



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 28 802 T2 2005.03.31**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 787 988 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 28 802.1**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 101 821.3**

(96) Europäischer Anmeldetag: **05.02.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.08.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **28.04.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.03.2005**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/547**

G01N 33/546, C07K 14/705

(30) Unionspriorität:

1882796 05.02.1996 JP

26671196 17.09.1996 JP

(73) Patentinhaber:

Handa, Hiroshi, Prof., Tokio/Tokyo, JP;

Kawaguchi, Haruma, Prof., Yokohama, JP

(74) Vertreter:

**Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman
Vossius, Dr. Martin Grund, Dr. Georg Schnappauf,
81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB

(72) Erfinder:

gleich Anmelder

(54) Bezeichnung: **Wirkstoffimmobilisierte Partikel und Verfahren zur Reinigung von Proteinen**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Mikrosphäre, die dadurch hergestellt wird, dass eine Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, an ein Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, über einen Spacer gekoppelt wird, als auch ein Verfahren zum Isolieren einer Zielsubstanz unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mikrosphäre.

2. Hintergrund

[0002] Zellen, die einen lebenden Körper ausmachen, werden verschiedenen Arten von Stimulierung von der externen Umwelt stets ausgesetzt. Um auf eine solche Stimulierung zu reagieren, führen die Zellen manche Gengruppen zur Expression. Als eine Folge können verschiedene Lebensphänomene auftreten, wie eine Induktion eines Zellwachstums und/oder einer Zelldifferenzierung und Erhalten einer physiologischen Homöostase. Eine extrazelluläre Stimulation wird in ein intrazelluläres Signal umgewandelt, das einen spezifischen proteinartigen Transkriptionsfaktor aktiviert. Der funktionell aktivierte Transkriptionsfaktor bindet an eine spezifische Basensequenz an einem Chromosom, um eine Expression einer Gengruppe unter seiner Regulation zu induzieren. Das Produkt der induzierten Genexpression fungiert hauptsächlich dazu, auf die Stimulation in manchen Fällen zu reagieren. In den anderen Fällen aktiviert das Produkt der induzierten Genexpression ferner einen weiteren Transkriptionsfaktor, der eine Expression einer weiteren Gengruppe unter seiner Regulation induziert, um sekundär auf die Stimulation zu reagieren. Es wird geschlossen, dass in jedem Fall eine zelluläre Reaktion auf die Stimulation von der äußeren Umwelt eine funktionelle Transformation von Transkriptionsfaktoren ist.

[0003] In den letzten Jahren wurde eine sehr interessante Tatsache aufgedeckt. Das heißt, Wirkmechanismen von Cyclosporin A (CysA) und FK506, immunsuppressiven Arzneimitteln, wurden aufgedeckt. Vergleiche J. Lin et al., Cell, 66: 807–815 (1991), S. J. O'Keefe et al., Nature, 357: 692 (1992) und N. A. Clipstone et al., Nature, 357: 695 (1992). Die erste Gelegenheit zum Aufdecken der Mechanismen ist die Identifikation von intrazellulären Rezeptoren dieser Arzneimittel. Vergleiche R. E. Handschumacher et al., Science, 226, 544 (1984) und J. J. Sekierka et al., J. Immunol., 143: 1580–1583 (1989). Basierend auf diesen Feststellungen wurde eine Reihe von Signalwegen nach einer Stimulation durch ein Antigen in T-Zellen aufgedeckt, die immunkompetente Zellen sind.

[0004] Demzufolge wird erwartet, dass eine Untersuchung und Identifizierung von intrazellulären Rezeptoren für Arzneimittel als auch eine Aufdeckung von Signalwegen weiter in eine Entwicklungsforschung von neuen Arzneimitteln, die auf den Signalweg abzielen, und eine Forschung für ein Design neuer Arzneimittel entwickelt werden.

[0005] Herkömmliche Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von intrazellulären Rezeptoren für Arzneimittel sind Fraktionierung von Zellrohextrakten unter Verwendung von verschiedenen Säulen, gefolgt von einer Detektion von Faktoren, die an markierte Arzneimittel in jeder Fraktion binden. Folglich wurden bis jetzt notwendigerweise zwei Schritte eines Verfahrens durchgeführt, wobei der erste aus der Isolierung und Aufreinigung unter Verwendung von Säulen bestand und der zweite aus einem Test für eine Bindungsaktivität für Arzneimittel bestand.

[0006] Demzufolge wurden für den Zweck einer Aufreinigung, Identifizierung und funktionellen Analyse von Rezeptoren für ein spezifisches Arzneimittel, die innerhalb von Zellen oder auf einer zellulären Membran liegen, bestimmte Arzneimittel-immobilisierte Mikrosphären entwickelt und eingesetzt.

[0007] Die JP-A-04218772 beschreibt ein Diagnosereagens, das eine Antigen-Antikörper-Reaktion verwendet. Das Reagens besteht aus einem Polymer wie Styrol/Glycidylmethacrylat, das an eine immunoaktive Substanz über eine organische Verbindung mit einer Hydroxylgruppe gebunden ist.

[0008] Die JP-A-63017692 beschreibt ein Verfahren zum Aufrechterhalten einer Aktivität eines Enzyms für eine lange Zeitspanne durch Binden des Enzyms an einem Ende an einen Spacer, der aus einem Diglycidylether besteht, und Immobilisieren des Enzyms an dem anderen Ende durch kovalente Bindungen.

[0009] Derwent Abstract (1992-102210) beschreibt eine DNA-immobilisierte Mikrosphäre aus einem Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, die zum Isolieren eines DNA-Transkriptionsfaktors verwendet wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Gemäß den herkömmlichen Aufreinigungsverfahren kann es eine außergewöhnliche lange Zeitspanne dauern, um Arzneimittel-bindende Faktoren aus Zellrohextrakten aufzureinigen, und außerdem ist die Ausbeute von Faktoren aufgrund der wiederholten Fraktionierung unter Verwendung verschiedener Säulen ziemlich gering. Folglich ist eine große Menge an Ausgangsmaterial für die Bestimmung einer Aminosäuresequenz von Arzneimittel-bindenden Faktoren erforderlich. Es kann auch sehr schwierig sein, ein Testverfahren für eine Bindungsaktivität von Rezeptoren für Arzneimittel aufzustellen, da erhaltene Arzneimittelrezeptoren gewöhnlich nicht identifiziert sind. Herkömmliche Verfahren einer Bestimmung einer Bindung von Rezeptoren an Arzneimittel sind das Filterbindungsverfahren und Gelfiltrationsverfahren, die die Tatsache verwenden, dass Arzneimittelrezeptoren (Proteine) an Filter binden und dass Größen von Arzneimitteln, die an Rezeptoren binden, größer werden als freie Arzneimittel und Rezeptoren. Doch binden manche Rezeptoren nicht an Filter oder andere Rezeptoren verändern ihre Konformation nach Bindung an Filter und setzen Arzneimittel frei. Folglich sollten Eigenschaften von Arzneimittelrezeptoren in den herkömmlichen Verfahren vorläufig untersucht werden. Die Erfindung zielt darauf ab, die vorstehend beschriebenen Probleme zu lösen, um Arzneimittel-immobilisierte Partikel und ein Verfahren zum Aufreinigen von Protein bereitzustellen.

[0011] Erfindungsgemäß wird eine Mikrosphäre, umfassend ein Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, bereitgestellt und eine Isolierung, Aufreinigung und Identifizierung von Rezeptoren für eine spezifische Verbindung, die eine physiologische Aktivität aufweist, werden leicht durchgeführt.

[0012] Zusätzlich betrifft die Erfindung Mikrosphären, die durch Koppeln von Substanzen hergestellt werden, und Verfahren für die Aufreinigung von Proteinen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mikrosphären.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] Fig. 1 ist ein Schema für das Herstellungsverfahren eines Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymers, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, und eines Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymers, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt und mit einem Spacer verbunden ist.

[0014] Fig. 2 ist ein Schema für das Isolierungsverfahren eines Proteins unter Verwendung von erfindungsgemäßen Mikrosphären.

[0015] Fig. 3(A) zeigt die Wirkungen von E3330 auf AP-Endonuklease-Aktivität von Ref-1. Fig. 3(B) zeigt die Wirkungen von NH_2 -E3330 auf AP-Endonuklease-Aktivität von Ref-1.

[0016] Fig. 4 zeigt die Verbesserung der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B durch rekombinantes rRef-1 und die Repression der Aktivität von rekombinantischem rRef-1 durch E3330.

[0017] Fig. 5 zeigt die Wirkungen von rekombinantischem rRef-1 auf die DNA-Bindungsaktivitäten von r-p65 und/oder r-p50.

[0018] Fig. 6 zeigt das Verfahren und die Ergebnisse des GST-Pull-down-Tests.

[0019] Fig. 7 ist ein Schema für die Struktur eines jeden rekombinanten Proteins von Ref-1, exprimiert durch verschiedene Deletionsmutanten.

[0020] Fig. 8 zeigt die Ergebnisse von Bindungstests gegen E3330 unter Verwendung der rekombinanten Proteine von Ref-1, exprimiert in E. coli von verschiedenen Deletionsmutanten.

[0021] Fig. 9 zeigt die Ergebnisse von Bindungstests gegen E3330 unter Verwendung der rekombinanten Proteine von Ref-1, exprimiert in E. coli durch verschiedene Deletionsmutanten.

[0022] Fig. 10 zeigt die Ergebnisse einer Identifizierung von E3330-Bindungsdomäne unter Verwendung der rekombinanten Proteine von Ref-1, exprimiert durch verschiedene Deletionsmutanten.

[0023] Fig. 11 zeigt die Ergebnisse einer Identifizierung von E3330-Bindungsdomäne unter Verwendung der

rekombinanten Proteine von Ref-1, exprimiert durch verschiedene Deletionsmutanten.

[0024] Fig. 12 zeigt die Zusammenfassung einer E3330-Bindungsdomäne in Ref-1, identifiziert unter Verwendung der rekombinanten Proteine von Ref-1, exprimiert durch verschiedene Deletionsmutanten.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0025] Erfindungsgemäß wird eine Mikrosphäre bereitgestellt, die dadurch hergestellt wird, dass eine Verbindung, die eine physiologische Aktivität aufweist, an ein Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, über einen Spacer gekoppelt wird. Zusätzlich wird erfindungsgemäß ein Verfahren zum Isolieren einer Substanz unter Verwendung einer Mikrosphäre bereitgestellt, die dadurch hergestellt wird, dass eine Verbindung, die eine physiologische Aktivität aufweist, an ein Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, über einen Spacer gekoppelt wird.

[0026] Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Isolieren einer Zielsubstanz, die sich an eine Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, anheften kann, aus einem Gemisch, das die Zielsubstanz enthält, unter Verwendung einer Mikrosphäre, die dadurch hergestellt wird, dass die Substanz, die physiologische Aktivität aufweist, an ein Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, über einen Spacer gekoppelt wird. Genauer beinhaltet das erfindungsgemäße Verfahren einer Isolierung einer Substanz ein Mischen von Zellrohextrakten und Mikrosphären, die durch Koppeln von Verbindungen, die physiologische Aktivität aufweisen, an Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymere, die mit Glycidylmethacrylat umhüllt sind, über Spacer hergestellt werden, gefolgt von einer Isolierung von Mikrosphären und sodann einem Eluieren der Zielsubstanz, die an die Substanzen, die physiologische Aktivität aufweisen, auf den Mikrosphären anhaften, um ein geeignetes Verfahren zum Isolieren einer Zielsubstanz bereitzustellen.

[0027] Als die Substanz, die erfindungsgemäße Partikel von Mikrosphären ausbildet, werden Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymere, die mit Glycidylmethacrylat umhüllt sind, verwendet. Es gibt keine spezifische Beschränkung hinsichtlich ihrer Polymerisationszustände oder morphologischen Eigenschaften bei dem Herstellungsverfahren, bei dem ausgebildete Partikel aus einer flüssigen Phase isoliert werden sollen. Jedoch ist es bevorzugt, dass Partikel durch seifenfreie Emulsionspolymerisation gemäß dem Verfahren hergestellt werden, das von Inomata et al. entwickelt wurde, wie in Y. Inomata et al., Anal. Biochem., 206: 109 (1992), beschrieben.

[0028] Der Spacer ist erfindungsgemäß eine chemische Verbindung, die zwischen dem vorstehend beschriebenen Partikel und einer Verbindung liegt, die eine physiologische Aktivität aufweist, wie genauer hierin beschrieben. Ein bevorzugter Spacer ist eine Verbindung, die eine oder mehrere funktionelle Gruppen wie eine Aminogruppe, Carboxylgruppe und Epoxygruppe an ihren beiden Enden vor einem Anbinden an ein Partikel und eine Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, beinhaltet. Für die Auswahl eines Spacers gibt es erfindungsgemäß keine spezifische Beschränkung, aber der Spacer sollte eine Substanz sein, die das vorstehend beschriebene Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, mit einer Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, bei einem geeigneten Abstand verbindet. Ein besonders bevorzugter Spacer ist ein Ethylenglykoldiglycidyletherderivat.

[0029] Für die Auswahl einer Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist (die gelegentlich hierin nachstehend als physiologisch aktive Substanz abgekürzt wird), gibt es erfindungsgemäß keine spezifische Beschränkung, aber die Substanz sollte eine Aktivität in einem lebenden Körper und eine Wechselwirkung und/oder Affinität gegenüber einer anderen Substanz innerhalb oder außerhalb des lebenden Körpers aufweisen. Es ist ferner bevorzugt, eine Verbindung zu verwenden, die spezifisch an einen Rezeptor bindet, der innerhalb von Zellen oder auf einer zellulären Membran liegt. In einem Fall, in dem die Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, funktionelle Gruppen in ihrer molekularen Struktur aufweist, die mit dem vorstehend beschriebenen Spacer verbunden werden können, wie eine Aminogruppe und Hydroxylgruppe, wird die funktionelle Gruppe als eine Gruppe verwendet, die mit dem Spacer verbunden wird. In dem anderen Fall, in dem die Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, keine funktionelle Gruppe in ihrer molekularen Struktur aufweist, die mit dem vorstehend beschriebenen Spacer verbunden werden kann, wird eine funktionelle Gruppe, die mit dem vorstehend beschriebenen Spacer verbunden werden kann, zusätzlich in die betroffene physiologisch aktive Substanz eingebracht und sodann mit dem Spacer verbunden. In jedem Fall ist es erforderlich, darauf zu achten, die physiologische Aktivität der betroffenen physiologisch aktiven Substanz nicht dadurch zu inaktivieren, dass die physiologisch aktive Substanz mit einem Spacer verbunden wird. Es ist nämlich wichtig sicherzustellen, dass eine Ziel- oder gewünschte physiologische Aktivität nicht durch Verbinden der physiologisch aktiven Substanz mit einem Spacer inaktiviert wird.

[0030] Als die Substanz, die physiologische Aktivitäten erfindungsgemäß aufweist, kann zum Beispiel 3-[(5-(2,3-Dimethoxy-6-methyl-1,4-benzochinonyl))-2-nonyl-2-propionsäure (die gelegentlich als E3330 hierin nachstehend abgekürzt wird oder ein Derivat davon) geeigneterweise verwendet werden.

