cold Spring Harbor Press: 1988））。マウス、ハムスター又はウサギのような哺乳動物に対して免疫原の形態のペプチド（例えば、POSHポリペプチド又は抗体反応を引き出すことが可能な抗原フラグメント、又は上記の融合たんぱく質）を免疫することができる。蛋白質又はペプチドの免疫原性を付与するための技法としては、担体との接合、又は、当該技術において公知の他の技法が含まれる。POSHポリペプチドの免疫原性の部分は、アジュバントの存在下で投与することができる。免疫化の進行は、血漿又は血清中の抗体価を検出することによってモニターすることができる。免疫原を抗体のレベルを推定するための抗原として用いた、標準的なELISAや他のイムノアッセイを用いることができる。好ましい態様において、対象となる抗体は、哺乳動物のPOSHポリペプチドの抗原決定基、例えば、配列番号2に示された蛋白質の抗原決定基に対して免疫特異的である。

30

40

【 0 1 3 0 】

ある態様において、抗体は、RINGドメイン又はSH₃ドメインに対して特異的であり、また、該ドメインは、POSHポリペプチドの一部であることが好ましい。より具体的な態様において、該ドメインは、配列番号2に示されたアミノ酸配列の一部である。一連の典型的な態様において、抗体は、配列番号2のアミノ酸137~192、配列番号2のアミノ酸199~258、配列番号2のアミノ酸448~505及び/又は配列番号2のアミノ酸832~888によって表された1以上のSH₃ドメインと結合する。別の態様例において、抗体は、配列番号2のアミノ酸12~52によって示されるRINGドメインに結合する。別の態様において、抗体は、配列番号2に示されたアミノ酸配列に少なくとも80%一致するアミノ酸配列を有する1以上の蛋白質と免疫反応する。他の態様に

50

において、抗体は、配列番号 2 に示されているアミノ酸配列に少なくとも 85%、90%、95%、98%、99% 又は一致するアミノ酸配列を持つ 1 以上の蛋白質と免疫反応する。

【0131】

動物に対して、POSHポリペプチドの抗原製剤を免疫した後、抗POSH抗血清を得ることができる。また、望ましければ、ポリクローナル抗POSH抗体を血清から単離することができる。モノクローナル抗体を作製するために、抗体産生細胞（リンパ球）を、免疫された動物から回収し、ミエローマ細胞のような細胞を不死化してハイブリドーマ細胞を産出することを含む、標準的な体細胞融合処置によって融合することができる。そのような技法は、当該技術において公知であり、技術の例としては、例えば、ハイブリドーマ技法（Kohler及びMilsteinによって初めて開発された。（1975）Nature、256: 495-497）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kozbarら、（1983）Immunology Today、4: 72）、及びヒトモノクローナル抗体を作製するためのEBV-ハイブリドーマ技法（Coleら、（1985）Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、Inc. pp. 77-96）があげられる。ハイブリドーマ細胞は、本発明の哺乳動物POSHポリペプチドと特異的に反応する抗体を作製するために免疫化学的にスクリーニングすることができ、モノクローナル抗体は、そのようなハイブリドーマ細胞を含む培養液から単離することができる。ある態様において、抗ヒトPOSH抗体は、配列番号2の核酸によってコードされる蛋白質と特異的に反応する。

【0132】

本明細書で用いられる、抗体という語は、対象のPOSHポリペプチドの1つと特異的に反応するそのフラグメント（断片）を含むことが意図されている。抗体は、常法を用いて断片化することができ、そのフラグメント（断片）は、全体としての抗体について上記したと同様の方法で使用するためにスクリーニングされる。例えば、F(ab)2フラグメントは、抗体をペプシンで処理することによって生成することができる。得られたF(ab)2フラグメントを処理して、ジスルフィドブリッジを還元し、Fabフラグメントを作製することができる。本発明の抗体はさらに、二重特異性、一本鎖、ならびに、該抗体の少なくとも1つのCDR領域によって付与されたPOSHポリペプチドに対するアフィニティをもつキメラ及びヒト化分子を含むことが意図されている。好ましい抗体の態様において、抗体はさらに、貼り付け、そして剥がすことのできる標識を含む（例えば、その標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素又は酵素コファクターとすることができる）。

【0133】

抗POSH抗体は、例えば、個体におけるPOSHポリペプチドレベル、特に、患者がRNAウイルス、レトロウイルス及びエンペローブウイルスなどのウイルスに感染しているかどうかを決定するため、又はそのような障害に罹患した個体のための所与の治療計画の効率の決定を可能とするために、原形質膜におけるPOSHの存在をモニターするために使用することができる。さらに、POSHポリペプチドは、場合によっては、放出されたウイルス粒子に局在化されることが期待される。ウイルス粒子は、POSHポリペプチドの存在を調べるために、収集され、アッセイすることができる。POSHポリペプチドのレベルは、例えば、細胞などの種々のサンプル中、及び/又は血液サンプルのような体液中において測定することもできる。

【0134】

本発明の抗POSH抗体の別の用途は、gt11、gt18-23、ZAP及びORF8などの発現ベクター中に構築されたcDNAライブラリーの免疫学的スクリーニングである。正しい読み取り枠及び方向で挿入されたコード配列を有するこの種のメッセンジャーライブラリーは、融合蛋白質を産生することができる。例えば、gt11は、そのアミノ末端がガラクトシダーゼアミノ酸配列からなり、そしてそのカルボキシ末端が外来ポリペプチドからなる融合蛋白質を産生する。POSHポリペプチドの抗原性のエピトープ、例えば、特定の蛋白質の他のオルソログ又は同じ種からの他のパラログを次に、例えば、反応感染したプレートからリフトされたニトロセルロースフィルタと適切な抗POSH抗体とを反応させながら、

10

20

30

40

50

抗体を用いて検出することができる。このアッセイによって検出された陽性ファージを、感染したプレートから単離することができる。したがって、P O S Hホモログの存在を検出することができ、ヒトからのアイソフォーム（スプライスバリエーションを含む）を改変することができるように、他の動物からクローニングすることができる。

【0135】

6. ヌクレオチド及びポリペプチド配列の相同性の検索

本発明のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列は、GenBank、SwissProt、BLOCKS及びPima IIなどのデータベースに対するクエリー配列として使用してもよい。これらのデータベースは、BLAST (Basic Local Alignment Search Toolを表す) を用いた相同性 (類似性) の領域をサーチすることができる、あらかじめ同定され、注釈をつけられていた配列を含んでいる (Altschul S F (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S Fら、(1990) J Mol Biol 215:403-10)。

10

【0136】

BLASTは、ヌクレオチドとアミノ酸配列の双方のアライメントを生成し、その配列類似性を決定する。アライメントの局所的性質のために、BLASTは、正確なマッチングの決定、又は原核 (細菌) オリジンでもよく、又は真核 (動物、真菌もしくは植物) オリジンでもよい相同体の同定に特に有用である。一次配列パターン及び2次構造ギャップペナルティを扱う際、引用によって本明細書に援用した。Smith, R. F. and T. F. Smith (1992; Protein Engineering 5:35-51) に記載されているもののような他のアルゴリズムを使用することもできる。本願において開示されているように、配列は、少なくとも49ヌクレオチド長であり、不定の (uncalled) 塩基 (A、C、G又はTよりむしろNが記録されている場合) は12%を超えないものとする。

20

【0137】

Karlin及びAltschul (1993; Proc Nat Acad Sci 90:5873-7) に詳細に示され、引用によって本明細書に援用したBLASTアプローチは、見出されたあらゆるマッチングの統計学的な重要性を評価し、ユーザが選択した重要性の閾値を満足する、唯一のマッチングを報告するために、クエリー配列とデータベース配列との間のマッチングを検索する。その閾値は、ヌクレオチドでは10~25そしてペプチドでは3~15に設定されることが好ましい。

【0138】

7. トランスジェニック動物及びその使用

本発明の別の局面は、異種のP O S H遺伝子、好ましくは、本発明のヒトP O S H遺伝子を発現し、及び/又は、該動物の少なくとも1つの組織又は細胞タイプにおいて破壊された内因性のP O S H遺伝子1つもしくは2つの複製を有するするトランスジェニック非ヒト動物を特徴とする。したがって、本発明は、ウイルス感染用の動物モデルを特徴とする。ある態様において、トランスジェニック非ヒト動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、雌牛などの哺乳動物、又は非ヒト霊長類である。理論に拘束されるわけではないが、そのような動物は、エンペローブウイルス、レトロイドウイルス及び、種々のラブドウイルスレンチウイルス及びフィロウイルスなどのRNAウイルスに感染しやすいことが提案されている。したがって、そのようなトランスジェニック動物は、そのようなウイルスが原因となる疾患の進行の研究のために有用な動物モデルの役割を果たすかもしれない。あるいは、そのような動物は、1以上の他のヒトトランスジーンを導入して、レトロイドウイルスもしくはRNAウイルス及びエンペローブウイルスによって引き起こされる感染に関する多数のヒト遺伝子を持つトランスジェニックを作製するための基礎として有用となりうる。レトロイドウイルスは、HIVのようなレンチウイルスを含む。他のRNAウイルスは、エボラウイルスなどのフィロウイルスを含む。多数のヒトトランスジーンを導入の結果、トランスジェニック動物は、いくつかのウイルスに感染しやすくなり、したがって、これらのウイルス感染の研究のために有用な動物モデルとなるかもしれない。

30

40

【0139】

50

好ましい態様において、ヒト P O S H 遺伝子を持つトランスジェニック動物は、Cyclin T 1、C D 3 4、C C R 5 及び fusin (C R C X 4) などの H I V 感染に關与する、その他のヒト遺伝子を導入するための基礎として有用である。更なる態様において、追加的ヒトトランスジーンは、A I D S に關連する疾患又は状態（例えば、高血圧、カポジ肉腫、カヘキシーなど）に關与する遺伝子である。そのような動物は、H I V 感染、A I D S 及び關連する疾患の発生の研究のための動物モデルとして有用であるかもしれない。

【 0 1 4 0 】

本発明の別の局面は、本発明のトランスジーンを含み、好ましくは、（任意ではあるが）該動物の 1 以上の細胞において外因性の P O S H 蛋白質を発現する（その動物の）細胞からなるトランスジェニック動物に關する。P O S H トランスジーンは、野生型の蛋白質をコードすることができ、そのホモログならびにアンチセンスコンストラクトをコードすることができる。さらに、異種の P O S H トランスジーンを、P O S H 遺伝子発現のタイミング又はレベルを調節することができるように発現することが望ましいかもしれない。そのような条件付発現は、原核生物の蛋白質に P O S H トランスジーンを発現を促進するために同時に発現することを要求する原核生物のプロモーター配列を用いて提供され得る。プロモーターの例及び対応するトランス活性化原核生物蛋白質は、米国特許第 4,833,080 号に記載されている。

10

【 0 1 4 1 】

さらに、組織特異的発現を示すトランスジェニック動物は、例えば、エンハンサーなどの調節エレメントに特異的な組織を、トランスジーンに挿入することによって生成することができる。例えば、内因性の P O S H 遺伝子プロモーターもしくはその部分は、別のプロモーター及び/又はエンハンサー、例えば、C M V もしくはモロニーマウス白血病ウイルス (M L V) プロモーター及び/又はエンハンサーで置換することができる。

20

【 0 1 4 2 】

あるいは、脳において H I V トランスジーンを発現するだけの非ヒトトランスジェニック動物は、脳特異的プロモーター（例えば、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) プロモーター）、ニューロフィラメント蛋白質 (N F - L) プロモーター、性腺刺激ホルモン放出ホルモンプロモーター、パソプレッシンプロモーター及び神経特異的エノラーゼプロモーターを用いて生成され得る。So Forss-Petterら、Neuron、5、187、（1990）を参照されたい。そのような動物は、潜在的抗 H I V 薬が血液脳関門を横断する可能性を評価するための有用なインビボモデルを提供することができる。特異的プロモーターを使用することができる他の標的細胞は、例えば、マクロファージ、T 細胞及び B 細胞である。他の組織特異的プロモーターは、当該技術において公知である。例えば、R. Jaenisch、Science、240、1468（1988）を参照されたい。

30

【 0 1 4 3 】

誘導性の P O S H トランスジーンを含む非ヒトトランスジェニック動物は、当該技術において公知の誘導性の調節エレメント（例えば、メタロチオネインプロモーター）を用いて生成することができる。次に、P O S H トランスジーン発現は、動物に遺伝子発現を誘導する化合物（例えば、重金属）を投与することによって、これらの動物において開始することができる。別の好ましい誘導系は、テトラサイクリン誘導性の転写活性剤を含む（1997年8月5日付けで Bujard 及び Gossen に対して発行された米国特許第 5,654,168 号、ならびに 1997年7月22日付けで Bujard らに対して発行された米国特許第 5,650,298 号）。

40

【 0 1 4 4 】

一般的に、トランスジェニック動物系列は、それらのゲノムに少なくとも 1 つのトランスジーンを組み込み、これらの動物から少なくとも 1 つの原種を選択し、その原種もしくは複数の原種を増殖させて、それらのゲノムに選択されたトランスジーンが組み込まれたトランスジェニック動物の少なくとも 1 つの系列を確立することによって、得ることができる。

【 0 1 4 5 】

トランスジェニック動物を産生させるための卵子もしくはその他の有核細胞（例えば、

50

胚性幹細胞)を得るための動物は、Charles River Laboratories (Wilmington, Mass.)、Taconic (Germantown, N.Y.)、Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, Ind.)などの標準的な商業的供給源から取得することができる。

【0146】

卵子は好適な動物から、例えば、卵管から流し出すことによって、又は米国特許第5、489、742号(1996年2月6日Hammer及びTaurogに発行)；米国特許第5,625,125号(1997年4月29日Bennettらに発行)；Gordonら、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384；Gordon & Ruddle、1981、Science 214: 1244-1246；T. E. Wagner及びP. C. Hoppeに対する米国特許第4,873,191号；米国特許第5,604,131号；Armstrongら(1988) J. of Reproduction、39:511 又はMehtaliらによるPCT特許国際公開出願第PCT/FR93/00598 (WO 94/00568)号に記載の方法によって取得することができる。卵子を取得する前に、メスを過剰排卵を促進するのに有効なホルモン条件にしておくことが好ましい。

10

【0147】

DNAを卵子又は他の有核細胞に導入するために、外因性のDNAのキャリアとしての精子を用いたインビトロ受精(「精子媒介性遺伝子の移入」、例えば、Lavitranoら、1989、Cell 57: 717-723)；マイクロインジェクション、遺伝子標的化(Thompsonら、1989、Cell 56: 313-321)、エレクトロポレーション(Lo、1983、Mol. Cell. Biol. 3: 1803-1814)、トランスフェクション、又はレトロウイルス媒介性遺伝子移入(Van der Puttenら1、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152)を含む、多くの方法を使用することができる。そのような技法を検討するためには、Gordon(1989)、Transgenic Animals、Intl. Rev. Cytol. 115:171-229を参照されたい。

20

【0148】

精子を媒介とした遺伝子移入以外は、卵子は、他のトランスジーン移入技法とあわせて(その前、最中もしくは後)に受精する必要がある。卵子を受精させる好ましい方法は、メスを繁殖製のオスと一緒に育てることである。しかしながら、卵子は、インビトロ受精技法によって受精させることもできる。

【0149】

その後、受精した、トランスジーン含有卵子を偽妊娠動物(「里親動物」とも称する)に、好適な技法を用いて移入する。偽妊娠動物は、例えば、40～80日齢のメス動物(8週齢を超えているもの)を不妊のオス、例えば、精管切除術を受けたオスと一緒にケージに入れることによって得ることができる。翌朝、メスの膣栓を確認する。精管切除術を受けたオスと交配したメスを移入時まで別にして保存する。

30

【0150】

レシピエントメスは、例えば、GnRH agonist (GnRH-a) : des-gly10、(D-Ala6)-LH-RH Ethylamide、SigmaChemical Co.、St. Louis、Mo.を用いて同調することができる。あるいは、左子宮角の囊膜を「剥離」することを含む簡単な外科的処置によって、片側性妊娠を達成することもできる。その後注入された胚を左子宮角に卵管漏斗を介して移入することができる。潜在的トランスジェニック原種は、典型的に内因性の同腹仔から生まれた時点ですぐに同定することができる。胚性幹細胞からトランスジェニック動物を産生させるために、例えば、Teratocarcinomas and embryonic stem cells、a practical approach、ed. E. J. Robertson (IRL Press 1987)、又はPotterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81、7161 (1984)を参照されたい。その教示を引用によって本明細書中に援用する。

40

【0151】

次に遺伝子を発現する原種を育成して、トランスジェニック系列を確立することができる。したがって、原種動物を、交配、同系交配、異種交配又は非近交配させ、本発明の動物のコロニーを作製することができる。多数のトランスジーンを含む動物は、異なる原種動物(例えば、HIVトランスジェニック動物及びヒトCD4を発現するトランスジェニック動物)と交配させることによって、ならびにトランスジーンを上記のように卵子や胚細胞に導入することによって産生させることができる。さらに、A-トランスジェニック

50

動物からの胚は、必要時に解凍して偽妊娠動物に移植される凍結胚として保存しておくことができる（例えば、Hirabayashi ら、（1997）Exp Anim 46: 111及びAnzai（1994）Jikken Dobutsu 43: 247参照）。

【0152】

本発明は、その全ての細胞中にトランスジーンを持つトランスジェニック動物、ならびに全てではないがいくつかの細胞中にトランスジーンを持つ動物、すなわちモザイク動物を提供する。トランスジーンは、単一のトランスジーンとして組み込むこともできるし、又は、タンデム型、例えば、ヘッド・ツー・ヘッドタンデムもしくは、ヘッド・ツー・テイルタンデムもしくはマルチプルコピーとして組み込むこともできる。

【0153】

トランスジーンの正常な発現は、当該技術の当業者に公知のいくつかの手段のいずれによっても検出することができる。限定されない例としては、ノーザンブロット、mRNAのインサイチュイブリダイゼーション、ウエスタンブロット解析、免疫組織化学的方法及び蛋白質発現のFACS解析がある。

【0154】

さらに別の局面において、本発明は、POSHトランスジーン、優先的には、ヒトPOSHトランスジーンを含有する非ヒト動物細胞を特徴とする。例えば、動物細胞（例えば、体細胞又は生殖細胞（すなわち、卵子もしくは精子））は、該トランスジェニック動物から取得することができる。トランスジェニック体細胞もしくは細胞系列は、例えば、薬物スクリーニングアッセイにおいて使用することができる。一方、トランスジェニック生殖細胞は、上記のようにトランスジェニック子孫を産生させるために用いることができる。

【0155】

本発明はさらに、ウイルス治療、すなわち、ウイルス感染によって引き起こされる疾患又は状態（たとえば、AIDS）の発生を治療及び/又は予防するために有用な化合物の安全性及び/又は効果を同定（スクリーニング）又は決定するための方法を提供する。さらに、例えば、それらの構造を改変して、安定性及び/又は活性及び/又は毒性を増加させることによって、公知の抗ウイルス化合物をさらに改善するために該アッセイは有用である。

【0156】

トランスジェニック動物は、ウイルス治療薬を同定するために、*in vivo*アッセイで用いることができる。例えば、該動物は、ウイルス生命周期のあらゆる相、例えば、1以上のウイルス遺伝子の発現、1以上のウイルス蛋白質の活性化、1以上のウイルス蛋白質のグリコシル化、1以上のウイルス蛋白質のプロセッシング、ウイルス複製、ビリオンの構築、及び/又は感染性ビリオンの出芽の減少又は阻害を行う化合物を同定するためのアッセイにおいて用いることができる。

【0157】

ある態様例において、アッセイは、試験化合物をRNAウイルス、DNAウイルス、レトロイドウイルス及び/又はエンベロープウイルスを含むウイルスに感染した、本発明のトランスジェニック動物に投与すること、及びその動物における表現型変化と試験化合物を投与しなかったトランスジェニック動物とを比較することを含む。例えば、その動物がHIVに感染している場合、その表現型の変化は、エイズ関連症候群（ARC）、白内障、中枢神経系（CNV）の炎症性疾患/病変、軽度の腎臓硬化性の疾患/病変、又は乾癬性皮膚炎、角化性疾患/病変、カポジ肉腫、カヘキシーなど皮膚疾患/病変の寛解であることができる。該化合物のカポジ肉腫の阻害に対する効果は、例えば、GalloらのPCT/US97/11202（W097/49373）、に記載のように測定することができる。これら及び他のHIV関連症候群もしくは表現型については、さらにLeonardら（1988）Science 242:1665に記載されている。

【0158】

別の態様において、表現型の変化は、ウイルス粒子の放出/出芽である。さらに別の態

10

20

30

40

50

様において、表現型な変化は、CD4+ T細胞の数、又はCD4+ T細胞対CD8+ T細胞の比率である。H I V感染ヒト、ならびにH I Vトランスジェニックマウスにおいて、リンパ節の分析をしたところ、CD4+ T細胞の数は減少しており、CD8+ T細胞の数は増加している。CD4+ T細胞とCD8+ T細胞の数は、例えば、Santoroら、前掲に記載のように、例えば、間接的な免疫蛍光法及びフローサイトメトリーによって測定することができる。