[0031] Ein Herstellungsverfahren einer Mikrosphäre, bestehend aus einer Verbindung, die eine physiologische Aktivität aufweist und an ein Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, über einen Spacer erfindungsgemäß gekoppelt ist, ist wie folgt. Ein Partikel aus einem Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist (das gelegentlich hierin nachstehend als ein SG-Partikel abgekürzt wird), wird gemäß einem herkömmlichen Verfahren hergestellt. Jedoch zu dem Zweck einer leichten Bindung des SG-Partikels an einen Spacer ist es besonders bevorzugt, dass die Glycidylgruppe auf dem SG-Partikel mit geeigneten Reagenzien wie Ammoniumhydroxid, ringgeöffnet wird, gefolgt von dem Einbringen einer bevorzugten funktionellen Gruppe für ein Anbinden an einen Spacer, falls erforderlich. Danach wird ein Spacer an den SG-Partikel gebunden, gefolgt von einer Reaktion mit einer Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, oder ihren Derivaten. Folglich wird eine erfindungsgemäße Mikrosphäre hergestellt.

[0032] In diesen Reaktionen werden verschiedene Lösungsmittel wie Dioxan, DMSO und Wasser geeigneterweise verwendet, falls erforderlich.

[0033] Fig. 1 zeigt ein Beispiel für die Herstellung einer erfindungsgemäßen Mikrosphäre. Geeignete Verbindungen wie Styrol und Glycidylmethacrylat werden gemäß einem herkömmlichen Verfahren wie Emulsionspolymerisation polymerisiert, um ein SG-Partikel mit einer funktionellen Glycidylgruppe, die auf seiner Oberfläche herausragt, herzustellen. Partikelgrößen werden selektiv gemäß den Umständen variiert. Jedoch betragen die Größen (Längen) herkömmlicherweise etwa 0,05 bis 0,5 µm und vorzugsweise betragen sie etwa 0,1 bis 0,3 µm. Das hergestellte SG-Partikel wird mit einer Verbindung, die als ein Spacer verwendet wird, wie Ethylenglykoldiglycidylether (EGDE) umgesetzt, um einen Spacer an das SG-Partikel zu binden. Folglich wird ein Spacer-bindendes SG-Partikel (SG-EGDE-Partikel) erhalten. Sodann wird das erhaltene Partikel mit einer physiologisch aktiven Substanz, die eine reaktive funktionelle Gruppe wie eine Aminogruppe aufweist, vorzugsweise in einem organischen Lösungsmittel wie Dioxan umgesetzt. Dadurch wird eine erfindungsgemäße Mikrosphäre, das heißt ein Latexpartikel mit einer immobilisierten physiologisch aktiven Substanz, hergestellt.

[0034] Für die Auswahl eines Gemisches, das eine Zielsubstanz für eine Isolierung erfindungsgemäß enthält, gibt es keine spezifische Beschränkung, aber das Gemisch sollte eine Substanz enthalten, die eine Affinität für und eine selektive Bindungsfähigkeit für eine physiologisch aktive Substanz, die bei der Herstellung einer Mikrosphäre verwendet wird, aufweist. Es ist herkömmlicherweise bevorzugt, dass Zellextrakte, insbesondere die Zellextrakte aus den Wirkstellen der betroffenen physiologisch aktiven Substanz, als ein Gemisch verwendet werden.

[0035] Das Isolierungsverfahren erfolgt erfindungsgemäß wie folgt. Mikrosphären, die eine physiologisch aktive Substanz binden, und ein Gemisch, das Proteine wie Zellextrakte enthält, werden gemischt und, falls erforderlich, mehrere Minuten bis mehrere Stunden gerührt. Die Mikrosphären, an die Proteine anhaften, werden abgetrennt und mit einer Pufferlösung, falls erforderlich, gespült. Sodann werden anheftende Proteine von der Mikrosphären unter Verwendung einer geeigneten Lösung wie einer Kaliumchloridlösung eluiert. Es gibt keine spezifische Beschränkung hinsichtlich der Bedingungen, unter denen sich die Zielsubstanz, die isoliert werden soll, an eine physiologisch aktive Substanz anheftet, die bei der Herstellung einer Mikrosphäre verwendet wird. Jegliche Arten von Anheften wie chemische Bindungen (Wasserstoffbindung, etc.) und chemische oder physikalische Adsorption können geeigneterweise verwendet werden.

[0036] Fig. 2 zeigt ein Beispiel für die Isolierung eines Proteins gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren. In diesem Beispiel wird E3330 als die physiologisch aktive Substanz verwendet.

[0037] Ein erhaltenes Protein wird unter Verwendung von SDS-PAGE oder anderen geeigneten Verfahren detektiert. Zusätzlich wird ein erhaltenes Protein gemäß einem herkömmlichen Verfahren wie Chromatographie, falls erforderlich, aufgereinigt.

[0038] Proteine, die gemäß einem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert werden, werden als Rezeptoren für die physiologisch aktive Substanz von den Mikrosphären betrachtet. Jedoch sind Proteine, die gemäß einem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert werden, nicht auf die Rezeptoren für die physiologisch aktive Substanz beschränkt, die bei der Herstellung von Mikrosphären verwendet wird. Jegliche Arten von Substanzen, die chemische, physikalische oder biologische Affinitäten für die physiologisch aktive Substanz, die bei der Herstel-

lung von Mikrosphären verwendet wird, aufweisen, können gemäß einem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert werden.

[0039] Ein erhaltenes Protein wird, falls erforderlich, aufgereinigt und kann einer Bestimmung seiner Aminosäuresequenz unterzogen werden. Zusätzlich können Gene, die für das betroffene Protein kodieren, gemäß einem herkömmlichen biotechnologischen Verfahren geklont werden und deren Basensequenzen können bestimmt werden. Ferner werden gemäß einem herkömmlichen Gentechnologieverfahren Proteine oder Peptide, die aus Teilaminosäuresequenzen des betroffenen Proteins bestehen, exprimiert und ein aktiver Teil des Rezeptorproteins kann bestimmt werden. Diese Verfahren sind auch in den Arbeitsbeispielen beschrieben, die folgen, wobei Beispiele angegeben sind, in denen E3330 als die physiologisch aktive Substanz verwendet wird.

[0040] Strukturen von erhaltenen Rezeptoren oder Domänen, die aus aktiven Teilen der Rezeptoren bestehen; können mittels NMR-Analyse, Röntgenstrahlkristallanalyse oder Simulationsanalyse unter Verwendung von Computern, basierend auf deren Aminosäuresequenzen, aufgedeckt werden. Zum Beispiel wird aufgrund der vorstehenden Strukturanalysen vermutet, dass das Protein Ref-1, das gemäß einem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert wird, indem E3330 als die physiologisch aktive Substanz bei der Herstellung von Mikrosphären verwendet wird, solche Strukturen wie β -Faltblatt/ α -Helix/ β -Faltblatt in der Domäne von der Aminosäure 82 bis Aminosäure 106 aufweist. Die Aminosäuresequenz von Ref-1 (SEQ ID NO: 4) ist in Beispiel 9, das folgt, gezeigt. Regionen der Aminosäurereste 72 bis 88 (SEQ ID NO: 13) von Ref-1 sind von besonderem Interesse und in Beispiel 14, das folgt, gezeigt.

[0041] Ferner kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren die Substanz, die sich an die Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, anheften kann, ein Protein oder Peptid sein, das eine Sequenz aufweist, die hinsichtlich der SEQ ID NO: 4 (deren Sequenz in Beispiel 9, das folgt, gezeigt ist) teilweise deletiert, hinzugefügt oder substituiert ist, und solche Peptide umfassen vorzugsweise mindestens etwa 10 Aminosäuren, mehr bevorzugt mindestens etwa 15 bis 50 Aminosäuren, noch mehr bevorzugt mindestens etwa 40 bis etwa 100 Aminosäuren. Solche Peptide weisen vorzugsweise mindestens etwa 70% Homologie (Sequenzidentität) gegenüber SEQ ID NO: 4, mehr bevorzugt mindestens etwa 80 oder 90% Sequenzhomologie gegenüber SEQ ID NO: 4 auf. Auch werden solche bevorzugten Peptide vorzugsweise eine Region enthalten, die eine beträchtliche Sequenzidentität (z. B. eine Sequenzidentität von etwa 80, 90 oder 95% oder mehr) gegenüber SEQ ID NO: 13 (deren Sequenz in Beispiel 14, das folgt, gezeigt ist) aufweist.

[0042] Basierend auf den Ergebnissen solcher stereochemischer Strukturanalysen und genetischer Analysen kann man leicht bestimmen, welcher Aminosäurerest an eine physiologisch aktive Substanz, die bei der Herstellung von Mikrosphären verwendet wird, unter den Aminosäuren der Proteine oder aktiven Gruppen, die gemäß einem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert werden, bindet. Zusätzlich kann man die Wechselwirkung zwischen der betroffenen physiologisch aktiven Substanz, die bei der Herstellung von Mikrosphären verwendet wird, und Aminosäuren des isolierten Proteins auf einer molekularen und/oder atomaren Ebene untersuchen. Ferner wird es praktikabel sein, chemische Kinetiken der Bindungsreaktionen zu analysieren. Viele Erkenntnisse, die aus den vorstehenden Untersuchungen erhalten werden, werden nicht nur das Protein, das der Rezeptor für die physiologisch aktive Substanz ist, die bei der Herstellung von Mikrosphären verwendet wird, identifizieren, sondern auch den Wirkmechanismus der betroffenen physiologisch aktiven Substanz in einem lebenden Körper aufdecken. Außerdem wird es praktikabel sein, ein Design eines neuen Arzneimittels dadurch durchzuführen, dass ein neues Arzneimittel auf einer atomaren Ebene genau gesteuert wird, dessen Bindungsmechanismus von dem der physiologisch aktiven Substanz, die bei der Herstellung von Mikrosphären verwendet wird, hinsichtlich der Wechselwirkung mit dem Protein des Rezeptors unterschiedlich ist. Verschiedene Arzneimittel, die gemäß dem vorstehenden Verfahren designt werden, weisen vernünftigerweise Funktionen auf, die von denjenigen der physiologisch aktiven Substanz, die bei der Herstellung von Mikrosphären verwendet wird, verschieden sind. Folglich werden die Arzneimittel in geeigneterer Weise für verschiedene Zwecke verwendet werden. Somit ist das erfindungsgemäße Verfahren außerordentlich wichtig für ein neues Verfahren des Arzneimitteldesigns.

[0043] Zusätzlich wird erfindungsgemäß ein Verfahren für eine Isolierung und Detektion von Substanzen, die eine Affinität für einen Rezeptor aufweisen, dadurch bereitgestellt, dass ein Protein mit einer Fähigkeit des betroffenen Rezeptors als eine Substanz mit physiologischer Aktivität verwendet wird, die mit Mikrosphären gekoppelt wird. Als eine Substanz mit einer Fähigkeit eines Rezeptors kann ein ganzes Rezeptorprotein verwendet werden, aber es ist bevorzugt, eine Domäne, die durch Trimmen des Rezeptorproteins auf eine aktive Domäne mit Mehrfachen von 10 (z. B. etwa 20 bis 60) Aminosäureresten erhalten wird, als einen aktiven Teil des betroffenen Rezeptors zu verwenden.

[0044] Folglich werden Screening-Untersuchungen hinsichtlich Arzneimitteln, die spezifisch an den betroffenen Rezeptor oder seine aktive Domäne binden, gemäß den vorstehenden Verfahren praktischerweise erfolgen. Folglich werden chemische synthetische Substanzen, von denen erwartet wird, dass sie geeignete Arzneimittel sind, leicht isoliert und unter verschiedenen Arzneimittelbibliotheken durch Ausführen der Screening-Untersuchungen detektiert. Die mittels der vorstehenden Screening-Untersuchungen isolierte und detektierte Substanz sollte eine Affinität für das Protein aufweisen, das eine Fähigkeit eines Rezeptors aufweist und mit Mikrosphären gekoppelt ist. Folglich wird die Substanz derart entwickelt, dass sie ein wirksamer Bestandteil eines Medikaments für die Förderung oder Inhibierung der Aktivität des betroffenen Rezeptors ist.

[0045] Erfindungsgemäß wird eine Mikrosphäre aus einem Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, bereitgestellt und eine Aufreinigung und Identifizierung von Rezeptoren, an die eine spezifische Verbindung, die eine physiologische Aktivität aufweist und die innerhalb von Zellen oder auf einer zellulären Membran liegt, leicht durchgeführt. Partikel, die mit einer Substanz gekoppelt sind, die eine erfindungsgemäß spezifizierte physiologische Aktivität aufweist, stellen bahnbrechende und signifikante Wirkungen bereit, das heißt, die Isolierung und Aufreinigung eines Rezeptors für ein Arzneimittel können gleichzeitig mit der Bewertung seiner Bindungsaktivität gegenüber dem Arzneimittel erfolgen, die Zeit, die für eine Isolierung und Aufreinigung von Arzneimitteln benötigt wird, wird bemerkenswert verkürzt und das Wiedererwerbungsverhältnis wird außerordentlich verbessert und die Untersuchung des Testverfahrens für eine Bindungsaktivität gegenüber einem Arzneimittel wird nicht mehr notwendigerweise durchgeführt. Zusätzlich wird erfindungsgemäß bereitgestellt, dass ein intrazellulärer Rezeptor für ein Arzneimittel oder eine Verbindung unter Verwendung der Arzneimittel- oder der Verbindungs-immobilisierten Partikel isoliert und aufgereinigt werden kann und sodann die Struktur und Funktionen des Rezeptors bestimmt werden können. Ferner ist die Erfindung für die Entwicklung von neuen Arzneimitteln mit hervorragenden Funktionen, basierend auf vielen Erkenntnissen, außerordentlich geeignet, die aus den strukturellen und funktionellen Analysen von Rezeptoren für Arzneimittel gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten werden.

[0046] Die Erfindung wird weiter durch die nachstehenden Beispiele veranschaulicht. Diese Beispiele werden bereitgestellt, um beim Verstehen der Erfindung zu helfen, und sie sollen nicht beschränkend verstanden werden.

Beispiel 1 (Herstellung von Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymeren)

[0047] Styrol (St, Wako Pure Chemicals. Es wurde nach Destillation unter vermindertem Druck von 21,5 mmHg bei 46°C verwendet), Glycidylmethacrylat (GMA, Wako Pure Chemicals. Es wurde nach Destillation unter vermindertem Druck von 2 mmHg bei 33°C verwendet), Divinylbenzol (DVB, Tokyo Kasei), 2,2'-Azobis(2-amidinopropandihydrochlorid) (V-50, Wako Pure Chemicals) und Wasser wurden gemäß der nachstehenden Zusammensetzungsformel verwendet:

St/GMA/DVB/V-50/H₂O = 1,2/1,8 + 0,3/0,04/0,06/110 (g)

[0048] Nach Ersetzen des Gases in dem Gemisch durch Stickstoffgas erfolgte eine Polymerisation bei 70°C für 24 Stunden. Um das Gemisch zu polymerisieren, erfolgte die seifenfreie Emulsionspolymerisation gemäß dem Verfahren, das von Inomata et al. (Y. Inomata et al., Anal. Biochem., 206: 109 (1992)) entwickelt wurde.

[0049] Zwei Stunden nach dem Start der Polymerisation wurden 0,3 g GMA zu dem Gemisch gegeben, um die gesamte Oberfläche der erhaltenen Polymere mit GMA durch und durch zu umhüllen. Die erhaltenen Polymere (SG-Partikel) wurden durch Zentrifugation (15.000 UpM für 15 Minuten bei 4°C) sedimentiert, gefolgt von einer Dekantierung und sodann in 200 ml Wasser wieder suspendiert. Das vorstehende Verfahren wurde dreimal wiederholt, um die SG-Partikel zu waschen, und sie wurden schließlich in Wasser suspendiert.

[0050] Um Aminogruppen in die gewaschenen SG-Partikel (0,25 g) einzubringen, wurde NH₄OH (55,3 mmol, was einer fünfzigfachen größeren Menge im Vergleich mit der GMA-Einheit entspricht) zu den Partikeln gegeben, gefolgt von einer Einstellung des pH-Werts auf 11 mit 1 N HCl. Das Gemisch wurde unter Verwendung eines Rührers bei 70°C 24 Stunden gerührt, so dass die Epoxygruppe von GMA ringgeöffnet wurde.

Beispiel 2 (Immobilisieren eines Spacers)

[0051] Nachstehend wird ein Beispiel für eine Immobilisierung von Ethylenglykoldiglycidylether (EGDE, Wako Pure Chemicals), der als ein Spacer verwendet wurde, auf die SG-Partikel, die in dem Arbeitsbeispiel 1 erhalten wurden, gezeigt.

[0052] Eine Überschussmenge an EGDE, die hundertfach größer war als die Menge (mol) an Aminogruppen auf der Oberfläche von etwa 62,5 mg SG-Partikel, die in dem vorstehenden Beispiel 1 hergestellt wurden, wurde zu den SG-Partikeln gegeben und sodann wurde das Gemisch bei 30°C 24 Stunden bei einem pH-Wert von 11 (eingestellt mit 1 N NaOH) gerührt, so dass eine Epoxygruppe von EGDE an eine Aminogruppe auf der Oberfläche des SG-Partikels kovalent gebunden wurde. Um eine gleichzeitige Immobilisierung von zwei Epoxygruppen an beiden Enden eines EGDE-Moleküls auf SG-Partikel zu verhindern, wurde eine Überschussmenge an EGDE zugegeben. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde etwa 1 mmol EGDE auf 1 g der Partikel immobilisiert. Nach Abschluss der Reaktion wurden die SG-Partikel dreimal mit Wasser unter Verwendung eines Zentrifugationsverfahrens gewaschen. Sodann wurden die erhaltenen Spacer-immobilisierten Partikel, die SG-EGDE-Partikel sind, als Partikel verwendet, an die eine physiologisch aktive Verbindung immobilisiert wird.

Beispiel 3 (Immobilisierung eines Aminoderivats von E3330 mit einem Spacer)

(a) Einbringen einer Aminogruppe in E3330

[0053] Da E3330 keine geeignete funktionelle Gruppe aufweist, ist es schwierig, E3330 auf SG-EGDE-Partikel zu immobilisieren. Folglich wurde NH₂-E3330 dadurch synthetisiert, dass eine Aminogruppe in E3330 eingebracht wurde.

(b) Bestätigung der Funktionen von NH₂-E3330

[0054] Die Funktionen von NH₂-E3330 wurden mit denjenigen von E3330 hinsichtlich der transkriptionellen Aktivierungsfähigkeit von NF-κB verglichen. Um deren Funktionen zu untersuchen, erfolgten Transfektionsexperimente durch Einbringen der rekombinanten Plasmid-DNA, die durch NF-κB regulierte Luciferase-Gene aufweist, in Jurkat-Zellen. Als ein Ergebnis wurde festgestellt, dass NH₂-E3330 die transkriptionelle Aktivierungsfähigkeit von NF-κB nicht so stark wie E3330 verminderte, aber zweifellos verminderte. Folglich wurde bestätigt, dass die in E3330 eingebrachte Aminogruppe die Bindung von E3330 an intrazelluläre Rezeptoren nicht inhibiert.

(c) Immobilisieren von NH₂-E3330 an SG-EGDE-Partikel

[0055] 10 mg SG-EGDE-Partikel, die in dem vorstehenden Arbeitsbeispiel 2 erhalten wurden, wurden dreimal mit 1 ml 1,4-Dioxan unter Verwendung eines Zentrifugationsverfahrens gewaschen. Nach dem Waschen wurden 500 µl einer 1,4-Dioxanlösung, die 10 µmol NH₂-E3330 enthielt, zu den gepackten SG-EGDE-Partikeln gegeben, um die SG-EGDE-Partikel in der vorstehenden Lösung zu dispergieren, gefolgt von einer Reaktion bei 37°C für 24 Stunden, um NH₂-E3330 an Epoxygruppen von EGDE auf der Oberfläche der SG-EGDE-Partikel zu immobilisieren. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Partikel dreimal mit 20 µl 1,4-Dioxan unter Verwendung eines Zentrifugationsverfahrens gewaschen. Sodann wurden die Partikel in 1 ml 1 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH-Wert von 7,4) dispergiert und ihnen wurde ermöglicht, bei 4°C für mindestens 24 Stunden stillzustehen, um die intakten Epoxygruppen auf den Oberflächen von SG-EGDE-Partikeln gründlich zu maskieren. Die Arzneimittel-immobilisierten Partikel wurden bei 4°C an einem dunklen Platz gelagert. Das Zentrifugationsverfahren zum Waschen erfolgte bei 15.000 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurden etwa 0,15 mmol NH₂-E3330 auf 1 g der SG-EGDE-Partikel immobilisiert. Die vorstehende immobilisierte Menge an NH₂-E3330 wurde dadurch erhalten, dass die Menge an NH₂-E3330, die nicht an die SG-EGDE-Partikel gebunden war, von der Ausgangsmenge an NH₂-E3330 subtrahiert wurde. NH₂-E3330 zeigt die Maximalabsorption bei einer Wellenlänge von 254,5 nm, so dass jede Menge an NH₂-E3330 dadurch bestimmt werden kann, dass die Absorption bei einer Wellenlänge von 254,5 nm jeder Probe wie der Ausgangslösung, der nicht bindenden Fraktion und der Waschfraktionen gemessen wird. Die Messung der Absorption erfolgte mit einem DU-64-Spektrophotometer (BECKMAN).

Beispiel 4 (Herstellung eines unbehandelten nukleären Extrakts und einer cytoplasmatischen Fraktion)

[0056] Die Kulturmediumsuspension von Jurkat-Zellen (2×10^{10} Zellen), die in einem Suspensionsmaßstab von 8 Litern kultiviert wurden, wurde unter Verwendung von 500 ml-Zentrifugationsröhrchen (NARGEN) bei 500 g für 10 Minuten bei 4°C zu dem Zweck eines Gewinnens der Zellen zentrifugiert. Die gewonnenen Zellen wurden zweimal mit PBS(-) gewaschen. Das Waschverfahren erfolgte unter Verwendung von 50 ml-Zentrifugationsröhrchen und die Zentrifugationsbedingungen waren 700 g für 5 Minuten bei 4°C. Sodann wurde das endgültige gepackte Zellvolumen (PCV) gemessen. Puffer A (10 mM Hepes mit einem pH-Wert von 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT) wurde bei einem vierfach größeren Volumen als dem des PCV zu den

gepackten Zellen gegeben, um die Zellen zu suspendieren. Der Zellsuspension wurde ermöglicht, auf Eis 20 Minuten stillzustehen, so dass die Zellen aufquollen. Die Zellmembranen der gequollenen Zellen wurden durch 20 Hübe unter Verwendung eines 40 ml-Dounce-Homogenisierungsgeräts des B-Typs (WHEATON) aufgebrochen, in ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen (NARGEN) überführt und bei 4.200 g 6 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um die nukleäre Fraktion (Pellet) von der cytoplasmatischen Fraktion (Überstand) zu trennen.

[0057] Puffer A wurde bei einem fünffach größeren Volumen als dem des PCV zu der isolierten nukleären Fraktion gegeben, um die Nuklei wieder zu suspendieren. Die nukleäre Suspension wurde bei 4.200 g 6 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um die kontaminierte cytoplasmatische Fraktion zu entfernen. Das erhaltene nukleäre Pellet wurde in Puffer C (20 mM Hepes mit einem pH-Wert von 7,9, 25% (v/v) Glycerin, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT) bei dem gleichen Volumen wie dem des PCV dispergiert und durch 10 Hübe unter Verwendung eines Dounce-Homogenisierungsgeräts des B-Typs gründlich suspendiert. Die Suspension wurde 30 Minuten bei 4°C langsam gerührt, um die nukleären Komponenten zu extrahieren. Der Extrakt wurde in ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 16.000 g 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde zweimal gegen einen Liter Puffer D (20 mM Hepes mit einem pH-Wert von 7,9, 20% (v/v) Glycerin, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT) 2,5 Stunden bei 4°C dialysiert.

[0058] Auf der anderen Seite wurde die cytoplasmatische Fraktion in ein weiteres 50 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und wieder bei 4.200 g 6 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (BECKMAN: No. 355620) überführt und bei 35 kUpM eine Stunde bei 4°C (BECKMAN: Rotor Typ 35) ultrazentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in der gleichen Weise, wie vorstehend für den nukleären Extrakt beschrieben, dialysiert.

[0059] Nach Abschluss der Dialysen wurden der nukleäre Extrakt und die cytoplasmatische Fraktion bei 14.000 g 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden als die Proben eines nukleären Extrakts bzw. einer cytoplasmatischen Fraktion verwendet. Diese Proben wurden in geeignete Aliquots unterteilt und bei -80°C bis zu einer Verwendung gelagert.

[0060] In gewöhnlichen Zubereitungen wurden etwa 20 ml von jeweils dem nukleären Extrakt und der cytoplasmatischen Fraktion bei einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml bzw. 10 mg/ml in dem Maßstab dieses Arbeitsbeispiels erhalten.

Beispiel 5 (Fraktionierung einer nukleären Fraktion und einer cytoplasmatischen Fraktion unter Verwendung von Phosphocellulose)

[0061] Kationische Ionenaustauschphosphocellulose (P11: Whatman) wurde für die Fraktionierung von Zell-extrakt verwendet. Verfahren für die Fraktionierung erfolgten immer bei 4°C. Destilliertes Wasser wurde zu 10 g getrockneter Phosphocellulose gegeben, um 500 ml einer Phosphocellulosesuspension zu erhalten. Die Suspension wurde gut gerührt und ihr wurde ermöglicht, für 30 Minuten stillzustehen. Um Phosphocellulose mit kleineren Partikelgrößen zu entfernen, wurde der Überstand der Suspension entfernt und destilliertes Wasser des gleichen Volumens wie des entfernten Überstands wurde zu der verbliebenen Phosphocellulose gegeben.

[0062] Diese Verfahren wurden mehrere Male wiederholt, um die Phosphocellulose mit einer gleichförmigen Partikelgröße zu erhalten. Als Nächstes wurde zur Aktivierung der Phosphocellulose jeweils 1 g der Phosphocellulose mit einer gleichmäßigen Partikelgröße, basierend auf dem Trockengewicht, in 50 ml 0,5 N HCl-Lösung suspendiert und der Suspension wurde ermöglicht, für 5 Minuten zu stehen. Die Phosphocellulose wurde auf zwei Blättern Filterpapier (Whatman: 3 MM Chr), die in einem Büchner-Trichter lagen, gesammelt und mit einer Überschussmenge an destilliertem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert wieder in einem neutralen Bereich lag. Der pH-Wert des Filtrats wurde unter Verwendung eines BTB-pH-Testpapiers gemessen, um den pH-Wert zu bestätigen. Die Phosphocellulose auf dem Filterpapier wurde in einen Becher überführt und in 0,5 N NaOH-Lösung wieder suspendiert. Der Suspension wurde ermöglicht, für 5 Minuten zu stehen. Die Phosphocellulose wurde in der gleichen Weise wie vorstehend beschrieben gewaschen. Schließlich wurde die Phosphocellulose in 0,5 N HCl-Lösung noch einmal suspendiert und wieder gewaschen. Als ein Ergebnis wurde eine aktivierte Phosphocellulose erhalten.

[0063] Die aktivierte Phosphocellulose wurde in eine Säule (BIORAD: 731-1550) gefüllt, so dass das Säulenvolumen 10 ml betrug. Die gefüllte Säule wurde mit 100 ml Puffer D (20 mM HEPES (pH-Wert von 7,9), 20% (v/v) Glycerin, 1 M KCl, 1,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT), der 1 N KCl enthielt, gewaschen und sodann

mit 100 ml Puffer D, der 0,1 M KCl enthielt, äquilibriert. Jeweils 5 ml eines nukleären Extrakts und einer cytoplasmatischen Fraktion aus Jurkat-Zellen wurden auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde schrittweise mit Puffer D bei verschiedenen Salzkonzentrationen an KCl eluiert, das heißt, die Elution erfolgte schrittweise mit Puffer D, der 0,1 M KCl, 0,32 M KCl, 0,35 M KCl oder 1 M KCl enthielt. Jede eluierte Fraktion wurde gegen Puffer D dialysiert, in geeignete Aliquots unterteilt und bei -80°C bis zu einer Verwendung gelagert.

[0064] Die Flussgeschwindigkeit wurde auf 8 ml/Minute eingestellt. Um die Vollständigkeit eines jeden Schritts einer Proteinelution mit jedem Salzkonzentrationspuffer zu bestätigen, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem UV-Detektor (GILSON: MODELL 111B) während der Fraktionierung gemessen.

[0065] Zuerst wurden 5 ml einer cytoplasmatischen Fraktion (Proteinkonzentration: 12 mg/ml) auf die vorstehende Säule aufgetragen. Als ein Ergebnis wurden 30 ml an 0,1 M-Fraktion (P.1, Proteinkonzentration: 1,12 mg/ml), 39 ml an 0,3 M-Fraktion (P.3, Proteinkonzentration: 0,23 mg/ml), 37 ml an 0,5 M-Fraktion (P.5, Proteinkonzentration: 0,07 mg/ml) und 53 ml an 1,0 M-Fraktion (P.1,0, Proteinkonzentration, 0,02 mg/ml) erhalten.

[0066] Als Nächstes wurde eine nukleäre Extraktfraktion unter Verwendung der Phosphocellulosesäule in der gleichen Weise auch fraktioniert.

Beispiel 6 (Isolierung von Proteinen unter Verwendung von Mikrosphären)

[0067] Ein Verfahren zum Isolieren und Aufreinigen von E3330-bindenden Proteinen unter Verwendung von E3330-immobilisierten Partikeln ist in **Fig. 2** dargestellt und nachstehend beschrieben.

(a) Mikrosphären und eine Fraktion, die durch die Fraktionierung unter Verwendung einer Phosphocellulosesäule in dem vorstehenden Arbeitsbeispiel 5 erhalten wurde, wurden gemischt und zentrifugiert, um Substanzen, die an E3330, das an Partikeln immobilisiert war, binden, aus dem Gemisch abzutrennen. Das Zentrifugationsverfahren zur Trennung erfolgte bei 15.000 g für 5 Minuten bei 4°C . Alle vorstehenden Verfahren erfolgten bei 4°C .