【0159】

一方、表現型の変化、例えば、H I V遺伝子の発現レベルにおける変化をモニターすることができる。H I V R N Aは、gag m R N A、gag-pro-pol m R N A、vif m R N A、vpr m R N A、tat m R N A、rev m R N A、vpu/env m R N A、nef m R N A、及びv p x mRNAからなる群から選択することができる。H I V蛋白質は、Pr55 Gag 及びそのフラグメント (p17 MA、p24 CA、p7 NC、p1、p9、p6及びp2)、Pr160 Gag-Pro-Pol及びそのフラグメント (p10 PR、p51 RT、p66 RT、p32 IN)、p23 Vif、p15 Vpr、p14 Tat、p19 Rev、p16 Vpu、gp160 Env 又はそのフラグメント (gp120 SU and gp41TM)、p27 Nef及びp14 Vpxからなる群から選択することができる。これらのm R N A又は蛋白質のいずれのレベルも、皮膚生検などの組織サンプルからの細胞において、例えば、GalloらのPCT/US97/11202 (W097/49373)に記載のように測定することができる。H I V m R N A 及び蛋白質の定量化は、本明細書の他の箇所及び例えば、Dickieら(1996) AIDS Res. Human Retroviruses 12:1103においてさらに記載されている。好ましい態様において、P B M Cの表面におけるgp120のレベルが測定される。これは、例えば、動物から取得したP B M C上で免疫蛍光法によって行うことができる。

10

20

【0160】

さらなる表現型の変化は、動物の血清及び/又は組織におけるウイルス粒子の産生レベル又は割合である。これは、例えば、逆転写酵素(R T活性)又はウイルス量を測定することによって、本明細書の他の箇所及び例えば、GalloらのPCT/US97/11202 (W097/49373)に記載されているように、p24抗原を測定することによって測定することができる。

【0161】

H I V感染又はA I D Sの進行を示す、さらに別の表現型の変化は、I L - 6、I L - 8及びT N F - などの炎症性のサイトカインの産生である。したがって、抗H I V治療薬としての化合物の効果は、これらのサイトカインのいずれか又は全ての血清レベルの低下を調べるE L I S A試験によって評価することができる。

30

【0162】

試験抗原を本発明のトランスジェニック動物に投与することによって、ワクチンを試験することができる。該動物に対して、同じもしくは異なる抗原を追加免疫することができる。次にそのような動物に対してH I Vなどのウイルスを感染させる。次いでウイルス粒子の作製又はウイルス蛋白質の発現を試験ワクチンの投与後の様々な時点で測定する。作製されたウイルス粒子量又はウイルス発現の減少は、試験ワクチンがウイルス産生及び/又は発現を減少又は阻害するのに有効であることを示すであろう。動物によって、ワクチン抗原に反応して産生された抗体の量は、当該技術において公知の方法によって決定することができる。その粒子状抗原の免疫原性の相対的な指標を提供する。

【0163】

本発明のトランスジェニック動物からの細胞を、培養液中で確立し、細胞系列を確立するよう不死化することができる。、例えば、不死化された細胞系列は、Buleraら、(1997) Hepatology 25: 1192に記載されているように、トランスジェニックラットの肝臓から確立することができる。他のタイプの細胞の細胞系列も当該技術において公知の方法にしたがって確立することができる。

40

【0164】

ある細胞ベースアッセイにおいて、P O S Hトランスジーンを発現する細胞を、対象となっているウイルスに感染させ、試験化合物又は対照化合物の存在下でインキュベートすることができる。次いで、ウイルス粒子の作製を比較する。したがって、このアッセイ系は、例えば、ウイルス放出/出芽と干渉させることによって機能する分子アンタゴニスト

50

を同定する手段を提供する。

【0165】

細胞ベースアッセイはまた、ウイルス遺伝子の発現を調節し、ウイルスmRNAの転写を調節する、又はウイルスmRNAもしくは蛋白質の安定性を調節する化合物を同定するために使用することができる。したがって、対象となっているウイルスに感染した細胞を試験化合物とともにインキュベートすることができ、そして細胞培地中で産生されたウイルス蛋白質の量を測定し、試験化合物に接触させていない細胞から産生されたものと比較することができる。特定のウイルス遺伝子の発現を調節する化合物の特異性は、種々の対照解析、例えば、1以上の対照遺伝子の発現を測定することによって確認することができる。このタイプの細胞アッセイは、アンチセンス分子又はリボザイムの効果を決定するために、特に有用である。

10

【0166】

8. リボザイム、アンチセンス及びDNA酵素のRNA干渉

いくつかの局面において、本発明は、RNAi、リボザイム、アンチセンス及び、POSH活性を操作する（典型的には減少させる）ための、他の核酸に関連する方法及び組成物に関する。RNAi、リボザイム分子の例としては、配列番号15、16、18、19、21、22、24及び25のいずれかに示されている配列を含むことができる。

【0167】

本発明のいくつかの態様は、RNA干渉（RNAi）によって、1以上のPOSH遺伝子のノックダウンに影響を及ぼすための物質及び方法を使用する。RNAiは、真核細胞において発生し得る、配列特異的な転写後遺伝子リプレッションのプロセスである。通常、このプロセスは、配列に相同な二本鎖RNA（dsRNA）によって誘導される特定の配列のmRNAの分解を含む。例えば、特定の一本鎖mRNA（ssmRNA）に対応する長dsRNAの発現は、メッセージを不安定にし、それによって対応する遺伝子の発現と「干渉」する。したがって、選択されたあらゆる遺伝子は、その遺伝子のmRNAの全てのもしくは実質的な部分に対応するdsRNAを導入することによって抑制してもよい。長いdsRNAは発現すると、まずリボヌクレアーゼIIIによって、21~22といった短い塩基対長の短dsRNAオリゴヌクレオチドにプロセッシングされる。さらに、したがって、RNAiは、相対的に短い相同的なdsRNAの導入又は発現によって影響を受けることもある。実際、相対的に短い相同的なdsRNAは、以下に示すいくつかの利点を有しているかもしれない。

20

30

【0168】

哺乳動物細胞は、二本鎖RNA（dsRNA）によって影響を受ける経路を少なくとも2つ有する。RNAi（配列特異的）経路において、開始dsRNAは、上記したように、まず、短干渉（si）RNAに分割される。siRNAは、各3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングを備えた約19ヌクレオチドのsiRNAを構成する、約21ヌクレオチドのセンス及びアンチセンス鎖を有している。短干渉RNAは、特異的なメッセージRNAが分解の標的とされることができるよう配列情報を提供すると考えられている。対照的に、非特異的経路は、少なくとも約30の塩基対長を持つあらゆる配列のdsRNAによって惹起される。非特異的な効果は、dsRNAが2つの酵素：その活性形態において、翻訳開始ファクターeIF2をリン酸化して全ての蛋白質合成を停止するPKR、及び全てのmRNAを標的とする非特異的な酵素Rnase Lを活性化する分子を合成する2'、5'オリゴアデニレート合成酵素（2'、5'-AS）を活性化することによって生じる。非特異的な経路は、ストレス又はウイルス感染に反応する宿主を表すこともある。通常、非特異的な経路の効果は、本発明の好ましい方法によって最小化されることが好ましい。非常に長いdsRNAは、非特異的な経路を誘導することが必要とされているようである。したがって、RNAiによる遺伝子抑制に効果を及ぼすためには、約30塩基対より短いdsRNAが好ましい（Hunterら、（1975）J Biol Chem 250: 409-17; Mancheら、（1992）Mol Cell Biol 12: 5239-48; Minksら、（1979）J Biol Chem 254: 10180-3;及びElbashirら（2001）Nature 411: 494-8参照）。

40

50

【0169】

RNAiは、エレガンス線虫（例えば、Fireら（1998）Nature 391: 806-11参照）、マウス卵子及び胚（Wiannyら（2000）Nature Cell Biol 2: 70-5; Svobodaら（2000）Development 127: 4147-56）、ならびにRAT-1線維芽細胞（Bahraminaら（1999）Mol Cell Biol 19: 274-83）を含む、様々な微生物におけるPOSH遺伝子の発現を緩和又は除去するのに効果的であることが示されている。また、真核植物及び動物において取得することができる古くから進化してきた経路でもあるようである（Sharp（2001）Genes Dev. 15: 485-90）。RNAiは、HeLa細胞、NIH/3T3細胞、COS細胞、293細胞及びBHK-21細胞を含む種々の細胞タイプにおける遺伝子発現を減少させ、典型的には遺伝子の発現を、アンチセンス技法を用いて得られたものより低いレベルにまで減少させる、そして実際は、多くの場合発現を全体として削除する際に効果的であることが示されている（Bass（2001）Nature 411: 428-9参照）。哺乳動物細胞において、siRNAは、アンチセンスの実験に典型的に用いられる濃度より数オーダー低い濃度において効果的である。（Elbashirら、（2001）Nature 411: 494-8）。

10

【0170】

RNAiを生じさせるために用いられる二本鎖オリゴヌクレオチドは、30塩基対長であることが好ましい。また、リボ核酸の約25、24、23、22、21、20、19、18又は17の塩基対を含むことがより好ましい。任意に、本発明のdsRNAオリゴヌクレオチドは、3'オーバーハング末端を含んでもよい。2-ヌクレオチド3'オーバーハングの例は、あらゆる種類のリボヌクレオチド残基から構成されていてもよく、また、2'-デオキシチミジン残基から構成されていてもよく、それは、RNA合成のコストを下げ、また、細胞培養培地中及びトランスフェクトされた細胞中のsiRNAのヌクレアーゼ抵抗を高めるかもしれない（Elbashiら、（2001）Nature 411: 494-8参照）。50、75、100またさらには500塩基対以上の長いdsRNAsも、本発明のいくつかの態様において用いることができる。RNAiを生じさせるdsRNA濃度の例は、約0.05nM、0.1nM、0.5nM、1.0nM、1.5nM、2.5nM又は100nMである。もっとも、処理される細胞の性質、遺伝子標的及び当業者によって容易に認識可能な他のファクターによっては、他の濃度も使用することができる。dsRNAの例は、化学的に合成することもでき、又は、インビトロ又はインビボで適切な発現ベクターを用いて作製することもできる。合成RNAの例は、当該技術において公知の方法を用いて化学的に合成された21ヌクレオチドRNAを含む（例えば、Expedite RNA ホスホラミダイト及びチミジンホスホラミダイト（Proligo、Germany）。合成オリゴヌクレオチドは、当該技術において公知の方法を用いて脱保護され、ゲル精製されることが好ましい（例えば、Elbashirら、（2001）Genes Dev. 15: 188-200）。長いRNAは、当該技術において公知のT7 RNAポリメラーゼプロモーターのようなプロモーターから転写される。インビトロプロモーターの下流において可能な双方の方向に配置された、単一のRNA標的は、所望の標的配列のdsRNAオリゴヌクレオチドを作製するための標的の双方の鎖を転写するであろう。上記RNA種のいずれも、例えば、ストリンジェントな条件下及び/又は生理学的な条件下で配列番号1、3、4、6、8及び10の配列又はその相補配列のいずれかにハイブリダイズするPOSH核酸に表された核酸配列の一部を含むように設計される。

20

30

40

【0171】

オリゴヌクレオチドの設計に用いられる特異的な配列は、発現された標的の遺伝子メッセージ中に含有されるヌクレオチドのあらゆる連続的な配列とすることができる。当該技術において公知のプログラム及びアルゴリズムを用いて、適切な標的配列を選択することができる。さらに、最適な配列は、記載されている一本鎖核酸配列の2次構造を予測するために設計されたプログラムを用いて選択してもよい。それらの配列の選択を折り畳みmRNAの露出された一本鎖の領域において生じるようにすることができる。適切なオリゴヌクレオチドを設計するための方法及び組成物は、例えば、米国特許第6,251,588号に見出すことができる。その内容を引用によって本明細書に援用する。メッセンジャーRNA

50

(mRNA)は、通常、蛋白質の合成を導くための情報をリボヌクレオチドの配列に含む線形分子であると考えられている。しかしながら、大半のmRNAには、複数の2次構造及び3次構造が含まれることが研究からわかってきた。RNAの2次構造エレメントは、主に同じRNA分子の異なる領域間のワトソン-クリック型相互作用によって形成される。重要な2次構造的エレメントは、分子間二本鎖領域、ヘアピンループ、二本鎖RNA中の隆起、及び内部ループを含む。3次構造エレメントは、二次構造エレメントが相互にもしくは一本鎖領域と接触したときに形成され、より複雑な3次元構造を形成する。多くの研究によって、多数のRNA二本鎖構造の結合エネルギーを測定し、RNAの二次構造を予測するために使用することができる、一連の法則を導いた(例えば、Jaegerら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706 (1989);及びTurnerら、(1988) Annu. Rev. Biophys. Chem. 17:167)。該法則は、RNA構造エレメントの同定、特に、mRNAの好ましいセグメントを表す一本鎖RNA領域を同定し、サイレンシングRNAi、リボザイム又はアンチセンステクノロジーを標的化するのに有用である。したがって、rRNA標的の好ましいセグメントは、dsRNAオリゴヌクレオチドを媒介するRNAiの設計、ならびに適切なリボザイム及びハンマーヘッドリボザイム組成物の設計のために同定することができる。

【0172】

dsRNAオリゴヌクレオチドは、当該技術において公知の、リボゾームのような担体組成物(例えば、付着性の細胞系列の製造業者(Life Technologies)により記載されているLipofectamine 2000)を用いて、異種の標的遺伝子でトランスフェクションすることによって細胞に導入してもよい。dsRNA折後ヌクレオチドの標的遺伝子のためのトランスフェクションはオリゴフェタミン(Life Technologies)を用いて行うことができる。トランスフェクション効率は、hGFP-コードpAD3のコトランスフェクション後、蛍光顕微鏡を用いて、哺乳動物の細胞系列を確認してもよい(Kehlenbackら(1998) J Cell Biol 141: 863-74)。RNAiの有効性は、RNAの導入後の多数のアッセイのいずれによって評価してもよい。これらには、新たな蛋白質合成を抑制した後、内因性のプールの十分な時間のターンオーバーに続いて、POSH遺伝子産物を認識する抗体を用いるウエスタンブロット解析、逆転写酵素ポリメラーゼ鎖反応及び存在するPOSH標的mRNAのレベルを決定するノーザンブロット解析が含まれる。

【0173】

更なる組成物、方法及びRNAi技法の用途が、米国特許法第6、278、039号、第5、723、750号及び第5、244、805号に記載されている。それらを引用によって本明細書に援用する。

【0174】

POSH mRNA転写物を触媒的に切断するように設計されたりボザイム分子もまた、対象となるPOSH mRNAの翻訳及び/又はPOSHの発現を阻害するために使用することができる(例えば、PCT国際公開W090/11364号(1990年10月4日公開); Sarverら(1990) Science 247:1222-1225 及び米国特許第5、093、246号参照)。リボザイムは、RNAの特異的な切断を触媒することが可能な酵素RNA分子である(参考として、Rossi(1994) Current Biology 4: 469-471)。リボザイム作用のメカニズムは、リボザイム分子の相補的な標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーション、それに続く、エンドヌクレアーゼ切断を含む。リボザイム分子の組成は、POSH mRNAに相補的な1以上の配列及びmRNA切断を担う公知の触媒的配列又は機能的に等価な配列を含むことが好ましい(例えば、米国特許第5、093、246号を参照されたい。その内容の全体を引用によって本明細書に援用する)。

【0175】

部位特異的認識配列においてmRNAを切断するリボザイムは、標的mRNAを破壊するために使用することができる場合、ハンマーヘッドリボザイムを使用することが好ましい。ハンマーヘッドリボザイムは、標的mRNAを持つ相補的な塩基対を形成する隣接領域によって示された位置においてmRNAを切断する。標的mRNAは、2つの塩基5

'-UG-3'の配列を持つことが好ましい。ハンマーヘッドリボザイムの構築及び作製は、当該技術において公知であり、Haseloff及びGerlach（（1988）Nature 334:585-591に十分に記載されている。また、PCT出願W089/05852号を参照されたい。その内容を引用によって本明細書に援用する）。ハンマーヘッドリボザイム配列は、転移RNA（tRNA）のような安定なRNAに包埋し、インピボでの切断効果を高めることができる（Perrimanら、（1995）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92: 6175-79; de Feyter、 and Gaudron、Methods in Molecular Biology、Vol. 74、Chapter 43、"Expressing Ribozymes in Plants"、Edited by Turner、P. C、Humana Press Inc.、Totowa、N.J）。特に、tRNA融合リボザイムのRNAポリメラーゼIII-媒介性の発現は、当該技術において公知である（Kawasakiら、（1998）Nature 393: 284-9; Kuwabaraら、（1998）Nature Biotechnol. 16: 961-5;及びKuwabaraら（1998）Mol. Cell 2: 617-27; Kosekiら（1999）J Virol 73: 1868-77; Kuwabaraら（1999）Proc Natl Acad Sci USA 96: 1886-91; Tanabeら（2000）Nature 406: 473-4を参照されたい）。典型的に、多くの潜在的なハンマーヘッドリボザイム切断部位が所与の標的cDNA配列内に存在する。該リボザイムは、切断認識部位が標的mRNAの5'末端の近くに位置づけられ、効率を高め、非機能的mRNA転写物の細胞間蓄積を最少化するように操作されることが好ましい。さらに、例えば、長短の形態の標的のC末端アミノ酸ドメインの様々な部分をコードする標的配列に位置づけられたいずれの切断部位を用いても、1以上の他の標的を選択的に標的化することができ、それによって標的遺伝子産物の1以上に対する選択的効果を有することになる。

10

20

【0176】

遺伝子標的リボザイムは、必然的に2つの領域に相補的なハイブリダイゼーション領域を含むことが好ましい。そしてそのそれぞれは、少なくとも5つ、好ましくは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20の連続するヌクレオチド長のPOSH mRNA、例えば、配列番号1、3、4、6、8又は10のいずれかに示された配列に記載のmRNAである。さらに、リボザイムは、高度に特異的なエンドヌクレアーゼ活性を有する。それは、自己触媒的に標的センスmRNAを切断する。本発明は、治療薬標的候補遺伝子のようなPOSH遺伝子をコードするセンスmRNAにハイブリダイズし、それによって該センスmRNAにハイブリダイズし、その結果、機能的なポリペプチド産物を合成するように翻訳されることがないようにしている。

30

【0177】

本発明のリボザイムはまた、テトラヒメナ好熱菌（IVS、又はL-19 IVS RNAとして既知）に天然に存在するものなどのRNAエンドリボヌクレアーゼ（以下、Cech型リボザイムと称する）を含む。それは、Thomas Cech and collaborators（Zaugら、（1984）Science 224:574-578; Zaugら、（1986）Science 231:470-475; Zaugら、（1986）Nature 324:429-433; 国際公開特許出願第W088/04300号 University Patents Incによる.; Beenら（1986）Cell 47:207-216）に詳細に記載されている。Cech-typeリボザイムは、標的RNA配列にハイブリダイズし、その後標的部位の切断が行われる、8つの塩基対活性部位を持つ。本発明は、標的遺伝子又は核酸配列に存在する8個の塩基対活性部位配列を標的とするCech-typeリボザイムを包含する。

40

【0178】

リボザイムは、改変されたオリゴヌクレオチド（例えば、安定性の向上、標的化など）で構成することもでき、そしてインピボで標的遺伝子を発現する細胞に送達する必要がある。好ましい送達方法は、強い構成pol III or pol II プロモーターの制御下でリボザイムを「コードする」DNAコンストラクトを用いることを含む。その結果トランスフェクトされた細胞は、十分な量のリボザイムを産生し、内因性の標的メッセージを破壊し、翻訳を阻害する。リボザイムは、アンチセンス分子とは違って触媒的であるので、効率化のためにより低い濃度が要求される。

【0179】

いくつかの態様において、リボザイムは、まずRNAiによって効果的なノックダウン

50

を引き起こすのに十分な配列部分を同定することによって設計してもよい。次にその同じ配列部分をリボザイムに組み込んでもよい。本発明のこの局面において、リボザイム又はRNAiの遺伝子標的部分は、実質的に、少なくとも5つ、好ましくは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20又はそれ以上の連続するヌクレオチド長のPOSH核酸、例えば、配列番号1、3、4、6、8又は10のいずれかに示された配列に記載の核酸とほぼ同じである。長い標的RNA鎖において、相当な数の標的部位がリボザイムに到達できない。なぜなら、それらは2次構造もしくは3次構造内に隠れているからである(Birikhら、(1997) Eur J Biochem 245: 1-16)。標的RNAの到達可能性の問題を克服するために、コンピュータが生成した二次構造の予測を典型的に用いて、たいていは一本鎖であるか、又は「オープン」な構成をもっている標的を同定することができる(Jaegerら、(1989) Methods Enzymol 183: 281-306を参照されたい)。他のアプローチは、二次構造の予測に対する体系的なアプローチを利用する。それは、オリゴヌクレオチド分子をハイブリダイズする、大多数の候補を評価することを含む(Milnerら、(1997) Nat Biotechnol 15: 537-41; and Patzel and Sczakiel (1998) Nat Biotechnol 16: 64-8を参照されたい。さらに、その内容を本明細書中に引用によって援用した米国特許第6、251、588号は、標的核酸へのハイブリダイゼーションの可能性を予測するためのオリゴヌクレオチドプローブ配列を評価する方法を記載している。本発明の方法は、本発明のRNAiオリゴヌクレオチド及びリボザイムの双方を設計する際に、一本鎖であると予測され、さらに、便宜的なその使用、又はほぼ同一の標的rRNA配列のために、好ましくは標的mRNAの10~20の連続的なヌクレオチドを含む、標的mRNA配列の好ましいセグメントを選択するためのそのような方法の使用を提供する。