(b) Zuerst wurden jeweils 1 mg von E3330-nicht immobilisierten SG-EGDE-Partikeln und E3330-immobilisierten SG-EGDE-Partikeln dreimal mit 400 μl Puffer D' (20 mM HEPES (pH-Wert von 7,9), 10% (v/v) Glycerin, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT), in dem die Glycerinkonzentration 10% anstatt 20% in Puffer D betrug, gewaschen. Die E3330-nicht immobilisierten SG-EGDE-Partikel wurden in 1 ml 1 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH-Wert von 7,4) dispergiert und ihnen wurde ermöglicht, bei 4°C für mindestens 24 Stunden stillzustehen, um Epoxygruppen von EGDE zu maskieren. Diese Partikel wurden als eine Referenzkontrolle gegenüber E3330-immobilisierten SG-EGDE-Partikeln verwendet. Zu diesen gewaschenen E3330-nicht immobilisierten SG-EGDE-Partikeln und E3330-immobilisierten SG-EGDE-Partikeln wurden jeweils 200 μl an P.1, P.3, P.5 oder P.1,0, die durch die Fraktionierung einer cytoplasmatischen Fraktion unter Verwendung einer Phosphocellulosesäule erhalten wurden, gegeben und gemischt. Diesen Gemischen wurde ermöglicht, für 30 Minuten mit periodischem Rühren bei Intervallen von 10 Minuten stillzustehen, um Proteine zu binden, die eine E3330-Bindungsfähigkeit für E3330 aufwiesen, das an die Partikel immobilisiert worden war. Das Gemisch wurde zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit 500 μl Puffer D' gewaschen, um so viel wie möglich an nicht spezifischen Bindungssubstanzen zu entfernen.

Danach wurde das gewaschene Pellet dreimal mit Puffer D', der 50 μl 1 M KCl enthielt, eluiert, so dass die Proteine, die eine E3330-Bindungsfähigkeit aufwiesen, dissoziiert und von E3330, das auf den Partikeln immobilisiert war, eluiert wurden. Die Waschlösung und Elutionslösungen wurden bei -80°C gelagert.

(c) Die Detektion der Proteine, die eine E3330-Bindungsfähigkeit aufwiesen, erfolgte durch Elektrophorese auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) unter Verwendung von jeweils 25 μl der ersten, zweiten oder dritten Elutionslösung, die von den E3330-immobilisierten SG-EGDE-Partikeln und E3330-nicht immobilisierten SG-EGDE-Partikeln, die als eine Referenzkontrolle verwendet wurden, erhalten wurde. Die Proteine, die eine E3330-Bindungsfähigkeit aufwiesen, wurden mit mehr als 70%iger Ausbeute in der ersten Elution gewonnen und weiter mit mehr als 90%iger Ausbeute in den ersten und zweiten Elutionen gewonnen. In diesem Experiment wurde 4 \times SDS-Probenfarbstoff (200 mmol Tris-HCl (pH-Wert von 6,8), 500 mM β -Mercaptoethanol (β -ME), 8% SDS, 0,4% BPB) anstelle von 4 \times SDS-Probenpuffer verwendet, um zu verhindern, dass die Elektrophorese aufgrund solcher hoher Konzentration der Salze gestört wird. Das elektrophoresierte Gel wurde einer Silberfärbung unterzogen und die Proteine, die spezifisch an E3330 banden, wurden durch Vergleich mit den Ergebnissen der Referenzkontrolle identifiziert. Als ein Ergebnis wurde in der P.5-Fraktion eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 38 kDa festgestellt, die in der Referenzkontrolle nicht festgestellt wurde, was vermuten lässt, dass das Protein spezifisch an E3330 gebunden war. Hinsichtlich der anderen Fraktionen gab es keine signifikanten Unterschiede in

den Proteinbanden der Elutionslösung mit 1 M KCl im Vergleich mit den Ergebnissen der Referenzkontrolle. Das vorstehende Verfahren wurde wiederholt und schließlich wurden 5 µg an E3330-bindendem Protein erhalten.

Beispiel 7 (Bewertung von spezifischen Bindungsfähigkeiten für E3330)

[0068] Zwei Arten von Experimenten erfolgten, um zu bestätigen, dass das Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 38 kDa in den P.5-Fractionen aus cytoplasmatischen Fractionen und nukleären Extrakten von Jurkat-Zellen spezifisch an E3330 gebunden war.

[0069] Das erste war ein kompetitive Bindung-Inhibitions-Experiment. Wenn nach der Zugabe der P.5-Fraktion der cytoplasmatischen Fraktion (fraktioniert unter Verwendung von Phosphocellulose (200 µl)) zu SG-EGDE-Partikeln freies E3330 bei der gleichen molaren Menge wie derjenigen des NH₂-E3330, das auf den Partikeln immobilisiert war, oder freies NH₂-E3330 bei einer zehnfach größeren molaren Menge als derjenigen des immobilisierten NH₂-E3330 gleichzeitig zugegeben wurde, würde das Protein, das eine spezifische Bindungsfähigkeit für E3330, das auf den Partikeln immobilisiert war, aufwies, an freies E3330 oder NH₂-E3330 gebunden werden, was zu einer niedrigeren Ausbeute bei der Isolierung unter Verwendung der Partikel führt. Da E3330 in Wasser unlöslich war, wurde E3330 in EtOH gelöst, mit Puffer D verdünnt und sodann zu den Partikeln (die Endkonzentration von EtOH betrug 2%) gegeben. Als ein Ergebnis wurde bestätigt, dass die Ausbeute des Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 38 kDa vermindert war, was anzeigt, dass das Protein spezifisch an E3330 gebunden war.

Beispiel 8

[0070] Als Nächstes erfolgte ein Experiment, wobei die Menge an NH₂-E3330, das auf den SG-EGDE-Partikeln immobilisiert war, variiert wurde. In der vorliegenden Untersuchung beträgt die Maximalmenge der immobilisierten E3330-Derivate 0,4 µmol pro 1 mg an SG-EGDE-Partikeln. Unter diesen Bedingungen werden etwa 5 bis 6 Moleküle von E3330-Derivaten auf 1 mm² der Oberfläche der Partikel immobilisiert. Dieses Experiment erfolgte mit einer Menge der immobilisierten E3330-Derivate von 0,2 µmol oder 0,4 µmol pro 1 mg an SG-EGDE-Partikeln. Jedoch werden erfindungsgemäß Mengen an Verbindungen, die auf die Partikel immobilisiert sind, abhängig von den Eigenschaften der immobilisierten Verbindungen, Bedingungen einer Immobilisierung, usw. variiert. Die Mengen werden nicht definiert und im Allgemeinen variieren sie zwischen wenigen Molekülen und 100 Molekülen. Als ein Ergebnis wurde bestätigt, dass sich die Ausbeute des Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 38 kDa erhöhte, wie sich die immobilisierte Menge erhöhte. Die Identifizierung des spezifischen Proteins erfolgte durch Elektrophorese unter Verwendung von SDS-PAGE.

Beispiel 9 (Bestimmung der Aminosäuresequenz des E3330-bindenden Proteins)

[0071] Das erhaltene E3330-bindende Protein wurde zweimal gegen einen Liter Puffer D für 2,5 Stunden bei 4°C dialysiert, um das KCl zu entfernen, das als eine Elutionslösung mit einer solch hohen Konzentration wie 1,0 M KCl verwendet wurde. Um die Probe zu konzentrieren, wurde nach Abschluss der Dialyse die dialysierte Probe in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (BECKMAN: Nr. 331372) überführt, zu dem Trichloressigsäure (TCA: MERCK) und Desoxycholsäure (DOC: Sigma) gegeben wurde, so dass die Endkonzentrationen 10% bzw. 0,8 mg/ml betragen. Das Gemisch wurde gut gerührt und ihm wurde ermöglicht, 30 Minuten auf Eis stillzustehen. Sodann wurde die gemischte Probe bei 28 kUpM 15 Minuten bei 4°C (BECKMAN: Rotor SW 41 Ti) ultrazentrifugiert. Das erhaltene Präzipitat wurde in 10 ml Aceton gelöst. Nach 10-minütigem Stillstehen bei Raumtemperatur wurde die Lösung wieder ultrazentrifugiert. Dem erhaltenen Präzipitat wurde ermöglicht, für 10 Minuten auf Eis stillzustehen, um zu trocknen. Folglich wurde die Probe einkonzentriert.

[0072] Schließlich wurde die konzentrierte Probe in 50 µl 1 × SDS-Probenfarbstoff gelöst und in ein Probenröhrchen (Eppendorf: Nr. 0030 102.002) überführt. In diesem Verfahren wurde die verbleibende Probe in dem Ultrazentrifugationsröhrchen mit zusätzlichen 10 µl 1 × SDS-Probenfarbstoff gespült und gesammelt, um die verbleibende Probe zu gewinnen.

[0073] Da TCA und DOC in der Probe verblieben, wurden 3 µl 1 M Tris-HCl (pH-Wert von 7,9) für den Zweck einer Neutralisation zugegeben. Sodann wurde die Probe bei -80°C gelagert.

[0074] Um die Aminosäuresequenz des E3330-bindenden Proteins zu analysieren, wurde das Protein einer Peptidfragmentierung unterzogen. Zuerst wurde die Probe mit vorgefärbtem SDS-PAGE-Standard (BIO-RAD) auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und das Protein wurde auf eine

PVDF-Membran (MILLIPORE: Immobilon-Transfermembran) aus dem Polyacrylamidgel unter Verwendung eines Mini-Transblott-Modulkits (BIO-RAD) überführt. Vor dem Blotten wurde die PVDF-Membran in Methanol 15 Sekunden eingeweicht und danach in einer Blott-Pufferlösung (10 mM CAPS-NaOH (pH-Wert von 11), 10% Methanol) für mehr als 5 Minuten eingeweicht. Die Blottvorrichtung wurde auf der Anodenseite nach unten platziert und zwei Lagen an Faserkissen, zwei Lagen an 3 MM-Papier, die PVDF-Membran, das Gel, zwei Lagen an 3 MM-Papier und zwei Lagen an Faserkissen wurden in die Blottvorrichtung in dieser Reihenfolge gelegt, wobei Blasen vermieden wurden. Die Vorrichtung wurde in ein Elektrophoresebad, das mit einer Blott-Pufferlösung gefüllt war, platziert. Das Bad wurde mit Eis abgekühlt und 0,3 A an elektrischer Stromstärke wurden 30 Minuten angelegt, um das Protein auf die PVDF-Membran zu blotten.

[0075] In dem Fall, in dem die Proteine, die auf die Membran geblottet wurden, enzymatisch verdaut wurden, wurde Lysil-Endopeptidase (Wako Pure Chemicals) als das Verdauenzym verwendet. Als eine Pufferlösung für die Verdaureaktion wurde 20 mM Tris-HCl (pH-Wert von 8,8) mit 8% Acetonitril verwendet. Die Menge des Enzyms war ein Zehntel des Proteins für den Verdau (g/g). Zuerst wurde eine Hälfte der Menge des Enzyms zugegeben, gefolgt von Rühren mit Schütteln für mehrere Sekunden. Sodann wurde die andere Hälfte des Enzyms zu dem Vorstehenden gegeben, gefolgt von Rühren unter Schütteln bei 37°C für etwa 24 Stunden unter Verhinderung einer Lichttransmission. Nach Abschluss der Reaktion wurde die verdaute Flüssigkeit vorsichtig gesammelt, wobei beachtet wurde, dass die PVDF-Membran nicht eingesaugt wurde. Die verbliebene PVDF-Membran wurde mit 100 µl 8% Acetonitril gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde in der gleichen Weise wie vorstehend beschrieben gewonnen und gesammelt. Diese Flüssigkeiten wurden bei 15.000 g 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die kontaminierten PVDF-Membranstücke vollständig abzutrennen und diese zu entfernen. In dem Fall, in dem der Überstand direkt einer Flüssigchromatographie mit hoher Leistung (HPLC) unterzogen wird, werden hochgradig hydrophile Peptide in einem Durchtreten durch eine Fraktion eluiert. Folglich wurde der Überstand durch Dekompression konzentriert, so dass die Konzentration an Acetonitril vermindert wurde. Zu dem konzentrierten Überstand wurde 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) gegeben, so dass das Volumen 205 µl betrug, das auf eine HPLC mit reverser Phase (ABI: Modell 130A) aufgetragen wurde. Eine C8-Säule (PERKIN ELMER: 0711-0056) wurde verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 50 µl/min und die Säulentemperatur betrug 35°C. Eine Elution erfolgte wie folgt: Die mobile Phase war 0,1% TFA und der Konzentrationsgradient an Acetonitril in der mobilen Phase betrug 0% für die ersten 5 Minuten, 0 bis 35% für die nächsten 30 Minuten und 35 bis 70% für die letzten 20 Minuten. Ein Überwachen des Proteins erfolgte unter Verwendung von Ultraviolettabsorption bei einer Wellenlänge von 215 nm. Jede eluierte Peptidfraktion wurde bei jedem Zeitpunkt gesammelt und bei -80°C gelagert.

[0076] Ein Gasphasen-Proteinsequenziergerät (ABI: Modell 477A-Proteinsequenziergerät) wurde für eine Aminosäuresequenzanalyse der Peptide verwendet. Polybrene (ABI) wurde als der Träger verwendet. Als ein Ergebnis wurden drei Aminosäuresequenzen von Peptiden bestimmt. Die erhaltenen Sequenzen waren GLD-WVK (SEQ ID NO: 1)/AAGEGPALYEDPPD (SEQ ID NO: 2)/GAVAEDGDEL (SEQ ID NO: 3). Diese Aminosäuresequenzen wurden unter Verwendung eines Computers analysiert und es wurde bestimmt, dass sie mit den Aminosäuresequenzen der N-terminalen Flankierungsregion des Redoxproteins Ref-1 vollständig identisch sind, das bei Oxidations-Reduktions-Reaktionen beteiligt ist. Es wurde berichtet, dass Ref-1 318 Aminosäurereste mit einem Molekulargewicht von 38 kDa aufweist. Das Protein, das durch die Isolierung und Aufreinigung in diesem Arbeitsbeispiel erhalten wurde, weist das gleiche Molekulargewicht auf. Folglich ist das E3330-bindende Protein wahrscheinlich identisch mit Ref-1. Die Aminosäuresequenz von Ref-1 ist wie folgt (SEQ ID NO: 4: Länge der Sequenz: 318 Aminosäuren):

```

M P K R G K K G A V A E D G D E L R T E P E A K K S K T A A
1           10           20           30

K K N D K E A A G E G P A L Y E D F P D Q K T S P S G K P A
31          40          50          60
T L K I C S W N V D G L R A W I K K K G L D W V K E E A P D
61          70          80          90

I L C L Q E T K C S E N K L P A E L Q E L P Q L S H Q Y W S
81          100         110         120

A P S D K E G Y S Q V G L L S R Q C P L K V S Y G I G D E E
121         130         140         150

H D Q E G R V I V A E F D S F V L V T A Y V P N A G R G L V
151         160         170         180

R L E Y R Q R W D E A F R K F L K G L A S R K P L V L C G D
181         190         200         210

L N V A H E E I D L R N P K G N K K N A G F T P Q E R Q O F
211         220         230         240

G E L L Q A V P L A D S F R H L Y P N T P Y A Y T F W T Y M
241         250         260         270

M N A R S K N V G W R L D Y F L L S H S L L P A L C D S K I
271         280         290         300

R S K A L G S D H C P I T L Y L A L
301         310         318

```

Beispiel 10 (Herstellung des E3330-bindenden Proteins durch genetische Rekombination)

(a) Die Verfahren für eine Herstellung von cDNA-Klonen des E3330-bindenden Proteins und eine Analyse der Bindungsaktivität des Proteins, das durch Genexpression von rekombinanten cDNA-Klonen in *Escherichia coli* (*E. coli*) gegen E3330 hergestellt wurde, erfolgten wie folgt.

Basierend auf den bestimmten Aminosäuresequenzen wird der E3330-bindende Faktor am wahrscheinlichsten als Ref-1 betrachtet. Folglich wurden cDNA-Klone von Ref-1 hergestellt und die rekombinanten cDNA-Klone wurden in *E. coli* exprimiert, um rekombinante Proteine zu erhalten. Sodann wurde die Bindungs-

aktivität des Proteins gegenüber E3330 untersucht.

(b) Zuerst wurde RNA hergestellt. Wenn RNA hergestellt wurde, wurden Ultrazentrifugationsröhrchen (BECKMAN: 331372), ein Becher (BECKMAN: für SW 41Ti) und eine Becherkappe (BECKMAN: für SW 41Ti) vorher in 2%iger Absolve-Lösung (DUPONT, 20 ml Absolve wurden mit destilliertem Wasser auf 1000 ml verdünnt) an dem Tag vor der Herstellung eingeweicht, um kontaminierende RNase-Aktivität so weit wie möglich zu entfernen. Sie wurden gründlich mit destilliertem Wasser gerade vor einer Verwendung gespült. Das Kultivierungsmedium von Jurkat-Zellen, die in bis zu 4,2 Litern ($7,6 \times 10^9$ Zellen) kultiviert wurden, wurde in 500 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 500 g 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um die Zellen zu gewinnen. Die gewonnenen Zellen wurden zweimal mit PBS(-) gewaschen. Die Zentrifugationsbedingungen zum Waschen waren 700 g für 5 Minuten bei 4°C unter Verwendung von 50 ml-Zentrifugationsröhrchen. An diesem Zeitpunkt wurde das gepackte Zellvolumen (PCV) gleichzeitig gemessen.

Diese Zellen wurden gründlich in 10-fachem PCV an Guanidiniumlösung (4 M Guanidiniumthiocyanat, 0,1 M Tris-HCl mit einem pH-Wert von 7,5, 1% (v/v) β -ME) suspendiert. Die Suspension wurde durch eine Injektionsnadel von 18G (1,2 mm) (TERUMO: NN-1838R) zwanzigmal und weiter durch eine Injektionsnadel von 25G (0,5 mm) (TERUMO: SS-20ES) geleitet, um DNA-Stränge in Fragmente zu schneiden. Zu der sich ergebenden Suspension wurde 10%iges N-Lauroylsarcosin gegeben und gründlich gerührt, so dass die Endkonzentration an Lauroylsarcosin 0,5% betrug. Sodann wurden 3 ml jedes Aliquots des Gemisches vorsichtig über die Phase von 9 ml CsCl/EDTA-Lösung (5,7 M CsCl, 0,01 M EDTA mit einem pH-Wert von 7,5), das vorher in ein Ultrazentrifugationsröhrchen geschüttet worden war, gelegt. Die Ultrazentrifugationsröhrchen wurden in den Becher gelegt und die Becherkappe wurde angezogen. Sodann wurde der Becher in einem Rotor (SW 41Ti) befestigt und bei 32 kUpM 24 Stunden bei 20°C ultrazentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig gründlich verworfen und der obere Teil des Ultrazentrifugationsröhrchens wurde mit einer Schere abgeschnitten. Das erhaltene Präzipitat wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen. Sodann wurde das Pellet dreimal mit 150 μ l TE/SDS-Lösung (10 mM Tris-HCl mit einem pH-Wert von 7,6, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) gespült, um das Präzipitat in TE/SDS-Lösung zu lösen. Die Lösung wurde zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert, gefolgt von einer Zugabe von 900 μ l Ethanol und 30 μ l 3 M Natriumacetat (pH-Wert von 5,2). Das Gemisch wurde bei -80°C bis zu einer Verwendung gelagert. Wenn die Konzentration gemessen wurde, wurde ein Aliquot der vorstehenden Stammlösung herausgenommen und zentrifugiert (15.000 g für 5 Minuten bei 4°C). Nach Waschen mit 70%igem Ethanol (15.000 g für 5 Minuten bei 4°C) wurde das Präzipitat in Wasser gelöst, das mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt war (DEPC wurde zu destilliertem Wasser gegeben, so dass die Endkonzentration an DEPC 0,1% betrug, gefolgt von Rühren, Stehen lassen für etwa 24 Stunden und Autoklavieren. Das vorbehandelte Wasser wurde bei Raumtemperatur gelagert). Die Absorption der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Verwendung eines DU-64-Spektrophotometers gemessen und die Menge an RNA wurde abgeschätzt.

(c) Als Nächstes wurde komplementäre einzelsträngige cDNA durch reverse Transkription hergestellt. Ein Aliquot an RNA (10 μ g), das wie in dem vorstehenden Verfahren erhalten wurde, wurde herausgenommen und zentrifugiert (15.000 g für 5 Minuten bei 4°C). Das erhaltene Präzipitat wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen (15.000 g für 5 Minuten bei 4°C) und in 9,8 μ l DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Zu der Lösung wurden 160 ng 0,5 μ g/ μ l Oligo(dT)¹⁵-Primer (Promega: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3') gegeben und bei 70°C 5 Minuten erhitzt. Nach dem 5-minütigen Erhitzen wurde die Probe sofort auf Eis gelegt und 28 μ l eines vorher eisgekühlten Reaktionspuffers (ein Gemisch von reverse Transkriptase-Zusätzen, das heißt 8 μ l 5-fach RT-Puffer, 4 μ l 0,1 M DTT, 2 μ l 10 mM dNTPs und 13 μ l destilliertes Wasser), 1 μ l Ribonukleaseinhibitor (TaKaRa: Ribonukleaseinhibitor) und 2 μ l reverse Transkriptase (GIBCO BRL: Super ScriptTM RNase H-reverse Transkriptase) wurden zu der Probe in dieser Reihenfolge gegeben. Sodann wurde die gemischte Probe sofort einer einstündigen Reaktion bei 37°C unterzogen, um die komplementäre einzelsträngige cDNA durch reverse Transkription zu verlängern. An dem Ende der Reaktion wurde die Probe bei 95°C 5 Minuten erhitzt, um die Reaktion durch Hitzeblockierung zu stoppen. Die erhaltene komplementäre einzelsträngige cDNA wurde bei -30°C bis zu einer Verwendung gelagert.

(d) Danach wurden Oligonukleotide für den Zweck einer Amplifikation der Ref-1-Translationsregion durch ein Lang-PCR-Verfahren synthetisiert. Jede Basensequenz der synthetisierten Oligonukleotide ist nachstehend gezeigt. Jedes Oligonukleotid weist eine individuelle Verdauregion auf, die durch das Restriktionsenzym erkannt wird, von dem jedes Oligonukleotid seinen Namen hat.

5'-Ref-1-XhoI-Primer: 5'-GTCTCTCGAGATGCCGAAGCGTGGA AAAAG-3' (SEQ ID NO: 5)

3'-Ref-1-BamHI-Primer: 5'-ATGCGGATCCTTACAGTGCTAGGTATAGGGT-3' (SEQ ID NO: 6)

Die synthetisierten Oligonukleotide wurden bei 55°C 8 Stunden erhitzt, um geschützt zu werden. Die geschützten Oligonukleotide wurden in Aliquots unterteilt, unter vermindertem Druck getrocknet und in verdünntem (1 in 10) TE-Puffer (10 mM Tris-HCl mit einem pH-Wert von 7,9, 1 mM EDTA) gelöst. Eine PCR erfolgte mit den vorstehenden zwei Arten an Oligonukleotiden, wobei die hergestellte einzelsträngige cDNA als Matrize verwendet wurde. Ein PCR-Kit (XL PCR-Kit: PERKIN ELMER) wurde für die PCR-Verfahren verwendet. Es gibt zwei Arten an Reaktionslösungen (untere Schicht und obere Schicht). Die untere Schicht

enthält 40 pmol von jeweils 5'-terminalem Primer und 3'-terminalem Primer, dNTPs bei einer Endkonzentration von 0,8 mM, $Mg(OAc)_2$ bei einer Endkonzentration von 1,4 mM und 12 μl 3,3-fach XL-Puffer II. Das Endvolumen wurde auf 40 μl eingestellt. Auf der anderen Seite enthält die obere Schicht 1 μl der einzelsträngigen cDNA-Matrizen, rTth DNA-Polymerase, XL 4U und 18 μl 3,3-fach XL-Puffer II. Das Endvolumen wurde auf 60 μl eingestellt.

Zuerst wurde GEM 100-WAX (PERKIN ELMER) auf die untere Schicht des Probenröhrchens gelegt und bei 80°C 5 Minuten unter Verwendung einer Genamplifikationsvorrichtung erhitzt, gefolgt von Abkühlen bei 25°C für eine Minute, so dass sich das Wachs auf der unteren Schicht verfestigte. Darauf wurde die obere Schicht platziert und der Reaktion unter Verwendung einer Genamplifikationsvorrichtung gemäß dem nachstehenden Schema unterzogen: 94°C für eine Minute, 16 Zyklen (94°C für 15 Sekunden, 60°C für 10 Minuten), 12 Zyklen (94°C für 15 Sekunden, 60°C für 10 Minuten (verlängert durch 15 Sekunden für jeden Zyklus)) und 72°C für 10 Minuten. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Wachs, das sich auf der oberen Schicht verfestigte, durchbohrt und die Reaktionslösung wurde überführt, gefolgt von einer Chloroformextraktion und einer Ethanolpräzipitation. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden durch XhoI und BamHI (TOYOBO) verdaut und direkt einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Ein Teil des Agarosegels, das die DNA-Fragmente enthielt, wurde isoliert, gefolgt von einer Phenol/Chloroformextraktion und Ethanolpräzipitation, um die DNA-Fragmente aufzureinigen.

(e) Als der E. coli-Expressionsvektor wurde pET14b (Novagen) verwendet. Die in dem vorstehenden Verfahren aufgereinigten DNA-Fragmente wurden mit den isolierten und aufgereinigten pET14b-XhoI/BamHI-verdauten Fragmenten ligiert, um die E. coli-Expressionsplasmide (pET/Ref) zu konstruieren, die das rekombinante Ref-1-Wildtyp-Protein exprimieren würden.

Die E. coli-Bakterien, die pET14b-abstammende E. coli-Expressionsplasmide aufweisen, exprimieren ein His-Tag-fusioniertes rekombinantes Protein, dessen N-terminale Region ein Peptid ist, das aus sechs Histidinen besteht.

Beispiel 11 (Bestätigung der Bindungsfähigkeit von Ref-1 gegen E3330)

(a) Die Bindungsfähigkeit des rekombinanten Proteins, das in dem vorstehenden Verfahren erhalten wurde, gegenüber E3330 wurde unter Verwendung von E3330-immobilisierten Partikeln untersucht. Als ein Ergebnis wurde bestätigt, dass das rekombinante Ref-1-Protein spezifisch an E3330 band. Ferner wurde bestätigt, dass E3330 an Ref-1 in einem Far-Western-Verfahren unter Verwendung von ¹⁴C-markiertem E3330 band. Folglich wird Ref-1 als ein intrazellulärer Rezeptor für E3330 angesehen.

(b) Ref-1 besteht aus einer Domäne, die eine Redox-Aktivität aufweist, in seiner N-terminalen Region und aus einer weiteren Domäne, die eine AP-Nukleaseaktivität aufweist, die apurinische/aprimidinische einzelsträngige DNA trennt und Nicks einbringt, in seiner C-terminalen Region. Folglich wurde in dem nächsten Experiment untersucht, ob E3330 diese Aktivitäten inhibieren würde oder nicht.

Zuerst, hinsichtlich einer AP-Nukleaseaktivität, wurde das Plasmid pBluescript SK + DNA (50 μg) mit 50 mM Natriumcitrat (pH-Wert von 3,5) bei 60°C 15 Minuten behandelt, gefolgt von einer Dialyse in 50 mM Tris-HCl (pH-Wert von 7,4) bei 4°C für etwa 24 Stunden. Diese AP-Plasmid-DNA weist eine superverdichtete zirkuläre DNA-Struktur auf. Diese DNA wurde in Nukleasepufferlösung (10 mM Tris-HCl (pH-Wert von 8,0), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0,01% NP-40) suspendiert, zu der das rekombinante Ref-1 gegeben wurde, was zu einem Einbringen von Nicks und einer offenen zirkulären DNA-Struktur führte. Jedoch wurde, wie in **Fig. 3** gezeigt, die AP-Nukleaseaktivität des Ref-1 durch E3330 nicht inhibiert.

(c) Als Nächstes wurden Wirkungen von Ref-1 auf die Redox-Aktivität untersucht.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig. 4** gezeigt. Vor dem Durchführen dieser Untersuchung sind einige Überlegungen zu treffen. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B weist viele Cystinreste in seiner Aminosäuresequenz auf. Es gibt zwei Zustände. Einer ist ein oxidiertes Zustand, indem diese Cystinreste gegenseitig über eine S-S-Bindung gebunden sind. Der andere ist ein reduzierter Zustand, in dem sie einzeln mit einer SH-Gruppe vorliegen. Folglich wurde NF- κ B mit Dithiothreitol (DTT) behandelt, das als ein Reduktionsmittel bekannt ist, um NF- κ B in den reduzierten Zustand umzuwandeln. Als ein Ergebnis wurde die DNA-Bindungsfähigkeit des reduzierten NF- κ B erhöht, was durch einen Gel-Shift-Test bestätigt wurde. Ref-1, das Redox-Aktivität aufweist, wurde zu NF- κ B, das teilweise aus Jurkat-Zellen aufgereinigt wurde, gegeben, was zu einer Zunahme der DNA-Bindungsfähigkeit führte, was durch einen Gel-Shift-Test bestätigt wurde. Ferner wurde die Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B durch Ref-1 durch die Zugabe von E3330 zu dem Reaktionsgemisch vermindert. Jedoch inhibierte E3330 die Zunahme der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B durch DTT nicht. Folglich wurde aufgedeckt, dass E3330 spezifisch die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B inhibiert.

(d) NF- κ B ist ein Heterodimer, das aus zwei Untereinheiten (p65 und p50) besteht. Die Molekulargewichte dieser zwei Untereinheiten p65 und p50 betragen 65 kDa bzw. 50 kDa. Die His-tag-rekombinanten Proteine dieser p65- und p50-Untereinheiten wurden unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems her-

gestellt. Sodann wurde durch Gel-Shift-Test untersucht, ob E3330 Wirkungen auf p65 oder auf p50 aufwies. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig. 5** gezeigt. Die DNA-Bindungs-fähigkeit des p65/p65-Homodimers unter reduzierenden Bedingungen durch die Zugabe von DTT wurde signifikant erhöht, aber die Erhöhung wurde nicht durch die Zugabe von Ref-1 beobachtet. Auf der anderen Seite wurde die DNA-Bindungs-fähigkeit des p50/p50-Homodimers und des p65/p50-Heterodimers durch die Zugabe von entweder DTT oder rekombinantem Ref-1 erhöht. Folglich wurde aufgedeckt, dass Ref-1 Wirkungen auf p50, eine der Untereinheiten von NF- κ B, aufweist. Die Erhöhung der DNA-Bindungs-fähigkeit des p50/p50-Homodimers oder des p65/p50-Heterodimers durch die Zugabe von Ref-1 wurde durch die Zugabe von E3330 vermindert. Da NF- κ B eine spezifische Basensequenz erkennt und an die spezifische DNA-Sequenz bindet, ist ein Binden an DNA das Minimalerfordernis für NF- κ B, um als ein Transkriptionsfaktor zu fungieren. Dieser Bindungsschritt wird durch Ref-1 reguliert, was anzeigt, dass Ref-1 mindestens ein intrazellulärer Faktor ist, der den Transkriptionsfaktor NF- κ B hinsichtlich des DNA-Bindungsschritts aktiviert. Außerdem wurde aufgedeckt, dass E3330 die Aktivierung, die durch Ref-1 induziert wird, inhibiert.