【0180】

本発明の更なる局面は、単離された「アンチセンス」核酸を使用して、例えば、対象となるPOSH核酸の転写及び/又は翻訳を阻害することによって発現を阻害することに関する。該アンチセンス核酸は、従来の塩基対の相補性によって、又は、例えば、DNA二本鎖に結合する場合は、二重らせんの主溝における特異的な相互作用を介して、潜在的な薬物標的に結合することもできる。通常、これらの方法は、当該技術において通常採用される技法の範囲であり、オリゴヌクレオチド配列に対する特異的な結合に依存するあらゆる方法を含む。

【0181】

本発明のアンチセンスコンストラクトは、例えば、細胞内に転写されたとき、POSHポリペプチドをコードする細胞mRNAの少なくとも1つの特有の部分に対して相補的なRNAを産生する発現プラスミドとして、送達することができる。あるいは、アンチセンスコンストラクトは、生体外で生成され、細胞内に導入されたとき、POSH核酸のmRNA及び/又はゲノム配列ハイブリダイズすることによって、発現の阻害を引き起こすオリゴヌクレオチドプローブである。そのようなオリゴヌクレオチドプローブは、内因性のヌクレアーゼ、例えば、エキソヌクレアーゼ及び/又はエンドヌクレアーゼに対して耐性があり、したがって、インピボで安定である、改変されたオリゴヌクレオチドであることが好ましい。アンチセンスオリゴヌクレオチドとして使用するための核酸分子の例は、DNAのホスホラミデート、ホスホチオエート及びメチルホスホネート類似物である(米国特許第5,176,996号;第5,264,564号および第5,256,775号参照)さらに、アンチセンス治療に有用なオリゴマーを構築するための通常のアプローチを、例えば、van der Krolら、(1988) Biotechniques 6:958-976及びSteinら、(1988) Cancer Res 48:2659-2668によって検討した。

【0182】

翻訳開始部位由来のアンチセンスDNA、オリゴデオキシリボヌクレオチド、例えば、-10~+10の間の領域のPOSH遺伝子が好ましい。アンチセンスアプローチは、POSHポリペプチドをコードするmRNAに相補的なオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)の設計に参与する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、mRNA転写物に結合し

、翻訳を阻害する。絶対的な相補性は、好ましいが必要ではない。二本鎖アンチセンス核酸の場合、二本鎖DNAのうち的一本鎖を試験してもよいし、又は、三重形成をアッセイしてもよい。ハイブリダイゼーション能力は、相補性の度合いと、アンチセンス核酸の長さの双方に依存する。通常、ハイブリダイズする核酸が長いほど、それが含有し、なお二本鎖（場合によっては3本）を形成するかもしれないRNAとのミスマッチが多くなる。当該技術の当業者は、ハイブリダイズされた複合体の融点を測定するための標準的な処置を用いてミスマッチの許容度を確認することができる。

【0183】

mRNAの5'末端、例えば、5'非翻訳配列から上流へそして、AUG開始コドンに相補的なオリゴヌクレオチドは、翻訳を阻害するのにもっとも効果的に機能するはずである。しかしながら、近年、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列も同様に、mRNAの翻訳の阻害に効果的であることがわかってきた(Wagner, R. 1994. Nature 372:333)。したがって、5'又は3'非翻訳、非コード領域の遺伝子に相補的なオリゴヌクレオチドがそのmRNAの翻訳を阻害するためのアンチセンスアプローチにおいて用いられることができるであろう。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補配列を有しているべきである。mRNAコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、あまり効果的に翻訳を阻害しないが、本発明において用いられることができるであろう。mRNAの5'、3'あるいはコード領域のいずれかにハイブリダイズするように設計されていれば、アンチセンス核酸が少なくとも6ヌクレオチドの長さであり、また、好ましくは、約100未満、より好ましく約50、25、17もしくは10ヌクレオチドの長さであるべきである。

【0184】

インビトロ研究は、まず、アンチセンスオリゴヌクレオチドが遺伝子発現を阻害する能力を定量化するために行われることが好ましい。これらの研究は、アンチセンス遺伝子阻害とオリゴヌクレオチドの非特異的な生物学的効果の間の違いを区別する対照を用いることが好ましい。これらの研究は、標的RNA又は蛋白質のレベルを内部コントロールRNA又は蛋白質のレベルと比較することが好ましい。アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて得られた結果を、対照オリゴヌクレオチドを用いて得られた結果と比較してもよい。対照オリゴヌクレオチドは、試験オリゴヌクレオチドとほぼ同じ長さであること、そして、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列が標的配列への特異的なハイブリダイゼーションの阻害に必要な分だけアンチセンス配列と異なることが好ましい。

【0185】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA又はRNA又はキメラ混合物又は誘導体又はその改変型、一本鎖もしくは二本鎖であることができる。オリゴヌクレオチドは、その塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格において改変され、分子の安定性、ハイブリダイゼーションなどを向上させることができる。オリゴヌクレオチドは、他の付加された基、例えば、ペプチド（例えば、宿主細胞受容体を標的とするため）、又は細胞膜の輸送を容易にする物質において（例えば、Letsingerら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556; Lemaitreら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT国際公開W088/09810、1988年12月15日公開を参照されたい）。又は血液-脳関門（例えば、PCT広報第W089/10134号、1998年4月25日公開）、ハイブリダイゼーション誘発性切断物質（例えば、Krolら、1988、BioTechniques 6:958-976を参照されたい）又は、層間物質（intercalating agents）（例えば、Zon、1988、Pharm. Res. 5:539-549を参照されたい）。この目的のために、オリゴヌクレオチドを別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発性架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発性切断剤などと結合させてもよい。

【0186】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの改変された塩基部分を含んでもよい。それは、限定されないが、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5

- (カルボキシヒドロキシチエチル (carboxyhydroxytiethyl) ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルキノシン (galactosylqueosine)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキノシン (mannosylqueosine)、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、パイブトキソシン (wybutoxosine)、シュードウラシル、キノシン (queosine)、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、及び2,6-ジアミンプリンを含む。

【0187】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、限定されないが、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース及びヘキソースから選択される少なくとも1つの改変された糖部分を含んでもよい。

【0188】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、中性のペプチド様骨格を含有することもできる。そのような分子は、ペプチド核酸 (PNA) -オリゴマーと呼ばれ、例えば、Perry-0 'Keefeら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14670 and in Eglomら (1993) Nature 365:566に記載がある。PNAの1つの利点は、それらがDNAの中性骨格ゆえに培地のイオン強度とは本質的に独立して、相補的なDNAに結合することができることである。さらに別の局面において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホラミデート、ホスホジラミデート (phosphordiamidate)、メチルホスホン酸、アルキルホスホトリエステル、及びホルムアセタール (formacetal) 又はその類似体から選択される少なくとも1つの改変されたリン酸骨格を含む。

【0189】

さらに別の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、 β -アノマーオリゴヌクレオチドである。 β -アノマーオリゴヌクレオチドは、通常のアнтиパラレル配向とは対照的に、鎖が互いにパラレルである相補的なRNAとともに特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する (Gautierら、1987、Nucl. Acids Res. 15:6625-6641)。オリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルリボヌクレオチド (Inoueら、1987、Nucl. Acids Res. 15:6131-6148)、又はキメラRNA-DNA類似体 (Inoueら、1987、FEBS Lett. 215:327-330) である。

【0190】

POSH mRNA配列のコード領域に相補的なアンチセンスヌクレオチドを使用することができるとき、転写された非翻訳領域に相補的なものも用いることができる。

【0191】

いくつかの例において、内因性のmRNA上の翻訳を抑制するのに十分なアンチセンスの細胞間濃度を達成することは困難かもしれない。したがって、好ましいアプローチは、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、強いpol IIIもしくはpol IIプロモーターの制御下に配置された組換えDNAコンストラクトを用いる。標的細胞をトランスフェクトするために、そのようなコンストラクトを使用することによって、内因性の潜在的薬物標的転写物に対する相補的な塩基対を形成するであろう一本鎖のRNAの十分な量の転写を結果として行い、それによって翻訳を阻害するであろう。例えば、ベクターは、細胞に取り込まれ、アンチセンスRNAの転写を導くように導入されることができる。そのようなベクターは、それが転写され、所望のアンチセンスRNAを作製する限り、エピソームのまま

あることができ、又は、染色体に統合されることもできる。そのようなベクターは、当該技術において標準的な組換えDNAテクノロジーの方法によって構築することができる。ベクターは、プラスミド、ウイルス又は当該技術において公知のその他のものとしてことができ、哺乳動物細胞における複製及び発現に用いることができる。アンチセンスRNAをコードする配列の発現は、哺乳動物中で機能する、当該技術において公知のあらゆるプロモーターによって行うことができる。そのようなプロモーターは、誘導性又は構成的であることができる。そのようなプロモーターは、限定されないが、SV40初期プロモーター領域（Bernoist及びChambon、1981、Nature 290:304-310）、3'長末端反復のラウス肉腫ウイルス中に含有されるプロモーター（Yamamotoら、1980、Cell 22:787-797）、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagnerら、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinsterら、1982、Nature 296:39-42）などを含む。組換えDNAコンストラクトを調製するために、あらゆる種類のプラスミド、コスミド、YAC又はウイルスベクターを用いることができ、それらは、直接的に組織の部位に導入することができる。

10

【0192】

一方、POSH遺伝子発現は、遺伝子の調節領域（すなわち、プロモーター及び/又はエンハンサー）に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を標的化して、体内の標的細胞中の遺伝子の転写を阻害する三重らせん構造を形成することによって、減少させることができる（一般的に、Helene、C. 1991、Anticancer Drug Des.、6(6):569-84; Helene、C.ら、1992、Ann. N.Y. Acad. Sci.、660:27-36; 及びMaher、L.J.、1992、Bioassays 14(12):807-15を参照されたい）。

20

【0193】

転写を阻害するために、三重らせん体形成において用いられる核酸分子は、一本鎖であり、デオキシリボヌクレオチドで構成されることが好ましい。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成物は、フーグスティーン型塩基対形成の法則によって三重らせん体形成を促進するはずである。それは通常、二本鎖のうちの1つに存在するプリン又はピリミジンのいずれかがかなりの大きさの伸長が必要である。ヌクレオチド配列は、ピリミジンベースであり、それによって、TAT及びCGCTリプレットが生じる。得られた三重らせん体の3つの関連する鎖にわたって存在する。ピリミジンに富んだ分子は、二本鎖のうちの一本鎖において、プリンに富んだ領域に相補的な塩基を提供する。さらに、核酸分子は、プリンに富み、G残基の伸長を含有するように選択することができる。これらの分子は、GC対に富んだDNA二本鎖を持つ三重らせん体を形成するだろう。そこでは、プリン残基の大多数が、標的二本鎖のうちの一本鎖上に位置づけられ、その結果、三重構造内の三重鎖にわたって、CGCTリプレットが生じる。

30

【0194】

あるいは、潜在的な三重らせん体形成の標的とすることができるPOSH配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を生成することによって増加させることができる。スイッチバック分子は、5'-3'、3'-5'を交互に用いる方法によって合成することができ、その結果、それらは二本鎖のうちの最初の一方の鎖、次いで、他方の鎖と塩基対を形成し、二本鎖のうちの1つに存在するプリン又はピリミジンのいずれかがかなりの大きさの伸長を有する必要はなくなる。

40

【0195】

本発明のさらに別の局面は、POSH遺伝子の発現を阻害するためのDNA酵素の使用に関する。DNA酵素は、アンチセンス及びリボザイムテクノロジーの双方の機構的な特徴のいくつかを組み込む。DNA酵素は、アンチセンスオリゴヌクレオチドと非常によく似ており、特定の標的核酸配列を認識するように設計される。しかしながら、リボザイムと非常によく似て、それらは、標的核酸を触媒的及び特異的に切断する。

【0196】

現在、2つの基本的なタイプのDNA酵素が存在する。これらの双方はSantoro及びJoyceによって同定されたものである（例えば、米国特許第6110462号を参照されたい）。10-

50

23 DNA 酵素は、2つの腕に接続したループ構造を含む。この2つの腕は、特定の標的核酸配列を認識することによって、特異性を提供する。一方、そのループ構造は、生理学的条件のもとで触媒的な機能を提供する。

【0197】

簡潔に言えば、標的核酸を特異的に認識し、切断する理想的なDNA 酵素を設計するためには、当該技術の当業者は、まず、特有の標的配列を同定しなければならない。これは、アンチセンスオリゴヌクレオチドのために概説されたものと同じアプローチを用いて行うことができる。好ましくは、該特有の、又は実質的な配列は、G/Cに富んだ約18~22のヌクレオチドである。G/C含有率が高いことによって、DNA 酵素と標的配列の間の相互作用がより強くなる。

10

【0198】

DNA 酵素を合成する場合、酵素をメッセージに対する標的とする特異的なアンチセンス認識配列を、それがDNAの2つの腕を含むように分割する。また、DNA 酵素のループを2つの特異的な腕の間に配置する。

【0199】

DNA 酵素を作製し、投与方法は、例えば、米国特許第6110462号に見出すことができる。同様に、DNAリボザイムをインビボ又はインビトロで送達する方法は、上で詳細に示したように、RNAリボザイムを送達する方法を含む。さらに、当該技術の当業者は、アンチセンスオリゴヌクレオチドと同様、DNA 酵素を任意に改質して、安定性及び分解に対する抵抗性を向上させることができる。

20

【0200】

本発明のアンチセンスRNA及びDNA、リボザイム、RNAi及び三重らせん体分子は、DNA分子及びRNA分子を合成する技術において公知のあらゆる方法によって調製することができる。これらの技術としては、当該技術において公知のオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチドを化学的に合成する技法、例えば、固相ホスホラミダイト化学合成がある。あるいは、RNA分子を、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のインビボ及びインビトロ転写によって生成してもよい。そのようなDNA配列は、T7又はSP6ポリメラーゼプロモーターなどの好適なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込んだ様々なベクターに組み込むことができる。あるいは、アンチセンスRNAを構成的又は誘導的に合成するアンチセンスcDNAコンストラクトを、用いられるプロモーターに依存して、細胞系列に安定に導入することができる。さらに、細胞間の安定性及び半減期を上昇させる手段として、核酸分子に対して種々の公知の改変を導入してもよい。可能な改変としては、限定されないが、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドの隣接する配列を分子の5'末端及び/又は3'末端に追加すること、又はオリゴデオキシリボヌクレオチド骨格内のホスホジエステラーゼ結合よりもむしろ、分子又はホスホチオエートもしくは2' O-メチルを使用することが含まれる。

30

【0201】

9. 薬物スクリーニングアッセイ

いくつかの局面において、本発明はまた、POSH機能と干渉するか、それを促進する治療薬を同定するためのアッセイを提供する。いくつかの態様において、本発明の薬剤は、ウイルスの成熟に任意に干渉する抗ウイルス薬であり、該ウイルスは、レトロイドウイルス、RNAウイルス及びエンベロープウイルスであることが好ましい。いくつかの好ましい態様において、抗ウイルス薬は、POSHのユビキチンリガーゼ触媒的活性と干渉することが好ましい(例えば、POSH自動ユビキチン化又は標的部位への移入)。いくつかの好ましい態様において、抗ウイルス薬は、POSHとPOSH-APポリペプチドとの間の相互作用と干渉する。例えば、抗ウイルス薬は、POSHとPOSH-APポリペプチド、例えば、別のPOSHポリペプチド(POSHダイマー、2つの異なるPOSHポリペプチドのヘテロダイマー、ホモマルチマー及びヘテロマルチマーのような場合); GTPase(例えば、Rac、Rac1、Rho、Ras); E2酵素及びユビキチン、又は任意にcullin; クラスリン; AP-1; AP-2; HSP70; HSP90、Brca1、Bard1、Nef、PAK1、PAK2、PA

40

50

Kファミリー、Vav、Cdc42、PI3K(例えば、p85もしくはp110)、Nedd4、src(srcファミリー)、Gag、特にHIV Gag、Tsg101、VASP、RNB6、WASP、N-WASP及びKIAA0674、Spred-2と同様に、ならびにいくつかの態様において、クラスリンコート小胞と関連することが既知の蛋白質及び又は、蛋白質選別に関与する蛋白質との間の相互作用を破壊するか、又は、不可逆とする。さらに別の態様において、本発明の薬剤は、JNK及び/又はNF- κ Bシグナリングと干渉する抗アポトーシス剤である。さらに別の態様において、本発明の薬剤は、Rac又はRasなどのGTPaseのシグナリングと干渉し、任意にPOSHポリペプチドとRac蛋白質との間の相互作用を破壊する。いくつかの態様において、本発明の薬剤は、POSHのユビキチンリガーゼ活性を調節し、また、ユビキチンリガーゼ活性に関連するいくつかの疾患を治療するために使用することができる。

10

【0202】

いくつかの態様において、本発明は、POSHポリペプチドのユビキチンに関連する活性を増加又は減少する活性を同定、最適化又はそうでなければ評価するためのアッセイを提供する。POSHポリペプチドのユビキチンに関連する活性は、通常、ユビキチンのE2酵素からPOSHポリペプチドへの移入に関与する、POSHポリペプチドの自己ユビキチン化活性、及び通常ユビキチンのPOSHポリペプチドから標的蛋白質への転位に関与する標的蛋白質のユビキチン化を含むことができる。いくつかの態様において、POSH活性は、少なくとも部分的に、POSHRINGドメインによって媒介される。

【0203】

いくつかの態様において、アッセイは、POSHポリペプチド、E2ポリペプチド及びユビキチン源(ユビキチンと予め混合されているE2ポリペプチドであってもよい)を含む混合物を形成することを含む。任意に、該混合物は、E1ポリペプチドを含み、任意に、該混合物は、標的ポリペプチドを含む。該混合物の追加的成分は、POSHポリペプチドのユビキチン化に矛盾しない条件を提供するように選択することができる。POSH-ユビキチン接合体、E2-ユビキチンチオエステル、遊離ユビキチン及び標的ポリペプチド-ユビキチン複合体などの、1以上のパラメータのばらつきを検出してもよい。本明細書において「検出する」という用語は、対象となる検出(例えば、POSH-ユビキチン、E2-ユビキチン、など)の存在もしくは不存在、対象となる検出の量の定量的測定、又は対象となる検出の存在、不存在又は量の、他のパラメータに基づく数学的計算を含むものとして用いられている。「検出する」という用語は、検出対象が感受性を持たない、もしくはそのレベル以下であると判定される状況を含む。検出は、標識(例えば、蛍光標識、放射性同位体標識及び下記に記載のその他のもの)、解像度及び大きさによる同定(例えば、SDS-PAGE、質量分光法)、精製及び検出、及び当該技術の当業者が本明細書に鑑み、入手可能である他の方法の検出を含むことができる。例えば、放射性同位体標識化は、シンチレーション計数、又は写真用エマルジョンに曝した後の濃度計測によって、又はPhosphorimager、Likewiseのような装置を用いることによって、測定することができる。濃度計測を用いて、酵素標識を用いたとき不透明な産物を生成する酵素標識基質と反応した後、ユビキチンとの結合を測定してもよい。好ましい態様において、アッセイは、POSH-ユビキチン接合体を決定することを含む。

20

30

【0204】

いくつかの態様において、アッセイは、POSHポリペプチド、標的ポリペプチド及びユビキチン源(ユビキチンと予め混合されているE2ポリペプチドであってもよい)を含む混合物を形成することを含む。任意に、該混合物は、E1及び/又はE2ポリペプチドを含み、任意に、該混合物は、E2-ユビキチンチオエステルを含む。該混合物の追加的成分は、標的ポリペプチドのユビキチン化に矛盾しない条件を提供するように選択することができる。POSH-ユビキチン接合体、E2-ユビキチンチオエステル、遊離ユビキチン及び標的ポリペプチド-ユビキチン複合体などの、1以上のパラメータのばらつきを検出してもよい。好ましい態様において、アッセイは、標的ポリペプチド-ユビキチン接合体を検出することを含む。別の好ましい態様において、アッセイは、POSH-ユビキチン接合体を検出することを含む。

40

50

【0205】

上記のアッセイは、POSHポリペプチドのユビキチンに関連する活性を調節する薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて用いてもよい。スクリーニングアッセイは、通常上記アッセイのうちの一つ、又はPOSHポリペプチドのユビキチン関連活性活性を評価するため設計された他のいずれかのアッセイに試験物質を添加することを含む。又は、スクリーニングアッセイにおいて検出されたパラメータは、好適な参照と比較してもよい。好適な参照は、以前に、平行してもしくは後から行われたアッセイであってもよい。好適な参照はまた、試験化合物を用いずに以前に測定されたものの平均であってもよい。通常、スクリーニングアッセイ混合物の化合物は、評価すべき活性全体に矛盾しない順序で添加してもよいが、いくつかの変形は好ましい。例えば、いくつかの態様において、試験物質及びE3（例えば、POSHポリペプチド）をプレインキュベートし、その後試験物質を除去し、他の成分を添加してアッセイを完了することが望ましいかもしれない。この方法で、薬剤のみがPOSHポリペプチドに及ぼす効果を評価してもよい。いくつかの好ましい態様において、抗ウイルス薬のためのスクリーニングアッセイは、LDメイン及び好ましくはHIVLDメインを含む標的ポリペプチドを採用する。