(e) Zusätzlich erfolgte ein GST-Pull-down-Test, um zu bestätigen, dass Ref-1 spezifisch an die p50-Untereinheit von NF- κ B band. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Ref-1 tatsächlich an p50 von GST-tag (GST-p50) bindet, wie in **Fig. 6** angegeben.

Beispiel 12 (Herstellung von mutierten rekombinanten Proteinen von Ref-1)

(a)

[0077] Um zu bestätigen, dass Ref-1 an E3330 band, wurde eine Reihe von verschiedenen Mengen an N-terminalen und C-terminalen Flankierungsregionen von Ref-1-Deletionsmutantenstämmen unter Verwendung von pET/Ref hergestellt, wie nachstehend beschrieben. Sodann wurden diese rekombinanten Proteine in *E. coli* exprimiert und unter Verwendung einer Nickelsäule und einer Glutathionsäule aufgereinigt, um zu untersuchen, ob sie an E3330-immobilisierte Partikel banden oder nicht. Diese rekombinanten Mutationsproteine von Ref-1, einschließlich eines Wildtyps, sind schematisch in **Fig. 7** gezeigt.

(b) Herstellung von pET/RefdC76, pET/RefdC91, pET/RefdC163 und pET/RefdC182

[0078] Das hergestellte pET/Ref, 10 μ g, wurde mit BamHI und AatII (TOYOBO) verdaut, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Diese pET/Ref BamHI/AatII-verdauten Fragmente wurden in 100 μ l einer Pufferlösung gelöst, die dadurch hergestellt wurde, dass 10fach ExoIII-Puffer (500 mM Tris-HCl (pH-Wert von 8), 50 mM MgCl₂, 100 mM β -ME) für Exonuklease III (ExoIII: TaKaRa) (1 in 10) verdünnt wurde. Anschließend wurden 180 U an ExoIII zu der vorstehenden Lösung gegeben, gefolgt von Inkubation bei 25°C für 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 oder 60 Minuten, um die pET/Ref BamHI/AatII-verdauten Fragmente in 3'- zu 5'-Richtung abzubauen. Da ExoIII durch die Zugabe von Zn²⁺ inhibiert wird, wurden 100 μ l der Pufferlösung, die dadurch hergestellt wurde, dass 10fach Mungbohne-Puffer (300 mM CH₃COONa (pH-Wert von 4,6), 1 M NaCl, 10 mM (CH₃COO)₂Zn, 50% Glycerin) für Mungbohne-Nuklease (TaKaRa) (1 in 10) verdünnt wurde, jeweils zu den Reaktionsgemischen gegeben, um den Abbau zu stoppen. Die sich ergebenden Reaktionsgemische wurden bei 65°C 5 Minuten inkubiert, um das Enzym vollständig zu inaktivieren. Danach wurden 50 U Mungbohne-Nuklease zu den vorstehenden Lösungen gegeben, gefolgt von Inkubation bei 37°C für 30 Minuten, um Teile an einzelsträngiger DNA durch ExoIII abzubauen. Sodann wurden die sich ergebenden Lösungen einer Extraktion mit Phenol/Chloroform und einer Präzipitation mit Ethanol unterzogen. Die DNA-Termini wurden durch Klenow-Fragment (terminates Glätten von DNA) repariert, um die DNA-Termini vollständig glatt zu machen. Sodann wurden die sich ergebenden Lösungen einer Extraktion mit Phenol/Chloroform und einer Präzipitation mit Ethanol unterzogen, gefolgt von einem Verdau mit XhoI. Durch die vorstehenden Verfahren wurden Translationsregionen von Ref-1 mit Deletionen von verschiedener Länge in seiner C-terminaten Region erhalten, wobei der N-Terminus der XhoI-verdaute Terminus war und der C-Terminus der glatte Terminus war.

[0079] Drei Fragmente, das heißt, eines dieser verschiedenen DNA-Fragmente, das isolierte und aufgereinigte pET14b XhoI/BamHI-verdaute Fragment und ein BamHI-Linker, wurden aneinander ligiert, um Plasmide zu konstruieren, die rekombinante Ref-1-Deletionsmutanten in *E. coli* exprimieren. Die Basensequenzen des BamHI-Linkers sind nachstehend gezeigt. Jeder Leserahmen des Linkers wurde so entworfen, dass er ein Stopp-Codon enthält. Das Herstellungsverfahren für den Linker ist das gleiche wie das vorstehende Verfahren, durch das verschiedene Arten von doppelsträngiger DNA mit Ligationssequenzen für jeden Transkriptionsfaktor hergestellt wurden.

BamHI-Linker: 5'-TAACTAACTAG-3' (SEQ ID NO: 7)

3'-ATTGATTGATCCTAG-5' (SEQ ID NO: 8)

[0080] Namen für Plasmide, die rekombinante Ref-1-Deletionsmutanten in *E. coli* exprimieren, wurden aus der Anzahl von deletierten Aminosäureresten von deren C-Termini nach der Translation abgeleitet. Die Namen sind nachstehend in numerischer Reihenfolge beschrieben:

pET/RefdC76 (76 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert),

pET/RefdC91 (91 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert),

pET/RefdC163 (163 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert), pET/RefdC182 (182 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert).

(c) Herstellung von pET/RefdC230, pET/RefdC247 und pET/RefdC278

[0081] Unter Verwendung des gleichen Verfahrens wie vorstehend beschrieben wurden pET/RefdC230 (230 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert), pET/RefdC247 (247 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert) und pET/RefdC278 (278 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert) konstruiert.

(d) Herstellung von pET/RefdN41, pET/RefdN81, pET/RefdN121 und pET/RefdN161

[0082] Eine Reihe von diesen rekombinanten Ref-1-N-terminalen Deletionsmutanten, die in *E. coli* exprimiert werden, wurden durch ein Lang-PCR-Verfahren unter Verwendung von synthetisierten Oligonukleotiden amplifiziert. Jede Basensequenz der synthetisierten Oligonukleotide ist nachstehend gezeigt. Jedes Oligonukleotid weist eine einzelne verdaubare Region auf, die durch das Restriktionsenzym erkannt wird, von dem jedes Oligonukleotid seinen Namen hat.

5' RefdN41 XhoI-Primer: 5'-ATGCCTCGAGATGCCAGCCCTGTATGAGGACC-3' (SEQ ID NO: 9)

5' RefdN81 XhoI-Primer: 5'-ATGCCTCGAGATGGATTGGGTAAAGGAAGAAGCC-3' (SEQ ID NO: 10)

5' RefdN121 XhoI-Primer: 5'-ATGCCTCGAGATGCCTTCGGACAAGGAAGGGT-3' (SEQ ID NO: 11)

5' RefdN 161 XhoI-Primer: 5'-ATGCCTCGAGATGTTTGACTCGTTTGTGCTGGTA-3' (SEQ ID NO: 12)

[0083] Die synthetisierten Oligonukleotide wurden bei 55°C 8 Stunden für ein Entschützen erhitzt. Die entschützten Oligonukleotide wurden in Aliquots aufgeteilt, unter vermindertem Druck getrocknet und verdünntem (1 in 10) TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH-Wert von 7,9), 1 mM EDTA) gelöst.

[0084] Eine der vier vorstehenden Arten an Oligonukleotiden und ein 3'-Ref-1 BamHI-Primer wurden vereinigt und die nachstehenden Verfahren waren die gleichen, wie vorher für ein Durchführen einer PCR beschrieben. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden einzeln durch XhoI und BamHI (TOYOBO) verdaut und direkt einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Ein Teil des Agarosegels, das die DNA-Fragmente enthielt, wurde isoliert, gefolgt von einer Phenol/Chloroformextraktion und einer Ethanolpräzipitation, um die DNA-Fragmente aufzureinigen. Eines dieser verschiedenen DNA-Fragmente, das isolierte und aufgereinigte pET14b XhoI/BamHI-verdaute Fragment und ein BamHI-Linker wurden zusammen ligiert, um pET/RefdN41 (41 Aminosäurereste von dem N-Terminus wurden deletiert), pET/RefdN81 (81 Aminosäurereste von dem N-Terminus wurden deletiert), pET/RefdN121 (121 Aminosäurereste von dem N-Terminus wurden deletiert) bzw. pET/RefdN161 (161 Aminosäurereste von dem N-Terminus wurden deletiert) zu konstruieren.

(e) Herstellung von pET/RefdN41dC163, pET/RefdN41dC182 und pET/RefdN41dC213

[0085] Zuerst wurde pET/RefdN41 mit PvuII und XhoI verdaut und einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Ein Teil des Agarosegels, das nur die translatierte Region enthielt, wurde isoliert. Auf der anderen Seite wurden pET/RefdC163, pET/RefdC182 und pET/RefdC213 mit PvuII und BamHI verdaut und einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Jeder Teil des Agarosegels, das nur die translatierte Region enthielt, wurde einzeln isoliert und präpariert. Die gleichen Verfahren, wie vorstehend beschrieben, erfolgten, um pET/RefdN41dC163 (41 Aminosäurereste von dem N-Terminus wurden deletiert und 163 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert), pET/RefdN41dC182 (41 Aminosäurereste von dem N-Terminus wurden deletiert und 182 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert) bzw. pET/RefdN41dC213 (41 Aminosäurereste von dem N-Terminus wurden deletiert und 213 Aminosäurereste von dem C-Terminus wurden deletiert) zu konstruieren.

(f) Herstellung von pET/RefdN51dC182, pET/RefdN61dC182, pET/RefdN71dC182, pET/RefdN81dC163 und pET/RefdN81dC182

[0086] Die gleichen Verfahren, wie vorstehend beschrieben, erfolgten, um jede Deletionsmutante zu konstruieren.

Beispiel 13 (Bindungstest für rekombinante Mutantenproteine von Ref-1, die in *E. coli* exprimiert werden, gegenüber E3330)

[0087] Zuerst wurden rekombinante Wildtypproteine von Ref-1 und rekombinante Mutantenproteine von Ref-1 in *E. coli* exprimiert und unter Verwendung von His-Bindungsharz oder Glutathion-Sepharose 4B aufgereinigt. Sodann wurde jedes aufgereinigte Protein einer SDS-PAGE unterzogen und unter Verwendung von Rapid Stain CBB angefärbt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den **Fig. 8** und **9** gezeigt. Eine Reihe von C-terminalen Deletionsmutanten sind in **Fig. 8** gezeigt. Eine Reihe von N-terminalen Deletionsmutanten und eine Reihe von beidseitigen C-terminalen und N-terminalen Deletionsmutanten sind in **Fig. 9** gezeigt. In **Fig. 8** wurden Spuren von Spur 1 bis Spur 9 mit Wildtyp (WT), dC50, dC76, dC91, dC157, dC163, dC182, dC213 und GST-dC213 in dieser Reihenfolge beladen, wenn eine Elektrophorese erfolgte. Deren Molekulargewichte betragen etwa 40 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 28 kDa, 26 kDa, 23 kDa, 19 kDa bzw. 42 kDa. In **Fig. 9** wurden Spuren von Spur 1 bis Spur 9 mit Wildtyp (WT), dN41, dN81, dN121, dN161, GST-dN81dC182, GSTdN41dC213, GSTdN81dC213 und GST in dieser Reihenfolge beladen, wenn eine Elektrophorese erfolgte. Deren Molekulargewichte betragen etwa 40 kDa, 36 kDa, 32 kDa, 28 kDa, 22 kDa, 36 kDa (eine Bande, die gerade linksseitig von Spur 7 auftaucht), 37 kDa, 33 kDa bzw. 28 kDa.

Beispiel 14 (Identifizierung der E3330-Bindungsdomäne unter Verwendung von rekombinanten Mutationsproteinen von Ref-1)

[0088] Welche Arten von Ref-1-Deletionsmutantenproteinen an E3330 gebunden würden, wurde untersucht, um die E3330-Bindungsdomäne zu identifizieren. Folglich erfolgten Bindungstests unter Verwendung von E3330-immobilisierten SG-Partikeln. Das experimentelle Schema war das Gleiche, wie in **Fig. 2** dargestellt. Hinsichtlich des Elutionsverfahrens erfolgten zwei Arten von Verfahren in diesem Experiment. In einem Verfahren wurden 2 µg jedes aufgereinigten Ref-1-Deletionsmutantenproteins mit E3330-immobilisierten SG-Partikeln gemischt, gefolgt von Stehen lassen für 30 Minuten in einem Eiswasserbad. Das Protein, das an die Partikel band, wurde mit einem Elutionspuffer, der 1 M KCl enthielt, eluiert. Sodann wurde jedes Eluat einer 12,5%igen SDS-PAGE unterzogen und Proteine wurden durch Silberfärbung detektiert. In dem anderen Verfahren wurden 2 µg jedes aufgereinigten Ref-1-Deletionsmutantenproteins mit E3330-immobilisierten SG-Partikeln gemischt, gefolgt von Stehen lassen für 30 Minuten in einem Eiswasserbad. 1 × SDS-Proben-Farbstoff wurde zu den Partikeln gegeben, an die jede Art von Proteinen gebunden war. Die sich ergebende Suspension wurde direkt aufgekocht, so dass das Protein, das an die Partikel band, eluiert wurde. Sodann wurde jedes Eluat einer 12,5%igen SDS-PAGE unterzogen und Proteine wurden durch CBB-Färben detektiert. Als ein Ergebnis wurde nahegelegt, dass die nachstehenden rekombinanten Deletionsmutantenproteine von Ref-1 an E3330-immobilisierten SG-Partikeln gebunden waren. In dem Verfahren, das einen Elutionspuffer, der 1 M KCl enthielt, verwendet wurde, waren die bindenden Proteine Wildtyp (etwa 40 kDa), dC76 (etwa 36 kDa), dC91 (etwa 35 kDa), dC163 (etwa 26 kDa), dC182 (etwa 23 kDa), dC213 (etwa 19 kDa) und GSTdC213 (etwa 42 kDa). In dem anderen Verfahren, das ein direktes Aufkochverfahren verwendete, waren die bindenden Proteine Wildtyp (etwa 40 kDa), dN41 (etwa 36 kDa), dN81 (etwa 32 kDa), GST-dN81dC182 (etwa 36 kDa) und GSTdN81dC213 (etwa 33 kDa). Die Ergebnisse sind in den **Fig. 10** und **11** gezeigt.