10

【0206】

いくつかの態様において、アッセイはハイスループット形式で行われる。例えば、混合物の成分の一つを固体基質に付着させることができ、そして1以上の他の成分を標識する。例えば、POSHポリペプチドは、96ウェルプレートのような表面に付着してもよく、ユビキチンを溶液中に入れ、標識する。E2及びE1もまた溶液中に入れ、POSH-ユビキチン接合体形成を固体表面を洗浄し、混合されなかった、標識されたユビキチンを除去し、結合して残っているユビキチンを検出することによって測定してもよい。他の変形例を用いてもよい。例えば、溶液中のユビキチンの量を検出してもよい。いくつかの態様において、ユビキチン複合体の形成は、FRETのような、相互作用の技法によって測定してもよい。そこでは、ユビキチンを第1の標識によって標識し、所望の複合体パートナー（例えば、POSHポリペプチド又は標的ポリペプチド）を第2の標識によって標識し、第1及び第2の標識が近接して変化した信号を作製するときとき相互作用する。FRETにおいては、第1及び第2の標識は、蛍光体である。FRETについて、以下において、より詳細に説明する。ポリユビキチン複合体の形成は、ポリユビキチンを形成する時に相互作用する、異なるように標識付けされたユビキチンの2つ以上のプールを混合することによって形成してもよい（例えば、米国特許第20020042083号を参照されたい）。ハイスループットは、溶液中と同様、FRETのような相互作用のアッセイを行うことによって達成することができる。さらに、もしPOSHポリペプチド又は標的ポリペプチドなどの混合物中のポリペプチドを容易に精製することが可能であれば（例えば、特異的な抗体を用いて、又はビオチン、FLAG、ポリヒスチジンなどのタグを介して）、その反応を溶液中で行うことができ、タグをつけられたポリペプチドを、タグをつけられたポリペプチドと関連するユビキチンなどのあらゆるポリペプチドと一緒に迅速に単離することができる。蛋白質はまた、検出のためにSDS-PAGEによって分解してもよい。

20

30

【0207】

いくつかの態様において、ユビキチンは、直接的又は間接的に標識される。これによって、典型的に、連結されたユビキチンの検出及び測定を容易かつ迅速に行うことができ、アッセイを、ハイスループットスクリーニング用途に有用なものとする。上記したように、いくつかの態様は、1以上の、タグを付けられた、もしくは標識付けされた蛋白質を採用する。「タグ」は、タグをつけられたポリペプチドの迅速な単離を促進する部分を含むことが意図されている。タグは、ポリペプチドを表面に付着するのを容易にするために用いることができる。「標識」は、標識されたポリペプチドの検出を容易にする部分を含むことが意図されている。いくつかの部分は、標識として及びタグとして用いることができる（例えば、容易に精製され、よく特徴付けられた抗体を用いて検出されたエピトープタグ）。ポリペプチドのビオチン化もよく知られている。例えば、蛋白質、核酸、炭水化物及びカルボン酸のビオチン化のためのアミン反応性及びチオール反応性物質を含む、多く

40

50

のビオチン化合物が公知である。Molecular Probes Catalog; Haugland、第6版、1996、第4章を参照されたい。本明細書中に引用によって援用する。ビオチン化された基質は、アビジン又はストレプトアビジンを介して、ビオチン化された成分に付着することができる。同様に、多くのハプテン化試薬 (haptenylation reagents) も公知である。

【0208】

「E1」は、ユビキチン活性化酵素である。好ましい態様において、E1は、ユビキチンをE2に移入することができる。好ましい態様において、E1は、ユビキチンとの高エネルギーチオエステル結合を形成し、それによってユビキチンを「活性化」する。「E2」は、ユビキチン担体酵素である (ユビキチン結合酵素としても知られている)。好ましい態様において、ユビキチンは、E1からE2へ移入される。好ましい態様において、転移の結果、E2とユビキチンの間にチオエステル結合が生じる。好ましい態様において、E2は、ユビキチンからPOSHポリペプチドへの転移を可能にする。

10

【0209】

別の態様において、POSHポリペプチド、E2又は標的ポリペプチドを、任意にタグの援助を受けて、ビーズに結合させる。連結後、そのビーズは、結合していないユビキチンから分離し、結合しているユビキチンを測定することができる。好ましい態様において、POSHポリペプチドをビーズに結合する。また用いられる組成物は、標識されたユビキチンを含む。この態様において、結合ユビキチンを持つビーズは、蛍光活性化セルソーティング (FACS) 装置を用いて分離してもよい。そのような使用方法は、米国特許出願第09/047,119号に記載されている。その全体を本明細書中に引用によって援用する。次に、結合しているユビキチンの量を測定することができる。

20

【0210】

スクリーニングアッセイにおいて、試験物質の効果は、例えば、試験物質のカイネティクス、定常状態及び/又は反応の指標に及ぼす影響を評価することによって評価してもよい。

【0211】

本明細書で提供される種々のアッセイ混合物の成分は、量を変化させて比較してもよい。好ましい態様において、ユビキチン (又は、E2複合体化ユビキチン) を、反応溶液100マイクロリットルあたり、5~200 ngの最終濃度で組み合わせる。任意に、E1を、反応溶液100マイクロリットルあたり、1~50 ngの最終濃度で組み合わせる。任意に、E2を、反応溶液100マイクロリットルあたり、10~100 ngの最終濃度で組み合わせる。好ましい態様において、POSHポリペプチドを、反応溶液100マイクロリットルあたり、1~500 ngの最終濃度で組み合わせる。

30

【0212】

通常、アッセイ混合物は、ユビキチンリガーゼ活性及び/又はユビキチン化活性に都合がよいように調製される。通常、これは、50~200 mMの塩 (例えば、NaCl、KCl)、pH 5~9、好ましくは6~8といった生理学的条件であろう。そのような条件は、試行錯誤によって最適化することができる。最適な活性を促進するための温度、典型的には、4~40 でインキュベーションすることができる。インキュベーション時間は、最適な活性化を行い、迅速なハイスループットスクリーニングを容易にするように選択することができる。典型的には、0.5~1.5時間で十分であろう。組成物中に様々な他の試薬を含んでもよい。これらは、塩、溶媒、緩衝液、中性蛋白質 (例えば、アルブミン)、界面活性剤などのような、ユビキチン化酵素活性を促進し、及び/又は、非特異的又は背景相互作用を減少させる、試薬を含んでもよい。また、その他の点では、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤などのようなアッセイの効果をもよほす試薬を用いてもよい。組成物は、アデノシン三リン酸 (ATP) 含むことが好ましいであろう。ユビキチンリガーゼ活性を促進する、又は候補調節効果の同定を最適化するあらゆる順序で、成分の混合物を添加してもよい。好ましい態様において、ユビキチンは、反応緩衝溶液中において提供され、その後、ユビキチン化酵素を添加する。別の好ましい態様において、ユビキチンは、反応緩衝溶液において提供され、候補調節物質が添加され、次にユビキチン

40

50

化酵素が添加される。

【0213】

通常、POSHユビキチンに関連する活性を減少させる試験物質を用いて、*in vivo*でのPOSH機能を阻害することができる。一方、POSHユビキチンに関連する活性を増加させる試験物質を用いて、インビボでのPOSH機能を刺激してもよい。試験物質は、インビボでの使用のために、例えば、エステルのような疎水部分を添加することによって改質してもよい。

【0214】

本発明のいくつかの態様は、POSHポリペプチド、任意にSH3又はRINGドメインのようなPOSHの特定のドメインと結合する物質を同定するためのアッセイに関する。好ましい態様において、POSHポリペプチドは、hPOSHの第4のSH3ドメイン（配列番号30）を含むポリペプチドである。この目的のために標識されたインビトロ蛋白質-蛋白質結合アッセイ、電気泳動的移動度シフトアッセイ、蛋白質結合のためのイムノアッセイなどを含む、様々なアッセイを用いることができる。精製された蛋白質はまた、細胞内相互作用のモデル化及び試験物質の設計に用いることができる、3次元結晶構造を測定するために用いることができる。ある態様において、アッセイは、1以上のPOSHポリペプチドの相互作用をPOSH-APを用いて阻害する物質を検出する。別の態様において、アッセイは、酵素活性、他の細胞成分との結合、細胞区画化などのPOSHポリペプチド又はPOSH複合体の固有の生物学的活性を調節する物質を検出する。

【0215】

1つの局面において、本発明は、POSHポリペプチドの機能と干渉する組成物の同定のための方法及び組成物を提供する。ウイルス生成におけるPOSHポリペプチドの役割を例にとれば、POSHポリペプチド間の蛋白質-蛋白質相互作用の形成又は安定性を不安定にする組成物及びそれらが、例えば、POAH-AP、特にウイルス蛋白質を含むPOSH複合体と相互作用する蛋白質は、ウイルス感染の治療のための候補製剤となる。

【0216】

メカニズムに拘束されることを望むわけではないが、POSHポリペプチドが、ビリオン及び他の生物学的プロセスにおいて重要な蛋白質複合体の構築を促進することは自明のことと考えられる。本発明の複合体は、POSHポリペプチドと1以上の下記のPOSH-APとの組み合わせを含んでもよい。POSH-AP、POSHポリペプチド（POSHダイマー、2つの異なるPOSHポリペプチドのヘテロダイマー、ホモマルチマー及びヘテロマルチマーのような場合）；GTPase（例えば、Rac、Rac1、Rho、Ras）；E2酵素及びユビキチン、又は任意にcullin；クラスリン；AP-1；AP-2；HSP70；HSP90、Brca1、Bard1、Nef、PAK1、PAK2、PAKファミリー、Vav、Cdc42、PI3K（例えば、p85もしくはp110）、Nedd4、src（srcファミリー）、Gag、特にHIV Gag、Tsg101、VASP、RNB6、WASP、N-WASP及びKIAA0674、Spred-2と同様に、ならびにいくつかの態様において、クラスリンコート小胞と関連することが既知の蛋白質及び又は、蛋白質選別経路に参与する蛋白質。

【0217】

POSHポリペプチドによて形成される複合体の種類は、蛋白質内に存在するドメインに依存する。限定することを意図されるわけではないが、潜在的な相互作用をする蛋白質のドメインの例を以下に示す。RINGドメインは、cullins、E2酵素、AP-1、AP-2及び/又はユビキチン化のための基質（例えば、いくつかの例において、Gag Lドメインを含む蛋白質）と相互作用することが期待される。SH3ドメインは、Gag Lドメイン及び配列モチーフP(T/S)AP、RXXP(T/S)AP、PXXDY、PXXP、PPXY又はRXXPXXPをもつ例えば、RQGPKEPFR、PFRDY、PTAP及びRPEPTAPなどのHIV Gag配列のような配列をもつその他の蛋白質と相互作用することができる。

【0218】

抗ウイルス薬又は抗アポトーシス剤のための好ましいアッセイでは、試験物質について、それがPOSHポリペプチド及びRacポリペプチド、特にRac1のようなヒトRacポリペ

10

20

30

40

50

チドの複合体の形成を分解するもしくは阻害することができる能力を持つかどうかを評価される。

【0219】

種々のアッセイ形態が可能であろう。そして、本明細書に明確に記載されていないものであっても、当該技術の当業者によって本開示に鑑み、予期されるであろう。蛋白質複合体の形成のような条件に近似するアッセイ形態、酵素活性、及びさらにはPOSHポリペプチド媒介性膜認識又は小胞形成活性は、様々な形式で生成されることができ、それは、無細胞系を基礎としたアッセイ、例えば、精製された蛋白質又は細胞ライセート、ならびにインタクト細胞を利用する細胞ベースアッセイを含む。単純な結合アッセイも、POSHと結合する物質を検出するために用いることができる。そのような結合アッセイはまた、POSHポリペプチドとPOSH相互作用蛋白質との間の相互作用、又はPOSHポリペプチド及びPOSH相互作用蛋白質、又は基質との複合体を破壊することによって機能する物質を同定することもできる。試験される物質は、例えば、細菌、酵母、又は、化学的に合成された（例えば、ペプチドミメティクスを含む小分子）もしくは組換えによって生成されたその他の有機物（例えば、天然の産物）によって作製されることができ、好ましい態様において、試験物質は、例えば、ペプチド又はオリゴヌクレオチド以外の、分子量約2000ダルトン未満の有機物小分子である。

10

【0220】

化合物のライブラリー及び天然の抽出物を試験する、多くの薬物スクリーニングプログラムにおいては、所与の期間において調べる化合物の数を最大にするためにハイスループットアッセイが望ましい。例えば、精製されたもしくは半精製された蛋白質もしくはライセートを用いて開発されてもよい、無細胞系において行われる本発明のアッセイは、それらが生成されて急速な進行及び、試験化合物によって媒介される分子標的における変化の比較的容易な検出を可能にする「一次」スクリーンとして、しばしば好ましい。さらに、試験化合物の細胞毒性及び/又は生物学的利用能は、通常インビトロ系においては無視することができる。該アッセイは、他の蛋白質との結合アフィニティの改変又は分子標的の酵素的ペプチドの変化において明らかになるであろう、薬物の分子標的に及ぼす効果に主に注目している。

20

【0221】

本発明のアッセイの好ましいインビトロの態様において、再構成されたPOSH複合体は、少なくとも半精製蛋白質を含む再構成された混合物を含む。半精製されていることによって、再構成された混合物に用いられた蛋白質があらかじめ他の細胞もしくはウイルス蛋白質から分離されていることを意味する。例えば、細胞ライセートとは対照的に、POSH複合体形成に關与する蛋白質は、混合物中に、他の全ての蛋白質に対して、少なくとも50%、より好ましくは90~95%の純度で存在する。対象となる方法のいくつかの態様において、再構成された蛋白質は、高度に精製された蛋白質と混合することによって誘導される。その結果、再構成された混合物は、POSH複合体構築及び/又は分解を測定する能力と干渉し、そうでなければそれを変更する、他の蛋白質（例えば、細胞もしくはウイルス起源）を実質的に欠く。

30

【0222】

候補阻害剤の存在下及び非存在下で、POSH複合体をアッセイすることは、反応物を含むのに好適なあらゆる容器において達成される。例としては、マイクロタイタープレート、試験管、及びマイクロ遠心チューブがある。

40

【0223】

本発明のある態様において、POSH複合体の構築又は安定性に干渉することができる能力を基礎として、阻害剤を検出する薬物スクリーニングアッセイを生成することができる。結合アッセイの例において、対象となる化合物を、POSHポリペプチド及び少なくとも1つの相互作用ポリペプチドを含む混合物と接触させる。POSH複合体の検出及び定量化は、化合物が2つのポリペプチド間の相互作用を阻害する（あるいは高める）効力を測定する手段を提供する。該化合物の効力は、試験化合物の種々の濃度を用いて得たデ

50

ータからの用量反応曲線を作成することによって評価することができる。さらに、対照アッセイを行って、比較のための基本線を提供することもできる。対照アッセイにおいて、複合体の形成は、試験化合物の不存在下で定量される。

【0224】

POSHポリペプチドと基質ポリペプチドの間の複合体形成は、上記した種々の技法によって検出してもよく、その多くは効率的に上述される。例えば、複合体の形成の調節は、例えば、検出可能に標識された（例えば、放射性標識された、蛍光標識された、又は酵素的に標識された）蛋白質を用いて、イムノアッセイ又はクロマトグラフィーによる検出によって、定量化することができる。例えば、Biacore International AB (Uppsala, Sweden) から入手可能なものような表面プラスモン反応系を用いて、蛋白質-蛋白質相互作用を検出することもできる。

10

【0225】

しばしば、ポリペプチドの1つを固定化し、蛋白質の非複合体形状から複合体を分離することを容易にすること、及び該アッセイの自動化に対応することが望ましいであろう。ある例示的態様において、蛋白質が不溶性のマトリクスと結合することを可能にするドメインを追加した融合蛋白質を提供することができる。例えば、GST-POSH融合蛋白質は、グルタチオンセファロースビーズ上 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 又はグルタチオン由来のマイクロタイタープレート上に吸着することができる。次いでそれを、潜在的な相互作用をする蛋白質、例えば、35S標識ポリペプチド及び試験化合物と組み合わせ、複合体形成に導かれる条件下でインキュベートする。インキュベーション後、ビーズを洗浄して、相互作用するあらゆる結合していない蛋白質を除去し、放射性標識されたマトリックスビーズ結合を直接（例えば、シンチラント中に配置されたビーズ）、又は、例えば、マイクロタイタープレートを用いたときは複合体を解離した後の上清中で測定する。あるいは、非結合の蛋白質を洗浄した後、複合体をマトリクスから解離し、SDS-PAGEゲルによって分離する。そして、標準的な電気泳動技法を用いて、ゲルから相互作用をするポリペプチドのレベルを定量化する。

20

【0226】

さらに別の態様において、POSHに結合する物質は、固定化されたPOSHを用いて同定してもよい。例示的な態様において、融合蛋白質を提供し、蛋白質が不溶性のマトリクスと結合することを可能にするドメインを追加することができる。例えば、GST-POSH融合蛋白質は、グルタチオンセファロースビーズ上 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 又はグルタチオン由来のマイクロタイタープレート上に吸着することができる。次いでそれを、潜在的な標識結合物質と組み合わせ、複合体形成に導かれる条件下でインキュベートする。インキュベーション後、ビーズを洗浄して、相互作用するあらゆる結合していない物質を除去し、放射性標識されたマトリックスビーズ結合を直接、又は、結合物質を解離した後の上清中で測定する。

30

【0227】

さらに別の態様において、POSHポリペプチド及び潜在的な相互作用をするポリペプチドを用いて、蛋白質との相互的な結合を破壊する物質を検出するための、続く相互作用トラップアッセイを生成する（また、米国特許第5,283,317号、Zervosら (1993) Cell 72:223-232; Maduraら (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartelら、(1993) Bio techniques 14:920-924; 及びIwabuchiら、(1993) Oncogene 8:1693-1696を参照されたい）。

40

【0228】

特に、該方法は、ハイブリッド蛋白質を発現するキメラ遺伝子を用いる。例えば、第1のハイブリッド遺伝子は、「餌」蛋白質、例えば、蛋白質相互作用部分と結合するための十分な長さのPOSHポリペプチドのコード配列にフレームで、融合することができる転写活性剤のDNA結合ドメインのコード配列を含む。第2のハイブリッド蛋白質は、「フィッシュ」蛋白質、例えば、餌融合蛋白質のPOSHポリペプチド部分と相互作用するのに十分な長さの潜在的相互作用蛋白質をコードする遺伝子に、フレームで、融合する転写

50

活性剤ドメインをコードする。もし餌及びフィッシュ蛋白質が相互作用することができれば、例えば、P O S H複合体を形成することができれば、それらは、転写活性剤の2つのドメインに密接に近接する。転写活性剤の2つのドメインとの、この近接は、転写活性剤に反応する転写調節部位と作動可能に連結するレポーター遺伝子の転写を生じさせ、レポーター遺伝子の発現が検出され、餌蛋白質とフィッシュ蛋白質との相互作用を得るために用いることができる。

【0229】

本発明において、該方法は、宿主細胞、好ましくは、酵母細胞、例えば、キラー酵母 (*Kluyveri lactis*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、イモチ病菌ウイルス (*Ustilago maydis*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、アカパンカビ (*Neurospora crass*)、クロカビ (*Aspergillus niger*)、偽巢性コウジ菌 (*Aspergillus nidulans*)、*Pichia pastoris*、カンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*)、及び *Hansenula polymorpha* であり、最も好ましくは、出芽酵母または分裂酵母である、宿主細胞を提供することを含む。該宿主細胞は、餌蛋白質に用いられる転写活性剤のDNA結合ドメインの結合部位を持つレポーター遺伝子を含み、その結果、レポーター遺伝子は、該遺伝子が転写的に活性化されたとき、検出可能な産物を発現する。第1のキメラ遺伝子は、宿主細胞宿主細胞の染色体に存在していてもよく、又は、発現ベクターの一部として存在していてもよい。相互作用トラップアッセイはまた、哺乳動物細胞型及び細菌細胞型として行うこともできる。

10

【0230】

宿主細胞はまた、宿主細胞中で発現することができる第1のキメラの遺伝子を含む。該遺伝子は、(i) 宿主細胞のレポーター遺伝子上の応答エレメントを認識する、DNA結合ドメイン、及び(ii) P O S Hポリペプチド配列のような餌蛋白質、を含むキメラ蛋白質をコードする。

20

【0231】

第2のキメラ遺伝子はまた、宿主細胞において発現することができ、「フィッシュ」融合蛋白質をコードするように提供される。ある態様において、第1及び第2のキメラ遺伝子は、プラスミドの形態で宿主細胞に導入される。しかしながら、好ましくは、第1のキメラ遺伝子は、宿主細胞宿主細胞の染色体に存在し、第2のキメラ遺伝子はプラスミドの形態で宿主細胞に導入されることが好ましい。

30

【0232】

第1のハイブリッド蛋白質のDNA結合ドメイン及び第2のハイブリッド蛋白質の転写活性化ドメインは、分離可能なDNA結合ドメイン及び転写活性化ドメインを持つ転写活性剤に由来することが好ましい。例えば、これらの分離したDNA結合ドメイン及び転写活性化ドメインは、酵母GAL4蛋白質中に見出されることがわかっており、また、酵母GCN4及びADR1中に見出されることがわかっている。転写に関与する多くの他の蛋白質も、本発明にとって有用な結合ドメイン及び転写活性化ドメインを持ち、例えば、LexA及びVP16蛋白質を含む。他の(実質的に)転写的に不活性なDNA結合ドメインを、ACE1、Ic1、Iacリプレッサー、junもしくはfosのドメインのような対象となるコンストラクトに用いることができる。別の態様において、DNA結合ドメイン及び転写活性化ドメインは、異なる蛋白質から構成されていてもよい。LexA DNA結合ドメインを使用することによって、いくつかの利点をもたらされる。例えば、酵母において、LexA部分は、活性化機能を含みおらず、酵母の転写に及ぼす公知の効果がない。さらに、LexAを使用することによって、アッセイの感受性を相互作用のレベルに制御することが可能となる(例えば、Brentら、P C T国際公開W094/10300号を参照されたい)。

40

【0233】

好ましい態様において、餌又はフィッシュ蛋白質と関連する、あらゆる酵素活性が不活性化される。例えば、P O S Hポリペプチドのドミナントネガティブ又は他の突然変異を用いることができる。

【0234】

50

さらに、例示的な例では、もしあれば、宿主細胞中の餌蛋白質とフィッシュ融合蛋白質の間の、P O S Hポリペプチド媒介型相互作用によって、活性化ドメインが、レポーター遺伝子の転写の活性化を引き起こす。その方法は、第1のキメラ遺伝子及び第2のキメラ遺伝子を宿主細胞中に導入し、その細胞を餌及びフィッシュ融合蛋白質がレポーター遺伝子を活性化するのに十分な量で発現する条件下におくことによって行われる。P O S H - P O S H - A P複合体の形成によって、レポーター遺伝子の発現によって生成される検出可能な信号が生じる。したがって、試験化合物の存在下及び試験化合物の不存在下における複合体の形成のレベルは、それぞれのケースにおけるレポーター遺伝子の発現のレベルを検出することによって、評価することができる。種々のレポーターコンストラクトは、本発明の方法において用いることができ、例えば、そのような検出可能なシグナルを酵素シグナル、蛍光シグナル、リン光シグナル及び薬物抵抗性から選択されるように信号を生成するレポーター遺伝子を含む。

10

【0235】

本発明の1つの局面は、P O S Hポリペプチド及び1以上の相互作用するポリペプチドを含む、再構成された蛋白質製剤を提供する。

【0236】

本発明のアッセイのさらに別の態様において、P O S H複合体は、対象となるアッセイを支持するための細胞培養技法の利点を用いて、細胞全体において生成される。例えば、以下に述べるように、P O S H複合体は、哺乳動物細胞や酵母細胞を含む真核細胞培養系において構成されることができる。しばしば、1以上のウイルス蛋白質（例えば、Gag又はEnv）を、対象となるP O S Hポリペプチドに沿った細胞において発現することが望ましいだろう。細胞を関連するウイルスに感染させることも望ましいかもしれない。対象となるアッセイを、インタクト細胞において生成させることの利点は、環境において、阻害剤の治療的使用が要求する環境により近づける機能を果たす阻害剤を検出することができることを含み、薬剤が細胞に入る能力を含む。さらに、いくつかのアッセイのインビボ環境での態様において、例えば、下記の例は、候補物質のハイスループット分析に適用される。

20

【0237】

P O S H複合体の成分は、アッセイを支持するために選択された細胞に対して内因性である。あるいは、一部もしくは全ての成分を外因性のソースから導くことができる。例えば、融合蛋白質は、組換え技法（例えば、発現ベクターの使用によって）によって、ならびに融合蛋白質そのもの又は該融合蛋白質をコードするmRNAをマイクロインジェクションによって細胞中に導入することができる。

30

【0238】

多くの態様において、細胞は、候補物質とともにインキュベートした後、操作される。そしてP O S H活性についてアッセイする。いくつかの態様において、P O S H活性は、ウイルス様粒子の生成によって表される。本明細書において実証されているように、P O S H活性を破壊する物質は、ウイルス様粒子の生成を減少させる。P O S H活性のための他のバイオアッセイは、アポトーシスアッセイ（例えば、細胞生存アッセイ、アポトーシスレポーター遺伝子アッセイなど）及びNF- κ B核局在化アッセイ（例えば、Taponら、(1998) EMBO J. 17: 1395-1404を参照されたい）を含む。いくつかの態様において、P O S H活性は、限定されないが、複合体形成、ユビキチン化及び膜融合現象（例えば、ウイルス出芽の放出もしくは小胞の融合）を含む。P O S H複合体形成は、免疫沈降及び共免疫沈降された蛋白質の分析又はアフィニティ精製及び共精製された蛋白質の分析によって評価することができる。蛍光共鳴エネルギー転移（Fluorescence Resonance Energy Transfer）（FRET）ベースのアッセイを用いて、複合体形成を測定することもできる。互いに近接して接触している適切な発光スペクトル及び励起スペクトルを有する蛍光分子は、FRETを示すことができる。蛍光分子は、分子のうちの1つの分子（ドナー分子）の発光スペクトルが他の分子（アクセプター分子）の励起スペクトルと重なるように、選択される。ドナー分子は、ドナー励起スペクトル内で、適切な強度の光によって励起される。次にド

40

50

ナーは、蛍光として吸収されたエネルギーを発する。それが生成する蛍光エネルギーは、アクセプター分子によって急冷される。FRETは、ドナーからの蛍光シグナルの強度の減少、その励起された状態の寿命の減少、及び/又は長い波長（低エネルギー）での蛍光の特徴のアクセプターの再発光として明確に示され得る。蛍光蛋白質が分離されたとき、FRET効果は、減少又は除去される（米国特許第5,981,200号）。

【0239】

例えば、シアン蛍光蛋白質を、およそ425～450nmの波長の光によって励起し、450～500nmの波長の光を発光する。黄色蛍光蛋白質を、500～525nmの波長の光によって励起し、525～500nmの波長の光を発光する。これら2つの蛋白質を溶液中に入れ、シアン及び黄色の機構を別々に視覚化してもよい。しかしながら、これら2つの蛋白質を互いに近接させると、蛍光特性は、FRETによって変わるだろう。CFPから発光された青色の光はYFPによって吸収され、黄色の光として再び発光されるであろう。このことは、蛋白質が波長450nmの光によって刺激されたとき、シアン発光が大いに減少し、通常この波長では刺激されない黄色の光が大いに増加することを意味する。FRETは、典型的に、ドナーの刺激範囲の光による刺激に反応して発光された光のスペクトルを測定し、ドナー発光性の光とアクセプター発光性の光との間の率を計算することによってモニターする。ドナー発光性の光：アクセプター発光性の光の率が高いとき、FRETは生じず、2つの蛍光蛋白質は、近接していない。ドナー：アクセプターの発光の率が低いとき、FRETが生じ、2つの蛍光蛋白質は、近接している。この方法において、第1と第2のポリペプチドの間の相互作用を計算してもよい。

【0240】

FRETの発生はまた、ドナー蛍光部分の寿命を減少させる原因となる。この蛍光寿命の変化は、蛍光寿命イメージングテクノロジー（FLIM）と呼ばれる技法を用いて測定することができる（Verveerら、（2000）*Science* 290: 1567-1570; Squireら、（1999）*J. Microsc.* 193: 36; Verveerら、（2000）*Biophys. J.* 78: 2127）。FLIMデータを分析するための全体的分析技法が開発されてきた。これらのアルゴリズムは、ドナー蛍光部分が、そのそれぞれが異なる蛍光寿命をもつ限られた状態においてのみ存在するという理解を用いている。各状態の定量マップをピクセルごとに生成することができる。

【0241】

FRETベースのアッセイを行うために、対象となるPOSHポリペプチド及び相互作用を行う蛋白質を双方とも蛍光標識する。好適な蛍光標識は、本明細書に鑑み、当該技術において公知である。例を以下に記載する。しかし、特に記載されていない好適な蛍光標識も当該技術の当業者は入手することができる。蛍光標識は、蛍光蛋白質、例えば、クラゲ、サンゴ及び他の腔腸動物から単離された蛍光蛋白質をもつ融合蛋白質として、ポリペプチドを発現することによって、達成してもよい。蛍光蛋白質の例としては、*Aequoria victoria*の緑蛍光蛋白質（GFP）の多くの変種が含まれる。変種は、より明るくてもよいし、薄暗くてもよい。又は、異なる励起及び/又は発光スペクトルを持っていてもよい。いくつかの変形例は、それらがもはや緑として現れず、青、シアン、黄色もしくは赤として現れる（それぞれ、BFP、CFP、YFP及びRFPと呼ぶ）ように変化させる。蛍光蛋白質は、例えば、ペプチド結合（例えば、融合蛋白質として発現）、化学的架橋及びビオチン-ストレプトアビジン結合を含む、種々の共有結合及び非共有結合を介して安定にポリペプチドに付着してもよい。蛍光蛋白質の例としては、米国特許第5,625,048号；第5,777,079号；第6,066,476号；第6,124,128号；Prasherら、（1992）*Gene*, 111:229-233; Heimら、（1994）*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:12501-04; Wardら、（1982）*Photochem. Photobiol.*, 35:803-808; Levineら、（1982）*Comp. Biochem. Physiol.*, 72B:77-85; Tersikhら、（2000）*Science* 290: 1585-88を参照されたい。

【0242】

当該技術において公知の他の蛍光部分の例としては、フルオレセインの誘導体、ベンゾオキサジアゾール（benzoxadiazole）、クマリン、エオシン、ルシファーイエロー、ピリジロキサゾール及びローダミンがあげられる。これらの及び他の例の蛍光部分が、そ

10

20

30

40

50

のような部分を持つポリペプチドを改質するための方法とともに Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (2000, Molecular Probes, Inc.) に見出されるであろう。蛍光部分と組み合わせたときに蛍光発光する蛋白質の例としては、*Vibrio fischeri* (Baldwin et al. (1990) Biochemistry 29:5509-15) からの黄色蛍光蛋白質、渦鞭毛藻類からのペリジニン - クロロフィル a (peridinin-chlorophyll a) 蛍光蛋白質 (Morrisら、(1994) Plant Molecular Biology 24:673:77) 及び *Synechococcus* などの海生ラン藻からのフィコピリンタンパク質、例えば、フィコエリトリン及びフィコシアニン (Wilbanksら (1993) J. Biol. Chem. 268:1226-35) が含まれる。これらの蛋白質は、それぞれ蛍光共因子としてのフラビン、ペリジニン - クロロフィル a (peridinin-chlorophyll a) 及び種々フィコピリンが必要である。

10

【0243】

FRETベースのアッセイは、細胞ベースのアッセイ及び無細胞アッセイに用いることができる。FRETベースのアッセイは、蛍光活性化細胞ソーティング及びマイクロタイターの蛍光走査を含むハイスループットスクリーニング法の対象となる。

【0244】

さらなる態様において、POSHによって調節される遺伝子を同定するために、転写レベルをより高い又は低いレベルのPOSH活性を持つ細胞内で測定することができる。そのような遺伝子(そのような遺伝子のより大きな部分)のプロモーター領域は、レポーター遺伝子と作動可能に連結し、レポーター遺伝子ベースのアッセイにおいて用いて、POSH調節遺伝子発現を高めたり、又は減少させる物質を検出することができる。転写レベルは、当該技術において公知のあらゆる方法、例えば、ノーザンブロットング、RT-PCR、マイクロアレイなどによって測定することができる。POSH活性の上昇は、例えば、強いPOSH発現ベクターを導入することによって達成することができる。POSH活性の減少は、例えば、RNAi、アンチセンス、リボザイム、遺伝子ノックアウトなどによって達成することができる。

20

【0245】

通常、スクリーニングアッセイは、結合アッセイ(蛋白質-蛋白質結合、物質-蛋白質結合など)であり、標識が直接的又は間接的に検出可能なシグナルを提供する場合、1以上の分子を標識に結合することができる。種々の標識としては、放射性同位体、蛍光剤、化学発光剤、酵素、特異的結合分子、粒子、例えば、磁気粒子などが含まれる。特異的結合分子は、ビオチンとストレプトアビジン、ジゴキシンと抗ジゴキシンなどの対を含む。特異的結合部位としては、通常、相補的な部分が、検出のために用いられる分子によって、公知の方法にしたがって標識される。

30

【0246】

さらにさらなる態様において、本発明は、治療的介入のための標的を同定するための方法を提供する。POSHと相互作用する又はPOSH媒介性のプロセス(例えば、ウイルス成熟)に関係するポリペプチドを、候補治療薬を同定するために用いることができる。そのような標的は、POSH (POSH-APs) と関連する蛋白質を同定することによって同定することができる。例えば、抗POSH抗体を用いた免疫沈降、コンピュータでのハイスループットの結合データ分析、2ハイブリッドスクリーン、及び本開示を鑑み、当該技術において公知の本明細書及び他の箇所で記載されている他の蛋白質-蛋白質相互作用アッセイによって同定することができる。そのような標的に結合する又はそれらの蛋白質-蛋白質相互作用を破壊する、又はそれらの生化学的活性を阻害する物質を、そのようなアッセイにおいて用いることができる。そのようなアプローチによって同定されるかもしれない標的としては、GTPase (例えば、Rac、Rac1、Rho、Ras); E2酵素、cullin; クラスリン; AP-1; AP-2; HSP70; HSP90、Brca1、Bard1、Nef、PAK1、PAK2、PAKファミリー、Vav、Cdc42、PI3K (例えば、p85もしくはp110)、Nedd4、src (srcファミリー)、Gag、特にHIV Gag、Tsg101、VASP、RNB6、WASP、N-WASP及びKIAA0674、Spred-2と同様に、ならびにいくつかの態様において、クラスリンコート小胞と関連することが既知の蛋白質及び又は、蛋白質選別経路に関与する蛋白質、Rac シグナリング経

40

50

路に關与する蛋白質が含まれる。

【0247】

スクリーニングアッセイには、種々の他の試薬を導入することができる。これらは、塩、溶媒、緩衝液、中性蛋白質（例えば、アルブミン）、界面活性剤などのような最適な蛋白質間結合を容易とし、ユビキチン化酵素活性を促進し、及び/又は、非特異的又は背景の相互作用を減少させる、試薬をを含まなくてもよい。プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤などのようなアッセイの効果を高める試薬を用いてもよい。成分の混合物は、必要な結合を提供するあらゆる順序で添加される。インキュベーションは、あらゆる好適な温度、典型的には、4 ~ 40で行われる。インキュベーション時間は、最適な活性化を行い、迅速なハイスループットスクリーニングを容易にするように選択することができる

10

【0248】

いくつかの態様において、試験物質について、POSHポリペプチドの局在化、例えば、POSHの核及び/又はゴルジ体ネットワークに、局在化を不安定にすることができる能力があるかどうかを評価する。

【0249】

10. ウイルス性障害の治療のための方法及び組成物

さらなる局面において、本発明は、ウイルス性障害、特に、レトロウイルス、RNAウイルス及び/又は限定されないがレトロウイルス、ラウドウイルス、レンチウイルス及びフィロウイルスなどを含むのエンベロープウイルスによって引き起こされる障害の治療のための方法及び組成物を提供する。本発明の好ましい治療薬は、ウイルス成熟におけるPOSHポリペプチド又はPOSH複合体の生物学的活性を破壊することによって機能する。

20

【0250】

本発明の治療薬の例としては、例えば、RNAiコンストラクト、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム及びDNA酵素などの核酸治療薬が含まれる。他のPOSH治療薬としては、ポリペプチド、ペプチドミメティクス、抗体及び小分子を含む治療薬がある。

【0251】

本発明のアンチセンス治療としては、POSHポリペプチドの発現を破壊するためのアンチセンス核酸、又はPOSH機能に必要な蛋白質を導入する方法が含まれる。

30

【0252】

RNAi治療は、RNAiコンストラクトをPOSHポリペプチドの発現をダウンレギュレーションするためのコンストラクト、又はPOSH機能に必要な蛋白質を導入する方法が含まれる。RNAi治療薬の例は、配列番号15、16、18、19、21、22、24及び25のいずれか1つを含む。

【0253】

治療用ポリペプチドは、ポリペプチドをPOSH複合体、例えばSH3又はRINGドメインの形成において重要ないくつかの蛋白質ドメインを模倣するように設計することによって生成することができる。例えば、配列番号30に示されたSH3ドメインのようなPOSH SH3ドメインを含むポリペプチドを、POSH SH3ドメインに結合するよう競合させ、よってパートナー蛋白質の結合を破壊する機能を果たす。ある態様において、結合パートナーはGagとすることができる。別の態様において、結合パートナーはRacとすることができる。さらに別の態様において、LDメインに類似するポリペプチドは、POSH複合体へのGagの再構成を破壊することもできる。

40

【0254】

本明細書に鑑み、POSH及びPOSH相互作用蛋白質のエピトープに対する抗体を生成する方法は、当該技術において公知である。抗体は、種々の方法によって細胞に導入することができる。1つの方法の例は、POSH複合体を破壊することが可能な一本鎖抗体をコードする核酸を生成することを含む。そのような核酸は、標的細胞の表面上のレセプ

50

ターと結合する抗体と結合することができる。いくつかの態様において、該抗体は、感染した細胞の表面に存在するウイルス蛋白質を標的とすることができ、このようにして感染した細胞のみに核酸を送達すると考えられている。標的細胞の表面に結合すると、該抗体は、エンドサイトーシスによって取り込まれ、接合型の核酸が転写及び翻訳されて、標的 P O S H 複合体と相互作用し、そしてそれを破壊する一本鎖の抗体を作製する。所望の一本鎖の抗体を発現する核酸はまた、ウイルストラנסフェクション（例えば、アデノウイルス系を用いて）、又はリポソーム媒介型のトラנסフェクションなどの種々のより便利な技法を用いて、細胞に導入することができる。

【0255】

本発明の小分子を、上記のように、P O S H 複合体の形成を調節する能力によって同定され得る。 10

【0256】

本明細書の教示に鑑み、当該技術の当業者は、本発明の方法が例えば、レトロウイルス、RNAウイルス及びエンベロープウイルスなどの広範囲のウイルスに適用できることを理解するであろう。好ましい態様において、本発明は、レトロウイルスに適用できる。より好ましい態様において、本発明は、レトロウイルス（レトロウイルス科）にさらに適用できる。別のさらに好ましい態様において、本発明は、霊長類レンチウイルス群を含むレンチウイルスに適用できる。最も好ましい態様において、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、免疫不全ウイルスI型（HIV-1）、B型肝炎ウイルス（HBV）及びヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV）に適用できる。 20

【0257】

限定することを意図するわけではないが、関連するレトロウイルスは、Northern Pike においてリンパ肉腫を引き起こすC型レトロウイルス、ミンクを感染させるC型レトロウイルス、ヒツジを感染させるヤギレンチウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、ブタを感染させるC型レトロウイルス、トリ白血病ウイルス（ALSV）、ネコ白血病ウイルス（FeLV）、ウシ白血病ウイルス（BLV）、サル白血病ウイルス（SLV）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ヒトT細胞白血病ウイルスI型（HTLV-I）、ヒトT細胞白血病ウイルスII型（HTLV-II）、ヒト免疫不全ウイルス2型（HIV-2）及びヒト免疫不全ウイルスI型（HIV-1）を含む。

【0258】

本発明の方法及び組成物はさらに、ssRNA マイナス鎖ウイルス及びssRNA プラス鎖ウイルスを含むRNAウイルスに適用できる。ssRNA プラス鎖ウイルスは、C型肝炎ウイルス（HCV）を含む。好ましい態様において、本発明は、フィロウイルスを含むモノネガウイルス目に適用できる。フィロウイルスは、さらに、エボラウイルス及びマールブルグウイルスを含む。 30

【0259】

他のRNAウイルスは、エンテロウイルス、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス及びA型肝炎ウイルスなどのピコルナウイルス、ノーウォーク様ウイルスを含むカリチウイルス、狂犬病ウイルスを含むラブドウイルス、ウイルスを含むトーガ（toga）ウイルス、セムリキ森林ウイルス、デングウイルス、黄熱病ウイルス及び風疹ウイルス、A、B 及びC型インフルエンザウイルスを含むオルソミクソウイルス、リフトバレーウイルス及びハンタウイルスを含むブニアウイルス、エボラウイルス及びマールブルグウイルスなどのフィロウイルス、ならびにおたふく風邪ウイルス及びはしかウイルスを含むパラミクソウイルスを含む。治療できるかもしれない追加的ウイルスとして、ヘルペスウイルスがある。 40

【0260】

1.1. 効果的な用量

そのような化合物の毒性及び治療効果は、細胞培養中又は実験動物での標準的な製剤の処置、例えば、50%致死量（LD50）（母集団の50%が死に至る用量）及び50%有効量（ED50）（母集団の50%において治療的に有効な用量）の測定によって決定 50