[0089] Aus den vorstehenden Ergebnissen bindet Ref-1, das ein Protein ist, das aus insgesamt 318 Aminosäureresten besteht, an E3330 in dem Fall nicht, in dem 231 oder mehr Aminosäurereste von seinem C-Terminus deletiert sind, oder in dem Fall, in dem 72 oder mehr Aminosäurereste von seinem N-Terminus deletiert sind. Folglich wurde aufgedeckt, dass die Aminosäuresequenz von mindestens Aminosäure 72 bis Aminosäure 88 bei der Bindungsaktivität von Ref-1 gegenüber E3330 beteiligt ist, wie in **Fig. 12** gezeigt. Ein rekombinantes Protein, das nur die betroffene Aminosäuresequenz (Aminosäure 72 bis Aminosäure 88) aufweist, wurde synthetisiert und hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften unter Verwendung von E3330-immobilisierten Partikeln untersucht, was eine Bestätigung seiner Bindungsfähigkeit gegenüber E3330 ergab. Die Aminosäuresequenz von Aminosäure 72 bis Aminosäure 88 ist wie folgt: (Länge der Sequenz: 17 Aminosäuren): LRA-WIKKKGLDWWKEEA [SEQ ID NO: 13].

[0090] Diese Ergebnisse zeigten, dass der intrazelluläre Rezeptor für E3330 unter Verwendung von E3330-immobilisierten Partikeln isoliert und aufgereinigt wurde, und es ist ersichtlich, dass die Erfindung für eine Isolierung und Aufreinigung von Proteinen außerordentlich hilfreich ist.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: HANDA, Hiroshi

KAWAGUCHI, Haruma

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDERUNG: WIRKSTOFF-IMMOBILISIERTE
PARTIKEL UND VERFAHREN ZUR REINIGUNG VON PROTEINEN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 13

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Dike, Bronstein, Roberts & Cushman, LLP

(B) STRASSE: 130 Water Street

(C) STADT: Boston

(D) STAAT: MA

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 02109

(v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: DOS

(D) SOFTWARE: FastSEQ Version 1.5

(vi) DATEN DER GEGENWÄRTIGEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:

(B) ANMELDETAG:

(C) KLASSIFIKATION:

(vii) DATEN DER PRIORITÄTSANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:

(B) ANMELDETAG:

(viii) ANGABEN DES VERTRETERS:

(A) NAME: Corless, Peter F

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 33,860

(C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: 47115

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:

(A) TELEFON: 617-523-3400

(B) TELEFAX: 617-523-6440

(C) TELEX:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

Gly Leu Asp Trp Val Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (v) FRAGMENTART: N-terminal
- (vi) URSPRUNGSQUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

Ala Ala Gly Glu Gly Pro Ala Leu Tyr Glu Asp Pro Pro Asp
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (v) FRAGMENTART: N-terminal
- (vi) URSPRUNGSQUELLE:
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

Gly Ala Val Ala Glu Asp Gly Asp Glu Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 319 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

Met Pro Lys Arg Gly Lys Lys Gly Ala Val Ala Glu Asp Gly Asp Glu
 1 5 10 15
 Leu Arg Thr Glu Pro Glu Ala Lys Lys Ser Lys Thr Ala Ala Lys Lys
 20 25 30
 Asn Asp Lys Glu Ala Ala Gly Glu Gly Pro Ala Leu Tyr Glu Asp Pro
 35 40 45
 Pro Asp Gln Lys Thr Ser Pro Ser Gly Lys Pro Ala Thr Leu Lys Ile
 50 55 60
 Cys Ser Trp Asn Val Asp Gly Leu Arg Ala Trp Ile Lys Lys Lys Gly
 65 70 75 80
 Leu Asp Trp Val Lys Glu Glu Asp Ala Pro Asp Ile Leu Cys Leu Gln
 85 90 95
 Glu Thr Lys Cys Ser Glu Asn Lys Leu Pro Ala Glu Leu Gln Glu Leu
 100 105 110
 Pro Gly Leu Ser His Gln Tyr Trp Ser Ala Pro Ser Asp Lys Glu Gly
 115 120 125
 Tyr Ser Gly Val Gly Leu Leu Ser Arg Gln Cys Pro Leu Lys Val Ser
 130 135 140
 Tyr Gly Ile Gly Asp Glu Glu His Asp Gln Glu Gly Arg Val Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Glu Phe Asp Ser Phe Val Leu Val Thr Ala Tyr Val Pro Asn Ala
 165 170 175
 Gly Arg Gly Leu Val Arg Leu Glu Tyr Arg Gln Arg Trp Asp Glu Ala
 180 185 190
 Phe Arg Lys Phe Leu Lys Gly Leu Ala Ser Arg Lys Pro Leu Val Leu
 195 200 205
 Cys Gly Asp Leu Asn Val Ala His Glu Glu Ile Asp Leu Arg Asn Pro
 210 215 220
 Lys Gly Asn Lys Lys Asn Ala Gly Phe Thr Pro Gln Glu Arg Gln Gly
 225 230 235 240
 Phe Gly Glu Leu Leu Gln Ala Val Pro Leu Ala Asp Ser Phe Arg His
 245 250 255
 Leu Tyr Pro Asn Thr Pro Tyr Ala Tyr Thr Phe Trp Thr Tyr Met Met
 260 265 270
 Asn Ala Arg Ser Lys Asn Val Gly Trp Arg Leu Asp Tyr Phe Leu Leu
 275 280 285
 Ser His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Cys Asp Ser Lys Ile Arg Ser Lys
 290 295 300
 Ala Leu Gly Ser Asp His Cys Pro Ile Thr Leu Tyr Leu Ala Leu
 305 310 315

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART:

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

GTCTCTCGAG ATGCCGAAGC GTGGGAAAAA G

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART:

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

ATGCGGATCC TTACAGTGCT AGGTATAGGG T

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART:

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

TAACTAACTA G

11

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART:

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

ATTGATTGAT CCTAG

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART:

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

ATGCCTCGAG ATGCCAGCCC TGTATGAGGA CC

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART:

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

ATGCCTCGAG ATGGATTGGG TAAAGGAAGA AGCC

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART:

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

ATGCCTCGAG ATGCCTTCGG ACAAGGAAGG GT

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART:

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

ATGCCTCGAG ATGTTTGACT CGTTTGTGCT GGTA

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

Leu Arg Ala Trp Ile Lys Lys Lys Gly Leu Asp Trp Val Lys Glu Glu
1 5 10 15
Ala
□

Patentansprüche

1. Verfahren zum Isolieren einer Substanz, die sich an eine Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, aus einem Gemisch, das die Substanz enthält, anheften kann, umfassend ein In-Kontakt-Bringen des Gemisches mit einer Mikrosphäre, die dadurch hergestellt wird, dass die Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, an ein Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, über einen Spacer gekoppelt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein Gemisch, das die Substanz zum Isolieren enthält, ein Zellextrakt ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der Spacer ein Ethylenglykoldiglycidylether-Derivat ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, eine 3-[(5-(2,3-Dimethoxy-6-methyl-1,4-benzochinonyl)]-2-nonyl-2-propionsäure oder ein Derivat davon ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Substanz, die sich an die Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, anheften kann, ein Protein ist, das eine Aminosäuresequenz, dargestellt durch SEQ ID NO: 4, umfasst, in der eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder ersetzt sind.

6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Substanz, die sich an die Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, anheften kann, ein Peptid ist, das eine Aminosäuresequenz aufweist, die mindestens 70% Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 4 aufweist.

7. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Substanz, die sich an die Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, anheften kann, ein Peptid ist, das eine Aminosäuresequenz aufweist, die mindestens etwa 80% Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 13 aufweist.

8. Styrol-Glycidylmethacrylat-Polymer, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist und an eine Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, über einen Spacer gebunden ist.
9. Polymer nach Anspruch 8, wobei das Polymer eine Mikrosphäre ist.
10. Mikrosphären nach Anspruch 9, worin ein Spacer ein Ethylenglykoldiglycidylether-Derivat ist.
11. Mikrosphäre nach Anspruch 9 oder Anspruch 10, worin eine Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, ein 3-[(5-(2,3-Dimethoxy-6-methyl-1,4-benzochinonyl)]-2-nonyl-2-propionsäure-Derivat ist.
12. Verfahren zum Screenen nach einer Substanz, die an eine Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, bindet, wobei die Substanz, die eine physiologische Aktivität aufweist, über einen Spacer an ein Polymer gebunden ist, das Styrol-Glycidylmethacrylat, das mit Glycidylmethacrylat umhüllt ist, umfasst.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