することができる。毒性と治療効果の比率は、治療的指標である。そして、それは、LD₅₀/ED₅₀と表すことができる。大きな治療的誘発を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を用いてもよい。感染していない細胞に対する潜在的損傷を最小限にし、それによって副作用を減少させるために、そのような化合物を罹患組織の部位に標的化する送達系を設計は注意深く行う必要がある。

【0261】

細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータを、ヒトに使用するための用量範囲を処方する際に用いることができる。そのような化合物の用量は、毒性が少ないもしくは全くもたないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。用量は、採用された投与形態及び用いられる投与経路に依存してこの範囲内で変化してもよい。本発明の方法に用いられるあらゆる化合物について、治療的に有効な用量は、まず、細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて処方して、細胞培養において決定するように、IC₅₀（すなわち、症状の半最大抑制を達成する化合物の濃度）を含む循環血漿濃度の範囲を達成することもできる。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために用いることができる。血漿レベルは、例えば、高性能液体クロマトグラフィーによって測定してもよい。

10

【0262】

1.2. 製剤及び使用

本発明において使用される薬学的組成物は、1以上の生理学的許容できる担体又は添加剤を用いた常法により製剤することができる。したがって、化合物及びそれらの生理学的に許容できる塩及び溶媒は、例えば、注射、吸入又は注入（口もしくは鼻から）又は経口、頬側、非経口又は直腸投与によって投与するように製剤することができる。

20

【0263】

本発明の組成物の例としては、リポソーム系のような送達系と組み合わせられた、任意に許容される添加物を含むRNAiを含む。好ましい態様において、組成物は、例えば、ヘルペスウイルス感染のための局所投与用に製剤することができる。

【0264】

そのような治療のために、本発明の化合物は、全身投与及び局所又は限局的投与を含む、様々な量の投与のために製剤することができる。技法及び製剤は一般的に、Remington's Pharmaceutical Sciences、Meade Publishing Co.、Easton、PAを参照することができる。全身投与については、筋肉内、静脈内、腹腔内及び皮下といった注射が好ましい。注射には、本発明の化合物は、液体溶液、好ましくは、ハルクス液又はリンゲル溶液などの生理学的に適合性のある緩衝液中で製剤することができる。さらに、該化合物は、溶液剤型に製剤してもよく、また、使用直前に再び溶解もしくは懸濁させる剤型に製剤してもよい。凍結乾燥剤型も含まれる。

30

【0265】

経口投与では、薬学的組成物は、例えば、薬学的許容される添加剤、例えば、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンブ、ポリビニルピロリドンもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；フィラー（例えば、ラクトース、微結晶性セルロースもしくはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクもしくはシリカ）；分解物質disintegrants（例えば、ジャガイモデンブもしくはデンブングリコール酸ナトリウム）；又は湿潤剤（例えば、ナトリウムラウリル硫酸塩）などを用いて従来手段によって調製された錠剤又はカプセルの形状を取ることができる。錠剤は、当該技術において公知の方法によってコーティングすることができる。経口投与のための液体製剤は、例えば、溶液、シロップ、懸濁液の形状を取ることができる。又は使用前に、水もしくは好適な賦形剤を用いて構成するための乾燥産物として存在させることもできる。そのような液体製剤は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導體もしくは硬化食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチンもしくはアカシア）；非水系賦形剤（例えば、アチオンドオイル（atiod oil）、油性エステル、エチルアルコールもしくは分画された植物油）；及び保存剤（例えば、メチルもしくはプロピル-p-ヒドロキシオキシ

40

50

ベンゾエート又はソルビン酸)などの薬学的に許容できる添加物を用いて従来的手段で調製することができる。製剤は、適切であれば、緩衝塩、香味剤、着色剤及び甘味料を含有することができる。

【0266】

経口投与用製剤は、活性化合物の放出を制御するように好適に製剤することができる。類側投与としては、常法によって調剤された錠剤又はロゼンジの剤型を取ることができる。吸入による投与としては、本発明で使用するための化合物を、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素もしくはその他の好適な気体などの好適な噴霧剤を用いて、加圧パック又はネブライザーから出されるエアゾールスプレーの剤型で送達することが好都合である。加圧されたエアゾールの場合、用量単位は、測定された量を送達するための弁をもうけることによって測定することができる。例えば、吸入器又は注入器に用いられるゼラチンのカプセル及び薬包は、化合物及びラクトース又はデンプンなどの好適な粉末基剤を含有して調剤することができる。

10

【0267】

化合物は、注射、例えば、ボラス注射又は連続的な注入によって、非経口投与用に調剤することができる。注射のための調剤は、例えば、アンプルもしくは多回用量容器中で、保存料を添加した単位用量の剤型とすることができる。組成物は、油性もしくは水溶性添加剤中の懸濁液、溶液もしくはエマルジョンの形状を取ることができ、懸濁剤、安定化剤、及び/又は分散剤などの製剤物質を含有することができる。あるいは、使用前には、活性成分を、例えば、無菌発熱物質自由水のような好適な添加剤を持つコンストラクトの粉末の剤型とすることができる。

20

【0268】

化合物はまた、例えば、ココアバター又は他のグリセリドなどの従来坐薬基剤を含有する、例えば、坐薬もしくは保留浣腸のような直腸用組成物とすることもできる。

【0269】

すでに述べた調剤に加えて、化合物はまた、デポー剤として調剤することができる。そのような長く機能する調剤は、埋め込み(例えば、皮下もしくは筋肉内)又は筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、該化合物は、好適なポリマーもしくは疎水性材料(例えば、許容できる油中のエマルジョンとして)又はイオン交換樹脂、又は溶解性が限られている誘導體、例えば、溶解性が限られている塩と一緒に調剤することができる。

30

【0270】

全身投与はまた、経粘膜もしくは経皮手段によって行うことができる。経粘膜もしくは経皮投与としては、通過すべきバリアにとって適切な浸透剤を調剤中に用いることができる。そのような浸透剤は、当該技術において一般的に知られており、そして例えば、経粘膜投与としては、界面活性剤に加えて、胆汁酸塩及びフシジン酸誘導體を用いて、浸透を容易にすることができる。経皮投与は、点鼻薬を介して行われてもよい。局所投与としては、本発明のオリゴマーは、軟膏、膏薬、ジェルもしくはクリーム上に、当該技術において通常知られているように調剤される。洗浄液を用いて、局所的に用いて、外傷や炎症を治療し、癒合を早めることもできる。

40

【0271】

望ましければ、組成物は、活性成分を含有する1以上の単位用量の剤型を含有することができるパック中又はディスペンサー装置中に入れておくこともできる。パックは例えば、プリスター包装のように、金属もしくはプラスチック箱を含むことができる。パック又はディスペンサー装置は、投与のための指示にしたがって行うことができる。

【0272】

核酸の投与を含む治療としては、本発明のオリゴマーを、全身投与及び局所もしくは局部投与を含む、種々の投与形態に調剤することができる。技法及び製剤は一般的に、Remington's Pharmaceutical Sciences、Meade Publishing Co.、Easton、PAを参照する

50

ことができる。全身投与については、筋肉内、静脈内、腹腔内、結節内、及び皮下といった注射が好ましく、本発明のオリゴマーは、液体溶液、好ましくは、ハックス液又はリンゲル溶液などの生理学的に適合性のある緩衝液中で製剤することができる。さらに、該化合物は、溶液剤型に製剤してもよく、また、使用直前に再び溶解もしくは懸濁させる剤型に製剤してもよい。凍結乾燥剤型も含まれる。

【0273】

全身投与はまた、経粘膜もしくは経皮手段によって行うことができる、又は化合物は経口投与することができる。経粘膜もしくは経粘膜投与としては、通過すべきバリアにとって適切な浸透剤を調剤中に用いることができる。そのような浸透剤は、当該技術において一般的に知られており、そして例えば、経粘膜投与としては、胆汁酸塩及びフシジン酸誘導体を用いて、浸透を容易にすることができる。さらに界面活性剤を用いて浸透を加速することもできる。経粘膜投与は、点鼻薬を介して行われてもよい。経口投与には、オリゴマーは、カプセル、錠剤及び強壯剤 tonics といった通常の経口投与の剤型に調剤される。局所投与としては、本発明のオリゴマーは、軟膏、膏薬、ジェルもしくはクリーム状に、当該技術において通常知られているように調剤される。

10

【0274】

実施例

本発明を一般的に記載してきたが、本発明は下記の実施例をを参照することによって、より容易に理解されるであろう。実施例は、本発明のいくつかの局面及び態様を単に説明する目的のために含まれるものであって、本発明を限定することは意図されていない。

20

【実施例】

【0275】

1. ウイルス様粒子 (VLP) の出芽における POSH の役割

1. 目的

POSH 遺伝子の発現を阻害するために RNAi を使用する。治療された及び治療されていない細胞中における、ウイルス出芽の効率と GAG の発現およびプロセッシングとを比較する。

【0276】

2. 研究計画

標的蛋白質をノックダウンするために、mRNA 特異的 RNAi で HeLa SS-6 細胞をトランスフェクトする。RNAi による標的蛋白質の減少が最大に達するのは 48 時間後であるので、細胞を 2 回、すなわち、最初は、標的 mRNA を減少させるために、次いで、ウイルス性 Gag 蛋白質を発現させるために、トランスフェクトする。2 回目のトランスフェクションは、pNLenv (HIV をコードするプラスミド) 及び低量の RNAi を用いて行い、gag の発現と VLP の出芽の間、標的蛋白質のノックダウンを維持する。RNAi の効果による mRNA レベルの減少は、標的 mRNA の RT-PCR 増幅によって確認する。

30

【0277】

3. 方法、材料、溶液

a. 方法

i. 製造業者のプロトコルにしたがった、処置に記載どおりのトランスフェクション

40

ii. Bradford アッセイによる蛋白質の測定

iii. Hoeffler miniVE 電気泳動システムにおける SDS-PAGE。Bio-Rad mini-protean II ウェットトランスファースystem における転写。Typhoon システム及び ImageQuant software (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて視覚化したプロット。

【0278】

b. 材料

【表 7】

b. 材料

材料	製造業者	カタログ#	バッチ #
リポフェクタミン 2000 (LF2000)	Life Technologies	11668-019	1112496
OptiMEM	Life Technologies	31985-047	3063119
RNAi ラミン A/C	自社	13	
RNAi TSG101 688	自社	65	
RNAi Posh 524	自社	81	
plenvll PTAP	自社	148	
plenvll ATAP	自社	149	
抗 p24 ポリクロー ナル抗体	Seramun		A-0236/5-10-01
抗-ウサギ Cy5 接合 抗体	Jackson	115-175- 144	48715
10% アクリルアミ ドトリスグリシン SDS-PAGE ゲル	Life Technologies	NP0321	1081371
ニトロセルロース 膜	Schleicher & Schuell	401353	BA-83
NuPAGE 20X トラ ンスファー緩衝液	Life Technologies	NP0006-1	224365
0.45 μ m フィルタ ー	Schleicher & Schuell	10462100	CS1018-1

10

20

30

【 0 2 7 9 】

c . 溶液

【表 8】

c. 溶液

リシス緩衝液	化合物	濃度	
	Tris-HCl pH 7.6	50mM	
	MgCl ₂	15mM	
	NaCl	150mM	10
	グリセロール	10%	
	EDTA	1mM	
	EGTA	1mM	
	ASB-14 (使用直前に添加)	1%	
6X サンプル 緩衝液	Tris-HCl, pH=6.8	1M	
	グリセロール	30%	20
	SDS	10%	
	DTT	9.3%	
	ブロモフェノールブルー	0.012%	
TBS-T	Tris pH=7.6	20mM	
	NaCl	137mM	
	Tween-20	0.1%	30

【 0 2 8 0 】

4. 処置

a. スケジュール

【表 9】

a. スケジュール

日				
1	2	3	4	5
平板 培養 細胞	トランスフ ェクション I (RNAi のみ)	通過細 胞(1:3)	トランスフェクシ ョン II (RNAi 及び pNlenv) (12:00, PM)	RT-PCR (トラ ンスフェクシ ョン後)の抽 出物 RNA
			RT-PCR (トランスフェク ション前) 抽出物 RNA	VLPs 及び細 胞を回収

10

【0281】

b. 1日目

HeLa SS-6細胞を、6-ウェルプレート(35mmウェル)中で、濃度 5×10^5 細胞/ウェルで平板培養する。

20

【0282】

c. 2日目

トランスフェクションの2時間前に、成長培地を、抗生物質を含まない2mlの成長培地で置換する。

【0283】

トランスフェクション I

【表 10】

トランスフェクション I:

30

反応	RNAi 名	TAGDA#	反応	RNAi	A	B	
				RNAi [nM]	[20µM]	OptiMEM	LF2000 mix
				µl	(µl)	(µl)	
1	ラミン A/C	13	2	50	12.5	500	500
2	ラミン A/C	13	1	50	6.25	250	250
3	TSG101 688	65	2	20	5	500	500
5	Posh 524	81	2	50	12.5	500	500

40

【0284】

トランスフェクション

反応ごとに、LF2000混合物: 250 µl の OptiMEM + 5 µl の LF2000 を調製する。反転で5回混合する。室温で5分間インキュベートする。

OptiMEM (表1、A欄)中RNA希釈液を調整する。LF2000混合物を、希釈されたRNA (表1、B欄)中に滴下する。ポルテックスで穏やかに混合する。室温で25分間インキュベートし、アルミニウム箔で覆う。

500 µl のトランスフェクション混合物を細胞に滴下し、左右に揺り動かして混合する。

一晩インキュベートする。

50

【0285】

d. 3日目

24時間後、1:3に分割する(3つのウェル中に平板培養する反応2を除き、各反応につき、4ウェルを平板培養する)。

【0286】

e. 4日目

トランスフェクションの2時間前に、培地を、抗生物質を含まないDMEM成長培地で置換する。

【0287】

トランスフェクションII

10

【表11】

トランスフェクションII

反応	RNAi名	TAGDA#	プラスミド		RNAi		OPTiMEM (μ l)	LF2000 mix (μ l)
			ド	反応	2.4 μ g (μ l)	10nM (μ l)		
1	ラミンA/C	13	PTAP	3	3.4	3.75	750	750
2	ラミンA/C	13	ATAP	3	2.5	3.75	750	750
3	TSG101 688	65	PTAP	3	3.4	3.75	750	750
5	Posh 524	81	PTAP	3	3.4	3.75	750	750

20

【0288】

反応ごとに、LF2000混合物: 250 μ lのOptiMEM+ 5 μ lのLF2000を調製する。反転で5回混合する。室温で5分間インキュベートする。

OptiMEM(トランスフェクションII、A+B+C)中に希釈させたRNA+DNAを調製する。

LF2000混合物(トランスフェクションII、D)を希釈RNA+DNAに滴下し、ボルテックスで穏やかに混合し、アルミニウム箔を用いて遮光しながら1時間インキュベートする。

30

LF2000とDNA+RNAを細胞に500 μ l/ウェルで添加し、穏やかに揺らしながら混合し、一晚インキュベートする。

【0289】

f. 5日目

下記の処置(各サンプルの1つのウェルからの細胞を取り出し、RT-PCRによってRNAアッセイを行う)によって、VLPアッセイ(トランスフェクションの約24時間後)のためにサンプルを回収する。

【0290】

g. 細胞抽出物

i. 浮遊細胞を遠心分離(5分間、3000rpm、4)によってペレット化し、上清を保存し(ステップhに続いてすぐの上清)、ウェルに残っている培地中の残りの細胞を掻き取り、対応する浮遊細胞ペレットに添加し、5分間、1800rpm、4 で遠心分離を行う。

40

ii. 細胞ペレットを氷冷PBSで2回洗浄する。

iii. 細胞ペレットを100 μ lの溶解緩衝液中に再懸濁し、20分間氷上でインキュベートする。

iv. 14000rpmで15分間遠心分離する。上清を清潔な管に移す。これが細胞抽出物である。

v. SDS-PAGE サンプル緩衝液を1Xに添加し、10分間沸騰させることによって、SDS-PAGEのための10 μ lの細胞抽出物のサンプルを調製する。蛋白質の測定をするための

50

、残りのサンプルのアリコートを除去し、開始物質の合計を確認する。残りの細胞抽出物を - 80 で保存する。

【0291】

h . 細胞培地からの V L P の精製

i . ステップ g からの上清を、0 . 4 5 m フィルターに通して濾過する。

i i . 1 4 0 0 0 r p m、4 で少なくとも2時間、上清を遠心分離する。

i i i . 上清を注意深く吸引する。

i v . V L P ペレットを熱い (少なくとも 1 0 分間 1 0 0 で温めた) 1 X サンプル緩衝液に際懸濁させる。

v . サンプルを 1 0 分間 1 0 0 に沸騰させる。

10

【0292】

i . ウエスタブロット解析

i . ステージ A 及び B の全てのサンプルをトリス-グリシン SDS-PAGE 1 0 % (1 2 0 V、1 . 5 時間) に流す。

i i . サンプルをニトロセルロース膜に移す (6 5 V、1 . 5 時間)

i i i . 膜を赤橙色の S 溶液で着色する。

i v . TBS-T 中 1 0 % 低脂肪乳で 1 時間ブロックする。

v . 抗 p 2 4 ウサギ 1 : 5 0 0 TBS-T o/n でインキュベートする。

v i . TBS-T で 3 回、それぞれ 7 分ずつ洗浄する。

v i i . 二次抗体抗ウサギ c y 5 1 : 5 0 0 を用いて 3 0 分間インキュベートする

20

v i i i . TBS-T 中で 1 0 分間 5 回洗浄する。

i x . Typhoon ゲルイメージングシステム (Molecular Dynamics/APBiotech) 中で蛍光シグナルを観察する。

結果を図 1 1 ~ 1 3 に示す。

【0293】

2 . P O S H R T - P C R プライマー及び s i R N A 二本鎖の例
R T - P C R プライマー

【表 1 2】

2 . P O S H R T - P C R プライマー及び s i R N A 二本鎖の例
R T - P C R プライマー

30

	名称	位置	配列
センスプライマー	POSH=271	271	5' CTTGCCTTGCCAGCATAC 3' (配列番号 12)
アンチセンスプライマー	POSH=926c	926C	5' CTGCCAGCATTCCTTCAG 3' (配列番号:13)

【0294】

40

siRNA 二本鎖 :

siRNA No: 153

siRNA 名: POSH-230

mRNA 中の位置 426-446

標的配列: 5' AACAGAGGCCTTGAAACCTG 3' 配列番号: 14

siRNA のセンス鎖: 5' dTdTcagaggccuuggaaaccug 3' 配列番号: 15

siRNA のアンチセンス鎖: 5' dTdTcagguuuccaaggccucug 3' 配列番号: 16

siRNA 番号: 155

siRNA 名: POSH-442

mRNA 中の位置 638-658

50

標的配列：5' AAAGAGCCTGGAGACCTTAAA 3' 配列番号：17
 siRNAのセンス鎖：5' ddTdTAGAGCCUGGAGACCUUAAA 3' 配列番号：18
 siRNAのアンチセンス鎖：5' ddTdTUUUAAGGUCUCCAGGCUCU 3' 配列番号：19
 siRNA番号：157
 siRNA名：POSH-U111
 mRNA中の位置 2973-2993
 標的配列：5' AAGGATTGGTATGTGACTCTG 3' 配列番号：20
 siRNAのセンス鎖：5' dTdTGGAUUGGUAUGUGACUCUG 3' 配列番号：21
 siRNAのアンチセンス鎖：5' dTdTCAAGAGUCACAUACCAUCC 3' 配列番号：22
 siRNA番号：159
 siRNA名：POSH-U410
 mRNA中の位置 3272-3292
 標的配列：5' AAGCTGGATTATCTCCTGTTG 3' 配列番号：23
 siRNAセンス鎖：5' ddTdTGCUGGAUUAUCUCCUGUUG 3' 配列番号：24
 siRNAアンチセンス鎖：5' ddTdTCAACAGGAGAUAAUCCAGC 3' 配列番号：25

10

【0295】

3. POSH RNAiのHIV放出に及ぼす影響：カイネティクス

A1. トランスフェクション

1. トランスフェクションの1日前、細胞を 5×10^6 細胞/ウェルの濃度で15cmプレート中で平板培養を行った。

20

2. トランスフェクションの2時間前、細胞培地を抗生物質を含まない20mlのDMEMと置き換えた。

3. DNA希釈：トランスフェクションごとに、下記の表にしたがって、2.5mlのOptiMEM中62.5 μ lのRNAiで希釈する。RNAi保存液は20 μ M（推奨される濃度：50nM培地全体量中の希釈液1：400）

4. LF2000希釈：トランスフェクションごとに、2.5ml OptiMEM中50 μ lのリポフェクタミン2000試薬で希釈する。

5. 希釈されたRNAi及びLF2000を室温で5分間インキュベートする。

6. 希釈されたRNAi及びLF2000を混合し、室温で20～25分間インキュベートする。

30

7. 混合物を細胞に添加（滴下）し、CO₂インキュベータ中で、37℃で24時間インキュベートする。

8. RNAi トランスフェクションの1日後、細胞を分ける（完全MEM培地中から、2つの15cmプレート及び6ウェルプレート中1つのウェルへ）。

9. 細胞を分けた1日後、SP30-012-01にしたがってHIVトランスフェクションを行う。

10. HIVトランスフェクションの6時間後、培地を完全MEM培地と置き換える。

* POSHに対してRT-PCRを行って、確実にノックダウンすることが重要である。

【0296】

A2. 総RNA精製

40

1. トランスフェクションの1日後、細胞を無菌PBSで2回洗浄する。

2. 2.3ml/200 μ l（15cmプレート/6ウェルプレート中1つのウェル）中Tri試薬（スクレーパーを用いる）の細胞を掻き落とし、-70℃で凍結する（RNA精製及びRT-PCRは、分子生物学単位で行う）、ラックNo. A16-RT用サンプル。

【0297】

【表 1 3】

処理	チェイス時間 (時間)	断片	標識
Control=WT	1	細胞	A1
		VLP	A1 V
	2	細胞	A2
		VLP	A2 V
	3	細胞	A3
		VLP	A3 V
	4	細胞	A4
		VLP	A4 V
	5	細胞	A5
		VLP	A5 V
Posh+WT	1	細胞	B1
		VLP	B1 V
	2	細胞	B2
		VLP	B2 V
	3	細胞	B3
		VLP	B3 V
	4	細胞	B4
		VLP	B4 V
	5	細胞	B5
		VLP	B5 V

10

20

30

40

【 0 2 9 8 】

B . 標識化

- 1 . 飢餓培地を取り出し、解凍し、37 の場所に置く。
- 2 . 成長培地中の細胞を掻き落とし、穏やかに15 mlの円錐形チューブに移す。
- 3 . 1800 rpm、5分間、室温で遠心分離し、細胞をペレット化する。
- 4 . 上清を吸引し、チューブを10秒間放置する。残りの上清を200 µlのピペット

50

マンを用いて除去する。

5. 10 ml の温めた飢餓培地を穏やかに添加し、10 ml ピペットを用いて注意深く再懸濁させる。上下に正確に回転させ、細胞ペレットを溶解させない。

6. 細胞を10 ml のチューブに移し、60分間インキュベータ中に置く。エッペンドルフサーモミキサーを37 に設定する。

7. 1800 rpm、5分間、室温で遠心分離し、細胞をペレット化する。

8. 上清を吸引し、チューブを10秒間放置する。残りの上清を200 µl のピペットマンを用いて除去する。

9. 200 µl のチップを末端から切断し、細胞を穏やかに150 µl の飢餓培地中に再懸濁させる(150 µl Metを含まないRPMI中、 $\sim 1.5 \times 10^7$ 細胞、但し、細胞が多いとき、250 µlを超えないようにする)。細胞をエッペンドルフチューブに移し、サーモミキサー中に置く。10秒間待って、必要であれば、残りの細胞を10 ml チューブからエッペンドルフチューブに移し、さらに50 µlを追加し、残りの細胞を流し出す(全ての検体は、同量の標識反応物を有していなければならない)。

10. パルス: 50 µl の³⁵S-メチオニン(特異的活性14.2 µCi/µl)、チューブをきつく絞り、サーモミキサー中に置く。混合スピードを可能な限り一番低く設定し(700 rpm)、25分間インキュベートする。

11. 1 ml の氷冷チェース/ストップ培地を添加することによってパルスをとめる。チューブを非常に穏やかに2回振とうし、細胞を6000 rpmで6秒間ペレット化する。

12. 1 ml のチップを用いて上清を除去する。1 ml の氷冷チェース/ストップ培地をペレット化した細胞に穏やかに添加して、穏やかにインバートして、再懸濁させる。

13. チェース: 全てのチューブをサーモミキサーに移し、必要なチェース時間インキュベートする(830: 1、2、3、4及び5時間; 828: 3時間のみ)。全チェース時間後、チューブを氷上に置き、1 ml の氷冷チェース/ストップ培地を添加し、細胞を14000 rpmで1分間ペレット化する。上清を除去し、上清を第2のエッペンドルフチューブに移す。全てのチューブが準備できるまで、細胞ペレットを-80 で凍結する。

14. 上清を2時間、14000 rpm、4 で遠心分離する。上清を非常に穏やかに除去し、チューブ中に20 mlを放置し(Vと標識付けする)、コースが終了するまで-80 で凍結しておく。

***全てのステップは、氷冷緩衝液上で行う。

15. コースが終了したとき、-80 で全てのチューブを除去する。500 µl の溶解緩衝液(溶液を参照されたい)を添加することによって、Lyse VLPペレット(ステップ14)及び細胞ペレット(ステップ13)を溶解させ、上下3回、ピペットで採取することによって、よく再懸濁させる。氷上で15分間インキュベートし、エッペンドルフ遠心分離中で15分間、4、14000 rpmで回転させる。上清を新鮮なチューブに取り出し、ペレットを捨てる。

16. 全てのサンプルについて、抗p24ヒツジを用いてIPを行う。

【0299】

C. 免疫沈降

1. プレクリーニング: 全てのサンプルに15 µl のImmunoPure PlusG (Pierce)を添加する。サイクラー中で、4 で1時間回転させ、4 で5分間スピンさせ、IPのための新たなチューブに移す。

2. 全てのサンプルに20 µl のp24-蛋白質G接合ビーズを添加し、サイクラー中で、4 で1時間インキュベートする。

3. 免疫沈降後、全ての免疫沈降物を新鮮なチューブに移す。

4. ビーズを、高塩緩衝液で1回、培地塩緩衝液で1回、そして低塩緩衝液で1回洗浄する。各スピニングがすべての溶液を除去しないうちに、50 ml の溶液をビーズ上に放置する。最後のスピニング後、ローディングチップを用いて、上清を注意深く除去し、 $\sim 10 \mu\text{l}$ 溶液を放置する。

10

20

30

40

50

- 5. 20 μl の2x SDSサンプル緩衝液をそれぞれのチューブに添加する。70 に10分間加熱する。
- 6. サンプルを10% SDS-PAGE上で分離した。
- 7. 25%エタノール及び10%酢酸中でゲルを15分間固定する。
- 8. 固定化液を流し出し、ゲルをAmplify solution (NAMP 100 Amersham) に15分間浸漬する。
- 9. ゲルを、温めた(60~80)プレート上で真空乾燥させる。
- 10. ゲルを2時間スクリーンに露出し、スキャンする。

【0300】

4. ヒトPOSHに対するsiRNAの、HeLa細胞感染ウイルスの産生に及ぼす影響 10
 下記の計画は、標準的なsiRNAトランスフェクションプロトコルにしたがうものである。

【0301】

計画

【表14】

計画

日				
1	2	3	4	5.5
				ウイルス回収
平板培養	トランスフェクト RNAi	トランスフェクト	トランスフェクト	感染アッセイの開始
HeLa細胞		分割 (1:3)	siRNA + HIV-1 _{NL4-3}	エスタンブロットのためのサンプルを回収

20

【0302】

siRNAとして下記を用いた。

13 (= Lamin 対照)

153 (= ヒトPOSH Ubリガーゼ)

30

【0303】

3日目(1回目のsiRNAトランスフェクション後の日)

HeLa細胞を回収し、新鮮なDMEM中、再び1:3に分割し、T75 フラスコ中に播いた。

【0304】

4日目

・培地を除去し、新鮮なDMEMを添加し、下記のHIV1型発現プラスミドのうちの1つと組み合わせて、細胞をsiRNAで再びトランスフェクトした。

-env 遺伝子に欠失を伴うEnv- (HIV-1_{NL4-3} (Adachiら、1986) は、他のHIV-1プラスミドと違い、Envを発現することができない)、及びVSV-G (小胞の口内炎ウイルスG蛋白質の発現ベクター由来のCMV)。この組み合わせによって、VSV-Gで感染後、子孫ウイルスとして1回感染が可能である。偽型ウイルスは、Env糖蛋白質を含まない。

40

-多回感染のためのEnv+ (HIV-1_{NL4-3} 野生型)。

注: コンストラクトEnv-及びEnv+含有EGFPを、HIV-1_{NL4-3}のnef読み取り枠中にクローニングした。この方法で、全ての細胞をトランスフェクトし、感染させた。活性遺伝子発現を伴う細胞を、自己蛍光(T. Fukunoriら2000、Lenardoら2002に基づく)によって検出することができる。

対照として、1つのT25フラスコをGFP-N1(単純なGFPのためのCMV発現ベクター)でトランスフェクトした。

【0305】

50

5 日目

GFP-N1トランスフェクト培養中の蛍光細胞を計数し、FACS解析によってトランスフェクション効率を推定した。

【0306】

5.5 日目

・2回目のトランスフェクションの36時間後、ウイルスを回収した。下記のように保存ウイルスを作製した。HeLa細胞を掻き落とし、ウイルス含有上清を遠心分離(1000xg、5分間)によって浄化し、0.45µm孔径のフィルターに通して濾過し、細胞残滓と細胞片を除去した。保存細胞をアリコートし、-80℃で凍結した。生化学的分析のために、上清のアリコートからのビリオンをペレット化し(99分間、14000rpm、4℃)、溶解した(Ottら、2002に従った)。細胞及びウイルス断片のサンプルを抗-CA抗体を用いてウエスタンブロットによって解析した。

・感染性のアッセイのために、保存ウイルスの連続希釈をRPMI培地中で調製し、ジャーカット細胞を感染させるために使用した。

・感染の3日後、パラレル培地中の感染細胞のパーセンテージをFACS解析によって推定した。各感染実験は、96ウェルプレート中の3つのパラレル培地中に設定した(Boltonら、2002に基づく)。

・対照として、1つの培養液を細胞培養上清を用いてインキュベートし、細胞をGFP-N1でトランスフェクトした。蛍光細胞は検出されず、ウイルス産生細胞からのGFPを持つ細胞の非特異的な染色が存在しないことが証明された。

【0307】

注：ラミントランスフェクト培養と比較したとき、ヒトPOSHトランスフェクト培養において、ウイルス産生中、(いくつかのHIV関連細胞変性効果以外の他)毒性効果は観察されなかった。

【0308】

図19に示された結果は、ノックダウンPOSHが、HIV1感染性を4ログ減少させることを示している。

【0309】

5. ノックダウンヒトPOSHのPTAP-及びPPEY-媒介性ウイルス放出への影響

実験1日目、HeLa SS6細胞を6-ウェルプレートに 5×10^5 細胞/ウェルの密度で置いた。その細胞を、2日目、LF2000試薬及びRNAiのラミン、TSG101及びhPOSH(50nM/ウェル)を用いてトランスフェクトした。

3日目、細胞を1:2に分け、4日目、支持用量(10nM/ウェル)の同じRNAi及びDNA(1µg/ウェル): PTAPを含むラミン、ATAPを含むラミン、PPEYを含むラミン、PRAPを含むTSG101、PPEYを含むTSG101、ATAPを含むTSG101、PTAPを含むhPOSH、PPEYを含むhPOSH、及びATAPを含むhPOSH用いて、細胞を再びトランスフェクトした(LF2000試薬を用いた)。24時間後、VLPの上清を遠心分離し、細胞から蛋白質を抽出した。全てのサンプルを12%トリスグリニゲルに置き、ニトロセルロース膜上に写し、p24を用いてインキュベートする。

【0310】

図20に示された結果は、ノックダウンPOSHのウイルス放出の阻害効果は、非特異的HIV Lドメインモチーフとは無関係であることを示している。換言すれば、ヒトPOSHは、PTAP-及びPPEY-媒介性ウイルス放出の双方にとって重要であるようである。このことは、ヒトPOSHレベル/活性を阻害することは、PTAP-及びPPEY-モチーフを含有するあらゆるウイルスの感染性を阻害することに対して潜在的に有効であり得る。HIV(PTAPを含有)及びエボラウイルス(PPEYを含有)はそのようなウイルスの例である。

【0311】

6. RING及びSH3の欠失の、HIV-1放出への影響

次に、HeLa細胞をヒトPOSH及びpLenv-1の欠失コンストラクト用いてトランスフェ

10

20

30

40

50

クトした(48時間以内)。この実験に用いられる欠失コンストラクトは、dRING (RINGドメイン欠失)、dSH₃ 4 (4番目のSH₃ドメイン欠失)、dSH₃ 1 (1番目のSH₃ドメイン欠失) 及びdSH₃ 3 (3番目のドメイン欠失)であった。対照として、次にHeLa細胞を偽型及びpNLenv-1で、ならびに偽型及びpNLenv-1ATAPでそれぞれトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞のプルダウン実験を行った。ウイルス蛋白質を細胞ライセートから免疫沈降させ、ペレット化したビリオンをSDS-PAGEによって分離し、フルオログラフィーによって分析した。2つの主なCA産物の位置p24及びp25を、二重の矢印で示す。細胞内で異なる時点で検出された、CA対Pr55のPr55の比率を計算することによって、Pr55のプロセシングの比率を推定した。図21に示された結果は、hPOSHのRING欠失によって、ATAP突然変異対照と比較して、完全な出芽の阻害が導かれることを示している。SH₃4ドメイン欠失の効果もRING欠失と同様である。

【0312】

7. ヒトPOSH自己ユビキチン化のインビトロアッセイ

組換えhPOSHを、各レーンに示したようにE1、E2及びユビキチンの存在下でATPを用いてインキュベートした。37℃で30分間のインキュベート後、SDS-PAGEサンプル緩衝液を添加することによって反応を停止した。続いてサンプルを10%ポリアクリルアミドゲル上で分解した。次に分離したサンプルをニトロセルロースに移し、抗ユビキチンポリクローナル抗体を用いて免疫ブロット解析を行った。分子量マーカーの移動の位置を右上に示す。

ポリ-Ub: Ub-hPOSH接合体は、E1、E2及びユビキチンを含有する反応のみにおける高い分子量アダクトとして検出された。hPOSH-176及びhPOSH-178は、(それぞれ)細菌により発現されたhPOSHの短い及び長い誘導体である。C、対象E3ハイスループットスクリーン中の予備的ステップ。

【0313】

目的

1. E3の機能としてのUb鎖におけるUb検出(HRD1)及びPOSH自己ユビキチン化を試験する。
2. Boston Biochem 試薬を試験する。

【0314】

材料

1. バキュロウイルスからのE1組換え
2. 細菌からのE2 Ubch5c
3. ユビキチン
4. POSH #178 (1-361) gst融合体、精製されているが劣化している。
5. POSH #176 (1-269) gst融合体、精製されているが劣化している。
6. hsHRD1 可溶環含有領域
5. 緩衝液2 (Tris 7.6、40 mM、DTT 1 mM、MgCl₂ 5 mM、ATP 2 uM)
6. 希釈緩衝液 (Tris 7.6、40 mM、DTT 1 mM、オボアルブミン 1 ug/ul)

【0315】

プロトコル

【表 1 5】
プロトコル

	0.1ug/ul	0.5ug/ul	5ug/ul	0.4ug/ul	2.5ug/u/	0.8ug/ul	
	E1	E2	Ub	176	178	Hrd1	Bx12
-E1 (E2+176)	-----	0.5	0.5	1	-----	-----	10
-E2 (E1+176)	1	-----	0.5	1	-----	-----	9.5
-ub (E1+E2+176)	1	0.5	-----	1	-----	-----	9.5
E1+E2+176+Ub	1	0.5	0.5	1		-----	9
-E1 (E2+178)	-----	0.5	0.5	-----	1	-----	10
-E2 (E1+178)	1	-----	0.5	-----	1	-----	9.5
-ub (E1+E2+178)	1	0.5	-----	-----	1	-----	9.5
E1+E2+178+Ub	1	0.5	0.5	-----	1	-----1	9
Hrd1, E1+E2+Ub	1	0.5	0.5	-----	-----	1	8.5

10

【 0 3 1 6 】

- 1 . 3 7 で 3 0 分 インキュベートする。
- 2 . 1 2 % SDS PAGEゲルをニトロセルロース膜に流して移す。
- 3 . 抗ユビキチン抗体を用いてインキュベートする。

20

図 2 2 に示された結果は、ヒト P O S H がユビキチンリガーゼ活性を有することを示す。

【 0 3 1 7 】

8 . myc-タグを付けられた、活性化された h P O S H (V 1 2) とドミナントネガティブ (N 1 7) Rac1 の共免疫沈降

HeLa細胞を、myc-Rac1、myc-Rac1、V12又はN17と、hPOSHdeIRING-V5との組み合わせを用いて、トランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後（GFPによる測定による効率は80%）、細胞を回収し、PBSで洗浄し、低張溶解緩衝液中（10mM HEPES pH=7.9、15mM KCl、0.1mM EDTA、2mM MgCl₂、1mM DTT及びプロテアーゼ阻害剤）で膨張させた。細胞は、dounce ホモジナイザーを用いて、10回の動作で溶解させ、3000xgで10分間遠心分離し、上清（断片1）及び核を得た。核を、断片2緩衝液（0.2% NP-40、10mM HEPES pH=7.9、40mM KCl、5% グリセロール）で洗浄し、周辺蛋白質を除去した。核を遠心沈澱し、上清を回収した（断片2）。核蛋白質は、寒冷中で30分回転させることによって、断片3緩衝液（20mM HEPES pH=7.9、0.42M KCl、25% グリセロール、0.1mM EDTA、2mM MgCl₂、1mM DTT）中に溶離した。不溶性蛋白質は、14000xgで遠心沈澱し、断片4緩衝液中（1% Fos-Choline 14、50mM HEPES pH=7.9、150mM NaCl、10% グリセロール、1mM EDTA、1.5mM MgCl₂、2mM DTT）で可溶化した。全抽出物の半分を、蛋白質Aセファロースに対して、1.5時間予め浄化し、1μgの抗myc（9E10、Roche 1-667-149）及び蛋白質Aセファロースを用いて2時間IPに使用した。免疫複合体を徹底的に洗浄し、SDS-PAGEサンプル緩衝液に溶離した。図23のように、免疫プロットのためにゲルを流し、蛋白質をニトロセロースに電子転移した。内因性POSH及びトランスフェクトされたhPOSHdeIRING-V5を、複合体として、Myc-Rac1 V12/N17とともに沈降させた。図23に示された結果は、POSHがRac1と共沈降することを示している。

30

40

【 0 3 1 8 】

9 . h P O S H エントラップ HIV ウイルス粒子の細胞間小胞体中でのノックダウン
siRNA及び全長HIVプラスミド（エンベロープコード領域をを欠く）トランスフェクションの後、HIVウイルス放出を電子顕微鏡で分析した。成熟ウイルスは、HIVプラスミド及び関連のないsiRNA（対照、下側のパネル）でトランスフェクトした細胞によって分泌させた。Tsg101蛋白質のノックダウンの結果、出芽の欠損が生じ、放出されたウイルスは、未成熟表現型を有していた（上側のパネル）。h P O S H レベルのノックダウ

50

ンの結果、細胞間小胞体において、細胞内にウイルスの蓄積が生じた（中間パネル）。図 24 に示された結果は、hPOSHを阻害することによって、HIVウイルス粒子が細胞内小胞体に封入されることを示している。HIVウイルス粒子が細胞内に蓄積することで、細胞死が加速され、したがってhPOSHの阻害は、HIVに感染した細胞を殺すことによってHIV貯蔵部位を破壊する。

【0319】

10. 1つは核及び他の1つはゴルジ体（C）の2つの部位にPOSHを局在化する。HIVトランスフェクション後、POSHのゴルジ体への補充が上昇する（D）

HeLa 及び293T細胞を、pNenv-1を用いてトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞を、POSHに対する一次抗体と、抗-p24 Gag（B）又は下記のオルガネラマーカー、すなわち、BiP- エンドプラスマティック細網（データは示していない）、GM130-ゴルジ体（C、D）ヌクレオポリン-核マトリクス（E、F）及びヒストンH1核（データは示していない）のいずれかとを一緒に用いてインキュベートした。2つの異なる蛍光標識2次抗体を用いた。レーザー走査共焦顕微鏡を用いて特異的なシグナルを得、それぞれのシグナル部分を重ね、それらの相対的な位置を評価した。図7に示すように、POSH（A）は核に局在し、また部分的に、トランスフェクション後の核マトリクス（B）と思われる核外部においてHIV-1 Gagと共局在した。

10

【0320】

引用による援用

本明細書において引用した全ての特許及び出版物を引用によって援用する。

20

【0321】

等価物： 当業者であれば、ルーチンの実験法を用いるのみで、本明細書に記載された特定の態様及び方法の数多くの等価物を認識し、又は確かめることができるであろう。このような等価物は、添付の特許請求の範囲の包含するところである。

【図面の簡単な説明】

【0322】

【図1】図1は、ヒトPOSHコーディング配列（配列番号1）を示す。

【図2】図2は、ヒトPOSHアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図3】図3は、ヒトPOSH cDNA配列（配列番号3）を示す。

【図4】図4は、ヒトPOSHの5' cDNAフラグメント（公開gi: 10432611、配列番号4）を示す。

30

【図5】図5は、hPOSHのN末端蛋白質フラグメント（公開gi:10432612；配列番号:5）を示す。

【図6】図6は、hPOSHの3' mRNAフラグメント（公開gi: 7959248、配列番号6）を示す。

【図7】図5は、hPOSHのC末端蛋白質フラグメント（public gi: 7959249、配列番号7）を示す。

【図8】図8は、ヒトPOSH全長mRNAの注釈付きの配列を示す。

【図9】ヒトPOSHのドメイン分析を示す。

【図10】ヒトPOSH核酸の略図を示す。該略図は、全長POSH遺伝子及びRT-PCRによって増幅された、又は、図11で用いられるsiRNAによって標的化された領域の位置を示す。