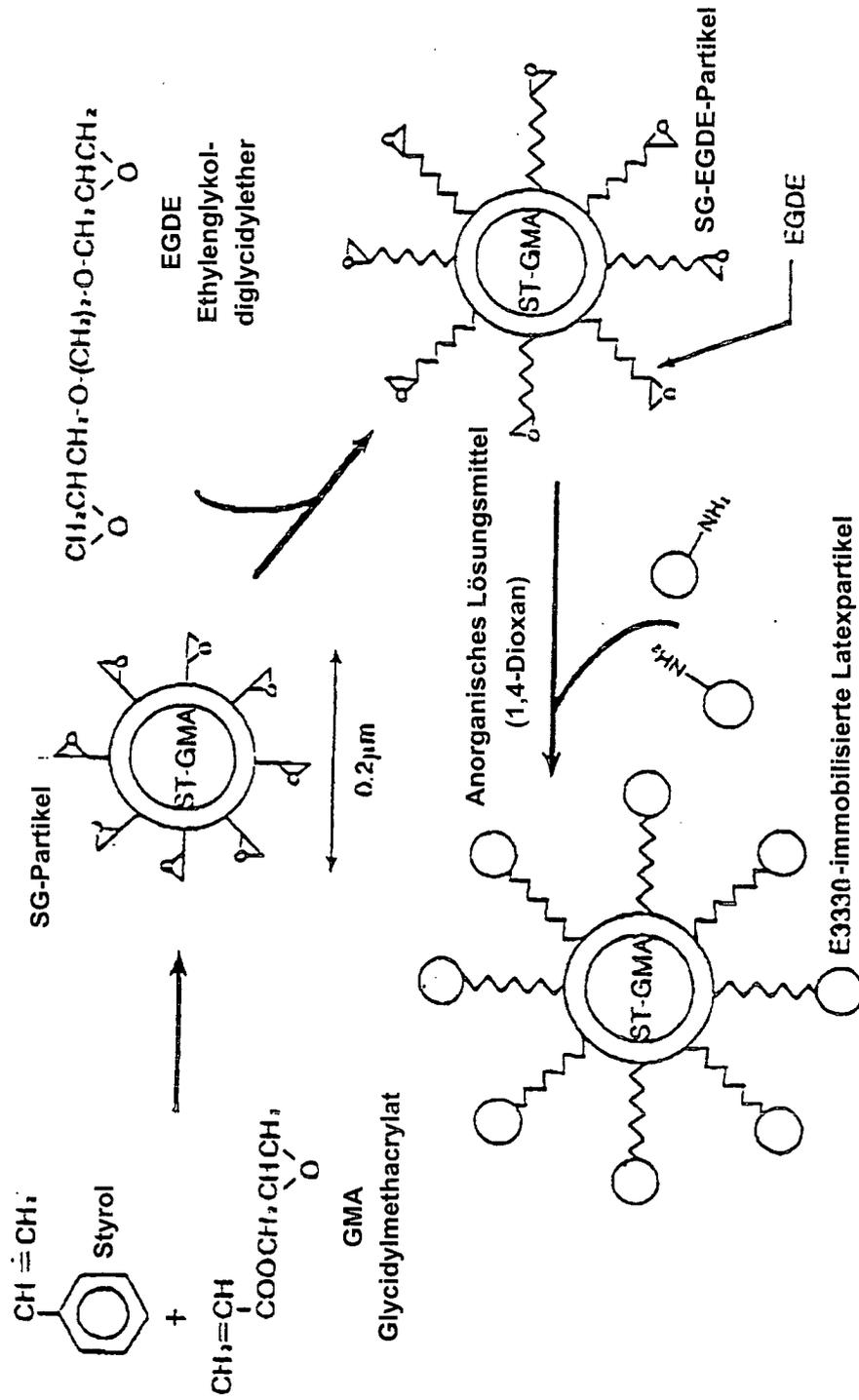


FIG. 2

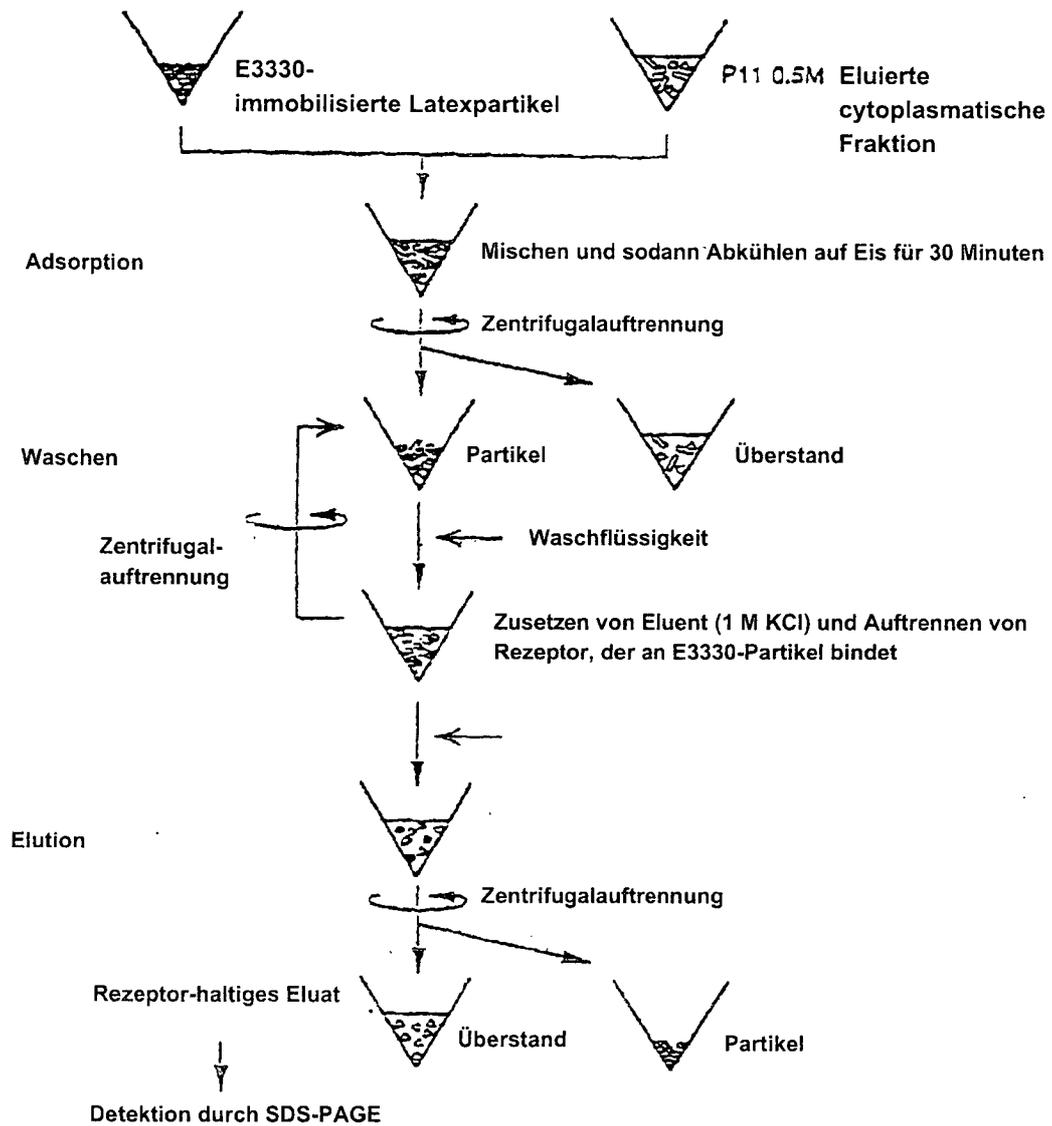


FIG. 3

FIG. 3A A

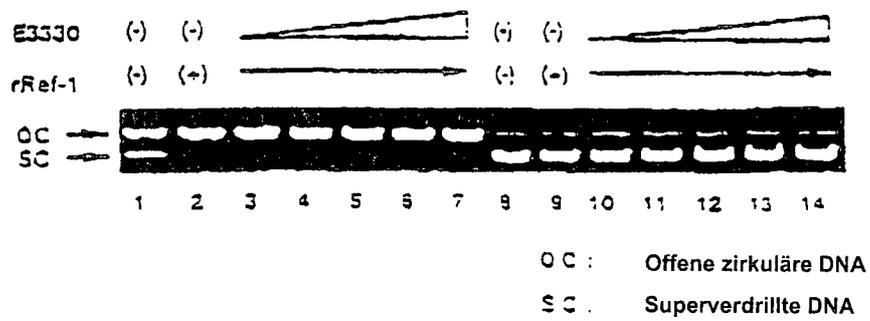


FIG. 3B B

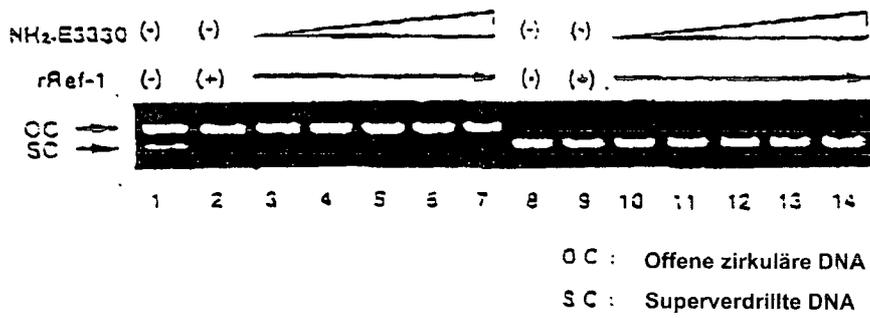
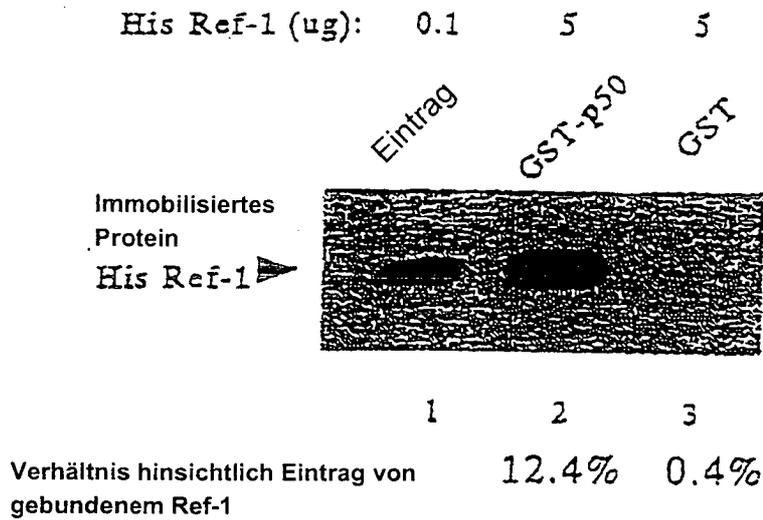


FIG. 6

- 1 Immobilisieren von GST oder GST-p50NH-KB an Glutathion-Sepharose-Kügelchen.
- 2 Mischen jedes Kügelchens und His-Ref-1.
- 3 Waschen von diesen mit Puffer.
- 4 Elution durch Aufkochen.
- 5 Detektieren von an Kügelchen gebundenem Ref-1 mittels eines Immunoblot-Verfahrens mit einem Anti-Ref-1-Antikörper.



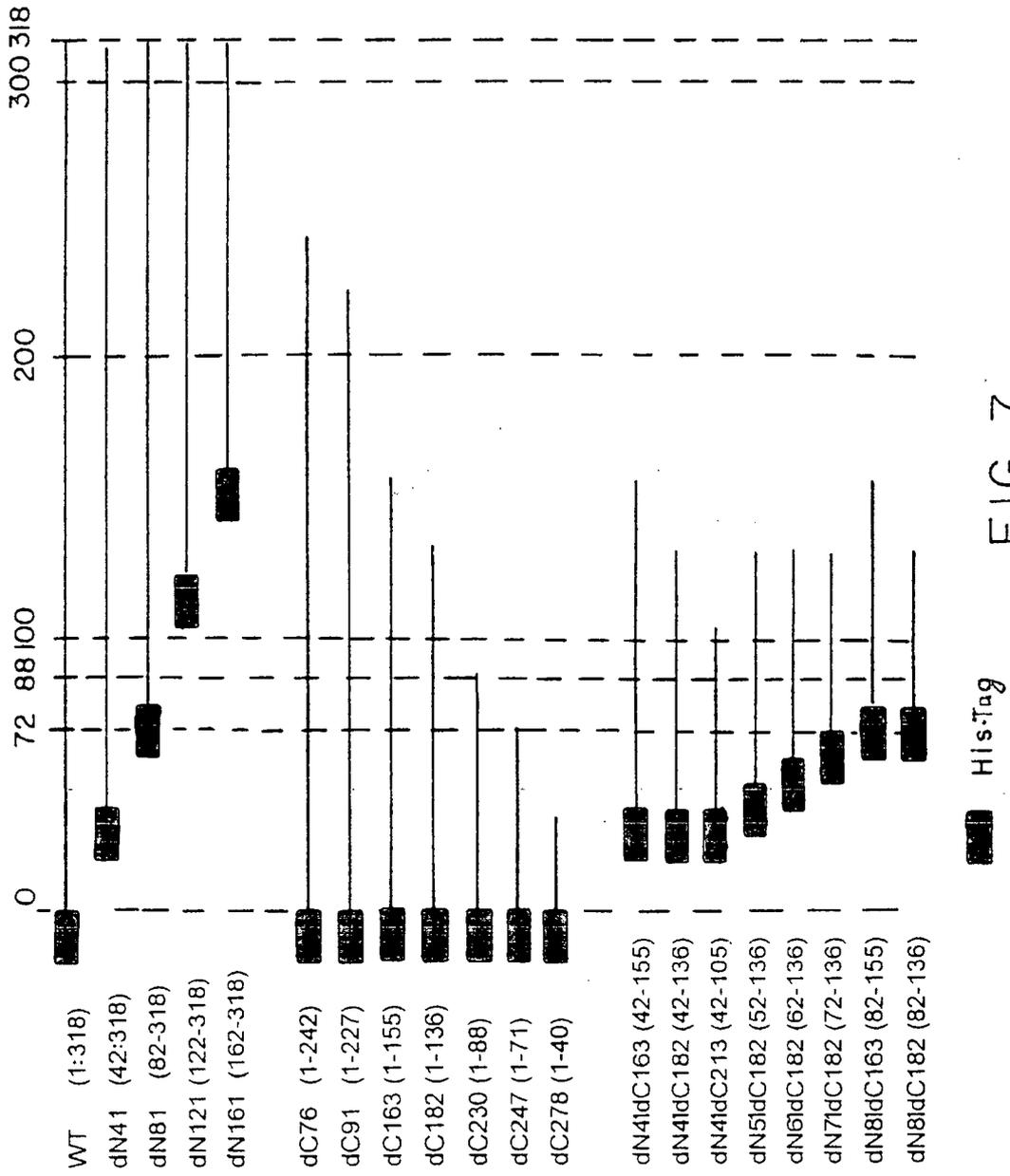


FIG. 7

FIG. 8

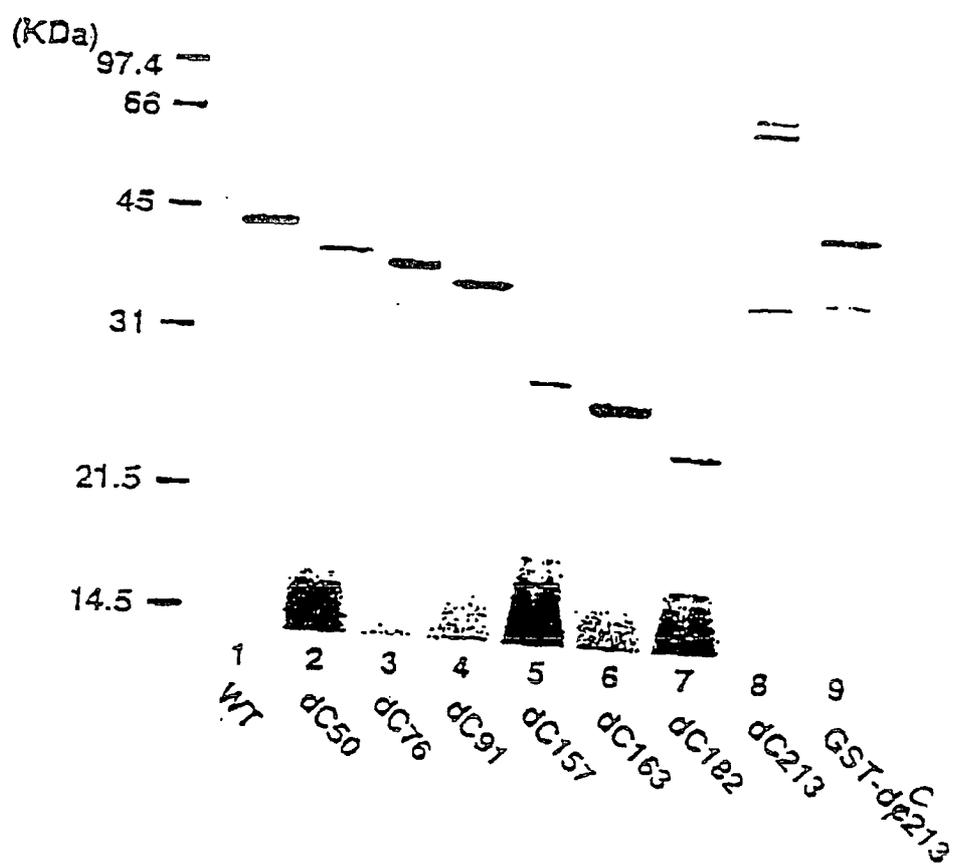


FIG. 9

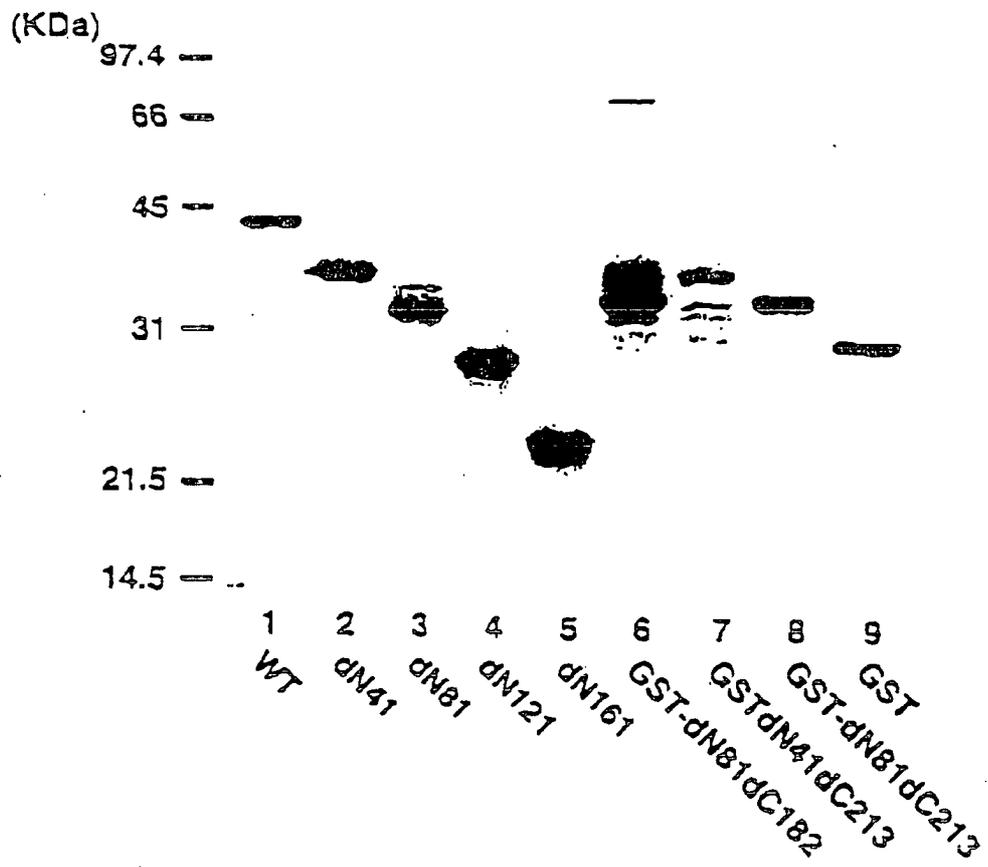


FIG. 10

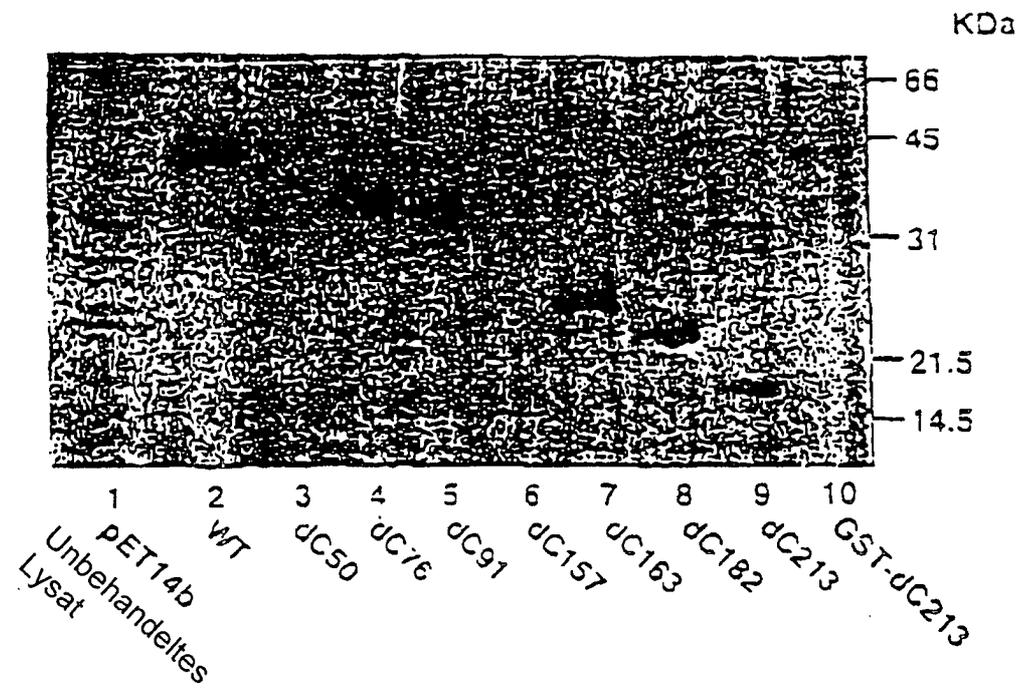


FIG. 11