40

【図11】図11は、siRNA二本鎖によるPOSH mRNAのノックダウンを示す。HeLa SS-6細胞は、ラミンA/C（レーン1、2）又はPOSH（レーン3～10）に対するsiRNAによってトランスフェクトされた。POSH siRNAは、コーディング領域（153 - レーン3、4；155 - レーン5、6）又は3'UTR（157 - レーン7、8；159 - レーン9、10）に誘導された。トランスフェクトの24時間後、細胞を集め、RNAを抽出し、POSH mRNAレベルを、POSH遺伝子（図10参照）のコーディング領域中の別の配列のRT-PCRで比較した。各反応において、GAPDH10がRT-PCR対照として用いられた。

50

【図12】図12は、POSHが細胞からのVLP放出に影響を及ぼすことを示す。A) 35Sパルス-チェイス標識Gag蛋白質の、免疫沈降のSDS-PAGEゲルのPhosphoimagesが細胞ごとに示されている。Gag蛋白質が、細胞ならびに未処理又はPOSH RNAi (50 nM、48時間)で処理されている、トランスフェクトされたHeLaからのウイルス溶菌液について提示されている。チェイス期間(パルス後、1、2、3、4及び5時間)の間の時間が、左から右にイメージごとに提示されている。

【図13】図13は、安定した状態での細胞からのVLPの放出を示す。HIVコードプラスミド及びsiRNAでトランスフェクトした。レーン1、3及び4は、野生型HIVコードプラスミドでトランスフェクトされたものを示す。レーン2は、p6 (PTAP~ATAP)中の点突然変異を含むHIVコードプラスミドでトランスフェクトされたものを示す。対照siRNA (ラミンA/C)は、レーン1及び2の細胞にトランスフェクトされた。レーン4では、siRNAからTsg101にトランスフェクトされており、レーン3では、siRNAからPOSHにトランスフェクトされている。

10

【図14】図14は、マウスPOSH mRNA配列(公開gi:10946921、配列番号8)を示す。

【図15】図15は、マウスPOSH蛋白質配列(公開gi:10946922、配列番号9)を示す。

【図16】図16は、ショウジョウバエPOSH mRNA配列(公開gi:17737480; 配列番号:10)を示す。

【図17】図17は、ショウジョウバエPOSH蛋白質配列(公開gi:17737481; 配列番号:11)を示す。

20

【図18】図18は、POSHドメイン分析を示す。

【図19】図19は、ヒトPOSHの部分的ノックダウンによって、HIV1感染力が4ログ減少することを示す。感染力アッセイの結果を略図に示す。縦軸は、感染した標的細胞のパーセンテージを示し、横軸は、用いられるウイルス保存液の希釈倍率を示す(実験の詳細は、実施例4を参照されたい)。白抜きの四角(上の線)は、対照からの結果を示し、黒塗りの四角(下の線)は、RNAiをもつ細胞をPOSHへトランスフェクトした結果を示す。

【図20】図20は、HIVとの関連における、PTAP-及びPPEY-媒介ウイルス様粒子の放出を媒介するヒトのPOSH蛋白質を示す。35Sパルス-チェイス標識Gag蛋白質の免疫沈降の、SDS-PAGEゲルのPhosphoimagesが、細胞ならびにトランスフェクトされたHeLa細胞からのウイルス溶菌液について示されている。HeLa細胞を、HIVコードプラスミド及びsiRNAでトランスフェクトした。左から右へ:左のパネルは、野生型HIVコードプラスミドでトランスフェクトされたものを示す。中央のパネルは、点突然変異(PPEE~PPEY)を含有するHIVコードプラスミドでトランスフェクトされたものを示す。右のパネルは、p6 (PTAP~ATAP)中の点突然変異HIVコードプラスミドでトランスフェクトされたものを示す。上から下へ:対照siRNA (ラミンA/C)は、一番上のパネルにおいてトランスフェクトされたものを示す。中央のパネルは、siRNAからTsg101にトランスフェクトされたものを示し、一番下のパネルには、siRNAからPOSHにトランスフェクトされたものを示している。チェイス時間(パルス後、1、2、3、4及び5時間)が、パネルごとに左から右へ提示されている。

30

40

【図21】図21は、ヒトPOSH蛋白質におけるRINGドメイン及び第4のSH3ドメインの欠失がHIV1ウイルス粒子の放出を阻害することを示している。

【図22】図22は、ヒトPOSHがユビキチンリガーゼ活性を持つことを示している。

【図23】図23は、RAC1を用いたヒトPOSH共免疫沈降を示す。

【図24】図24は、ヒトPOSHのノックダウンが細胞間小胞内の捕捉HIVウイルス粒子を封入することを示している。HIVウイルスの放出は、電子顕微鏡によって分析され、続いてsiRNA及び全長HIVプラスミドのトランスフェクションが行われる。成熟ウイルスがHIVプラスミド及び非関連のsiRNA(対照、下のパネル)を用いてトランスフェクトされた細胞によって分泌されたものを示している。Tsg101蛋白質のノックダウンの

50

【 図 15 】

Figure 15: マウス POSH 蛋白質配列 (公開 gi:10946922; 配列番号 9)

MDESALLDLLECFVCLERLDASAKVLPQHTFCRKLGLVGSNRELRCPECRLLVGSVDELEPSNILLV
RLLDGKQRPKPQGGGGTTCNTLRAQGSTVNCQSDLQSSCGQPRVQAMSPFVRGIPLQPCAK
ALYNYBGEKPGDLKFSKGDITILRRQVDENWTHGVEVGHGFPFNFVQIILKPLQPPQCKALYDFVK
DKEADKCLPFAKDDVLTIRRVDEINAEMLADKLGIFPISYVEFNAAKQLIENDKPFVGVDTAEP
SATASQVHSITSTGLIVTPPSSPVTTPGPAFTFSDVYVQALGSMNPLPPLPPLAATVLAATPSGATAA
VAAAAAAAAGMGPRFVMSSEQIAHLRPQTRPSVYVYIYFYTPRKBDELRLKGMFLVFERCQDGMV
KGTSMHTSKIGVFPNGYVAVPTRAIVNASQAKVSMSTAGQSRGVTMVSFSTAGGPTQKQVGGVATNGPS
VYPTAVVSAHIQTSPQAKLHMSQMTVGNARNAVSTVAHSQSRFTAATVPIQVQNAACLGSPASVGL
PHHSLASQPLPFWAGFAAHGAIVSISRTNAPWCAAGASLAPMHTSAMLTEPQGRVITLILGLPSPFB
SAASACGNSAKKPKDKSKKELKLLKLLGSAYSYKPKPRVSPASPTLDELVGAAGAPLQAGVPELPLG
GSHRIVGSCPTDGDGVAAGTALAQDAFIRKTSLSLDAVPIAPFPRGACSSLQPMNARVVCERRHV
VWSYPPQSEALELKEGDIVFVHKREDDGFKGLRNGKTLQPLFGSVEVNI

【 図 16 】

Figure 16: キイロショウジョウバエ POSH mRNA配列 (公開 gi:17737480; 配列番号 10)

CATTGTATCCGCTTGGCCACGAGCTTGGCTGCACCTGGCAAACTTAATAAATTAACATTGAATCCTG
CCTATTGCAACGATAATAAATCTGATTTAGTGCAATTAAGAACGACAGTAGCCGATTAATAAGTAGATT
TTAGCATTTAGCATAAATTTATTTCCCAACCGGCTCTGGGATGCGATGCGTAGGACGACACTGCAT
GTGTGTGTTTTTGAATGTGGCCCTGCAGAAATTCAAATAGTGACATCTGAGATTTGATGATCTG
GCAAGATGGACGAGCACGCTTAAACGACCTGTGGAGTCTCGTGTGCTTTGAGGACCTGGACACCCAC
ATCGAAGTGTCTCCATGCGACGACACCTTCTGCCGAAATGTTGCAGGACATTTGGCCAGTCAGCAC
AAGTTCGCAATCTTGAAGGCAATGAAACAAAATGACAGCAGCTGGCAAGGAGAGAAAGGAGAGAGC
TGAACACAGCCGAAAGGCGCAAACTCAGCCGCGCAGCGAAATGAGTGGCCCGGCTGCAACCACTA
CTCAGCTCAGTACATCAGCAATCTCAGCGCCCTGCTCAGACGCAAGCTGATTTCTACTCCCC
AGCCCTTCCCTCTTCTGACTCCCTCCGTTGAAGCAGCAGCTCAAGTTCAAGAAAGGGATCTGAT
ACTGATCAGCATCGCATCGACAACTGCTTGTGGTCAAGCAATGGTCAGGAGGGACACTTCCC
ATCAACTAGCTCAAGGATATCGTTCGCTGCCATGCGCAGTCATGCCATGATGACTTTAAGATGG
GGCCCAACGAGAGGAGGATGCTCGAATTAAGAAGAAGCAGTAAATACAGGATATGCGCCGAGTGA
TCATAATTGGGCAGAGGACAAATGGCCAGACCATCGAATCTTCCAATAGCATCGTGGAGCTGAAT
GGAGCGCCAAAAGCTGTGGACAGCGGCTACACCCATCATTGCCATCCCAAGAAAGCAACAGG
GGGACGGGCCCTTCTCCGGTTCAGATTGATGCCAGCTGTCAGGAAATCCAGTTCGGGATCCCTC
CAATTCAGCGGGGACGAGCAATCAAGCTCCACTCCAGCTCGAATACCTGACGTCGAAATCACCA
ATCTCACTGCCGAAATACCCCAACATGTAGTAGCTTCGGATCGCGCTGTGTTGTTTTCTGCAAGG
GAGCAAAAGGAGAAACGCCACTCACTAAATGCTTGTCTGGAGGAGGAGTCCATTAATCTCTGCAAGC
CAACCGCATTCGGCTGAATTTGAGCTGCCCTGATGACTGAACTTCCAGTCTGCAAGC
GCTTAAACACCCCTCAGCCCGCAGACACTGCGTGTACTAGACCACTGTTCAGCAGAGATGCAAC
AAGGCTTGTGTTTACATTTGACCGAAGCATGTGGAGCTTGGTCAAGGAAAGGATGAGTGAATAA
ATCCTGATGATGTTCCGCGCACTACTGACGCCCTCGCCCGCCGCGCAGCAGCAGTATGATGATC
AATGAAATATGTTCCCAAAATGACAGAGCCAGATGSCAAGTACAGCAGCTCCAGTTCAGTACAG
TGTGCACTCAACAACATGCTGCTCATGCAACCGCTGATTTGCCACTCGCAGCAGCAGGCTCACGCC
CGAATTTACCTCGGATGCAACCAAGTTCAGAGCGCTGTTACGCAAAAATCGGAGCCCAAGC
CTGAAATGCCACAGCTTCGACTCAGCAGCAGTCTCTTGGAGCAGTGGGACTATGAGGAGATTAC
TCACATGAAACACCGCTCCAAATTCGCGGAGCGTCTTGCAGCAAGTCCGAAAGGAGCTATTAGCACA
AATGGGAATTAACAACAAACCACTGACTAAATGCTTCCAGTACATGATAGATCCGGCTCGTGGCCCA
CTCACTCCAGCAGCTGCTTCCGCTCTACGAAACAGCGTTCGTACGATTCGCAACCGCTGAAAGAGC
AAGAAAGCTCTCTGATTTGCGCAGCAATCATTAGTAGCAGTACATTTCCAGTATGATGATGATG
ATGCGCGCTCCCGCCGCACTACTCTTCCGCGCAGCAGTACATTTCCAGTATGATGATGATGATG
CATCTGAGTGGAGTCCAGTTCGACTGCAAGGAGTCAATTCGCTGATTTCCGCGCAGCAGTATG
CAGCTGAGTGGAGTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CAGCTGAGTGGAGTCCAGTTCGACTGCAAGGAGTCAATTCGCTGATTTCCGCGCAGCAGTATG
CAGCTGAGTGGAGTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CGGCTGATTTGGGCTTCCAATACGCAATCTCATATTTCTCTTTCAAAAAGAAACCGTTTGTACT
CTCCCAATGAAATGGGACGCTCGCCGTGTACTTTTATACAAATGCTGATCAAAATAGCTAGCCATG
TAGACTTAGGAAACAGTACTTAGCCTTAGCGATTAGTAGTAGAGAAATAATTAACCGATCTGTTG
TGCCCTCACAAAGTATTGTAATATACGATACAGTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【 図 17 】

Figure 17: キイロショウジョウバエ POSH 蛋白質配列 (公開 gi:17737481; 配列番号 11)

MDSFTLIDLLLECFVCLERLDASAKVLPQHTFCRKLGLVGSNRELRCPECRLLVGSVDELEPSNILLV
RLLDGKQRPKPQGGGGTTCNTLRAQGSTVNCQSDLQSSCGQPRVQAMSPFVRGIPLQPCAK
ALYNYBGEKPGDLKFSKGDITILRRQVDENWTHGVEVGHGFPFNFVQIILKPLQPPQCKALYDFVK
DKEADKCLPFAKDDVLTIRRVDEINAEMLADKLGIFPISYVEFNAAKQLIENDKPFVGVDTAEP
SATASQVHSITSTGLIVTPPSSPVTTPGPAFTFSDVYVQALGSMNPLPPLPPLAATVLAATPSGATAA
VAAAAAAAAGMGPRFVMSSEQIAHLRPQTRPSVYVYIYFYTPRKBDELRLKGMFLVFERCQDGMV
KGTSMHTSKIGVFPNGYVAVPTRAIVNASQAKVSMSTAGQSRGVTMVSFSTAGGPTQKQVGGVATNGPS
VYPTAVVSAHIQTSPQAKLHMSQMTVGNARNAVSTVAHSQSRFTAATVPIQVQNAACLGSPASVGL
PHHSLASQPLPFWAGFAAHGAIVSISRTNAPWCAAGASLAPMHTSAMLTEPQGRVITLILGLPSPFB
SAASACGNSAKKPKDKSKKELKLLKLLGSAYSYKPKPRVSPASPTLDELVGAAGAPLQAGVPELPLG
GSHRIVGSCPTDGDGVAAGTALAQDAFIRKTSLSLDAVPIAPFPRGACSSLQPMNARVVCERRHV
VWSYPPQSEALELKEGDIVFVHKREDDGFKGLRNGKTLQPLFGSVEVNI

【 図 18 】

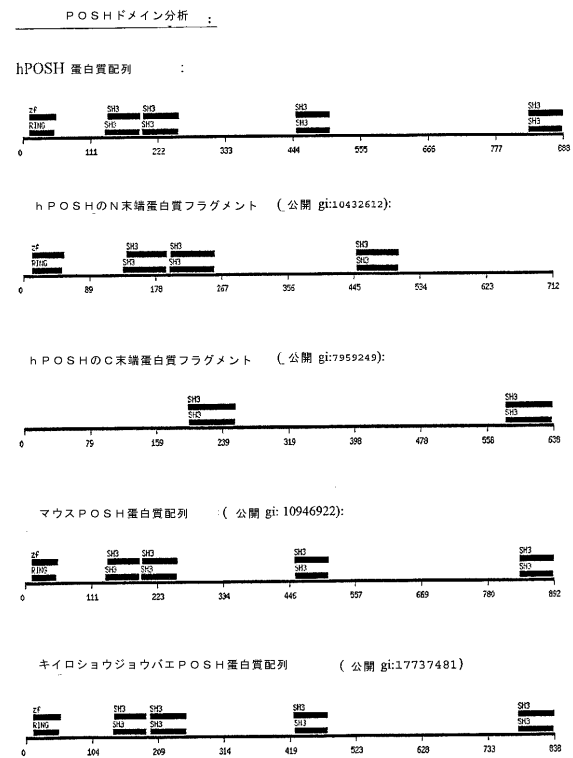
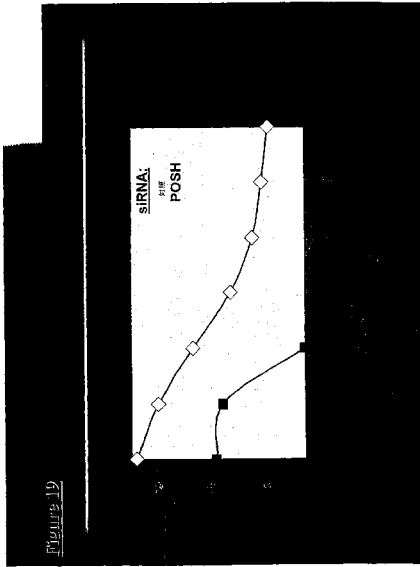


Figure 18

【 図 19 】



【 図 20 】

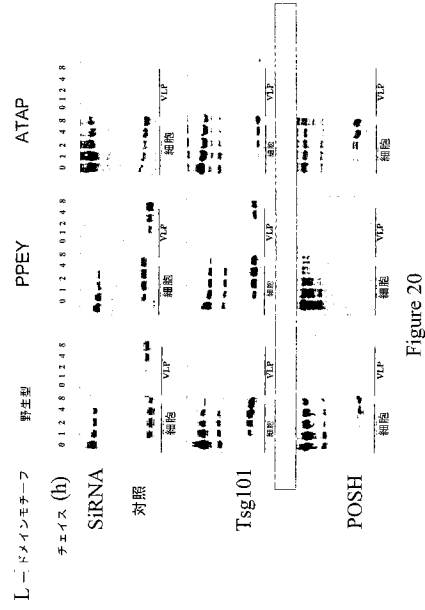


Figure 20

【 図 21 】

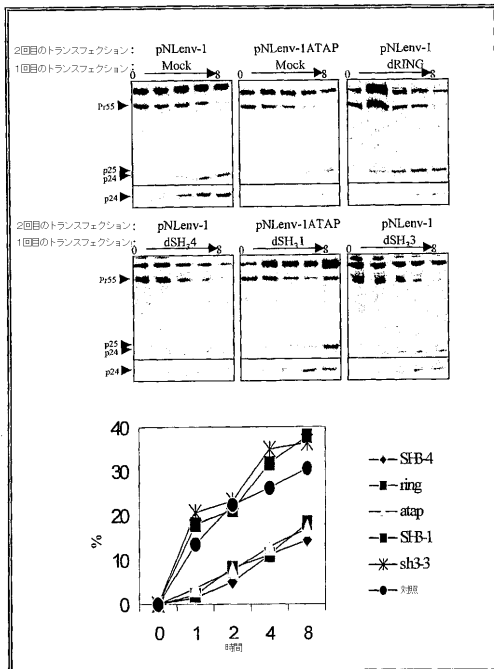
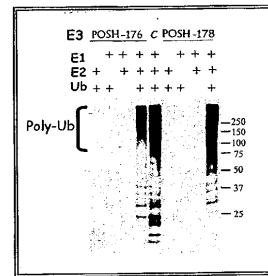


Figure 21

【 図 22 】

Figure 22: ヒトPOSHはユビクチンリガー複合体を有している



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/04	
C 1 2 N 7/04	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 N 9/00	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/25	
C 1 2 Q 1/25	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, 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

(74) 代理人 100100424

弁理士 中村 知公

(72) 発明者 アルロイ, アイリス

イスラエル ネス ジオナ 7 4 0 6 5 ハシリオン ストリート 1 0 アpartment 1 7

(72) 発明者 グリーナー, ツヴィッカ

イスラエル ネス - ジオナ ハハヴァゼレット 9 エイ

(72) 発明者 トゥヴィア, シュムエル

イスラエル 4 2 4 9 0 ネタニヤ ハルツィット 1

(72) 発明者 ベン - アブラハム, ダニー

イスラエル テル - アビブ マハール 6 0

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA07 CA04 CA11 CA12 CA20 DA02 EA04 GA13
HA14

4B050 CC03 DD11 LL01 LL03

4B063 QA01 QA05 QA11 QQ08 QQ10 QQ79 QR01 QR32 QR48 QR56
QR66 QR77 QS34 QS36 QX02

4B065 AA90X AA91X AA93X AA95X AB01 BA02 BA03 BA04 BA05 CA24
CA27 CA44 CA46

4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA02 BA22 CA53

NA14 ZB332
4C085 AA13 AA14
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB33
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 DA89 EA20 EA50
FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005519636A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2004503917	申请日	2002-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	普洛提欧罗吉克斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	变形菌LOGIX, 油墨.		
[标]发明人	アルロイアイリス グリーナーツヴィッカ トゥヴィアシユムエル ベンアブラハムダニー		
发明人	アルロイ, アイリス グリーナー, ツヴィッカ トゥヴィア, シユムエル ベン-アブラハム, ダニー		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/12 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/04 C12N9/00 C12Q1/02 C12Q1/25 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N5/10 A61K38/00		
CPC分类号	C12N9/93 C12Y603/02019		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P31/12 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/04 C12N9/00 C12Q1/02 C12Q1/25 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024 /AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA14 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063 /QA01 4B063/QA05 4B063/QA11 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ79 4B063/QR01 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065 /AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065 /BA04 4B065/BA05 4B065/CA24 4B065/CA27 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084 /CA53 4C084/NA14 4C084/ZB332 4C085/AA13 4C085/AA14 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045 /BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	远藤顺治		
优先权	60/345846 2001-11-09 US 60/364530 2002-03-15 US		
其他公开文献	JP2005519636A		

摘要(译)

该申请公开了涉及各种生物过程(包括病毒再生)的新多肽和核酸。还描述了相关的方法和组合物。

