

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 501085

(P2003 - 501085A)

(43)公表日 平成15年1月14日(2003.1.14)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088		48/00	4 B 0 6 3
38/00		A 6 1 P 21/00	4 B 0 6 5
48/00		25/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 21/00		31/14	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 34数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 502573(P2001 - 502573)

(86)(22)出願日 平成12年5月3日(2000.5.3)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月4日(2001.12.4)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/03949

(87)国際公開番号 W000/075309

(87)国際公開日 平成12年12月14日(2000.12.14)

(31)優先権主張番号 199 25 668.3

(32)優先日 平成11年6月4日(1999.6.4)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 アヴェンティス・リサーチ・ウント・テク
ノロジーズ・ゲーエムベーハー・ウント・
コー・カーゲー

ドイツ連邦共和国デー - 65926 フランクフルト・アム・マイン

(72)発明者 パオアー, ベッティア
ドイツ連邦共和国65929 フランクフルト,
ヨハンネスアレ 15

(72)発明者 リューハーマン, ラインハルド
ドイツ連邦共和国35041 マルブルグ, エー
ヴィヒス・タール・16ペー

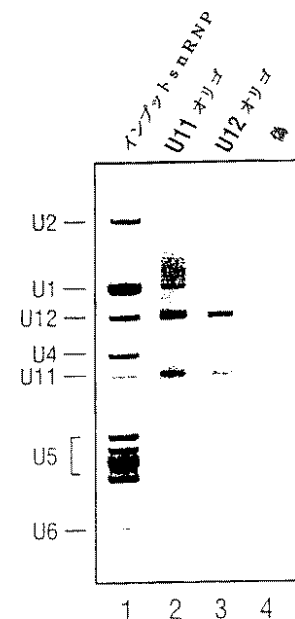
(74)代理人 弁理士 社本 一夫 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 スプライソソームタンパク質とその使用

(57)【要約】

本発明は、U 1 2 依存性スプライソソームのU 1 1 / U 1 2 s n R N P 複合体と会合し、前記スプライソソームに特異的であるスプライソソームタンパク質に関する。前記タンパク質とそれをコードするDNA配列は、特定の自己免疫疾患とスプライシング装置の欠陥により引き起こされる疾患の診断薬に有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 U12スプライソソームのU11/U12 snRNP複合体に会合した35kDタンパク質の機能を有するスプライソソームタンパク質をコードするDNA配列であって、

a) 配列番号18のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA配列；

b) a)の配列に相補的な配列とハイブリダイズし、U11/U12 snRNP複合体の35kDタンパク質の機能特性を有するタンパク質をコードし得るDNA配列；及び

c) 遺伝暗号がa)又はb)に示される配列に関して縮重しているDNA配列、
からなる群から選択される配列、及び前記配列のフラグメント、並びにa)、b)及びc)に示される配列又はそれらのフラグメントに相補的な配列。

【請求項2】 配列番号17のヌクレオチド配列を含んでなる請求項1に記載のDNA配列、それに相補的な配列、及び前記配列のフラグメント。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のDNA配列を含んでなる、組換えDNA分子。

【請求項4】 スプライソソームタンパク質をコードするDNAが、原核細胞又は真核細胞において前記タンパク質の発現を可能にする調節配列に連結している、請求項3に記載の組換えDNA分子。

【請求項5】 請求項1又は2に記載の配列、又は請求項3又は4のいずれか1項に記載の組換えDNA分子を含んでなるベクター。

【請求項6】 請求項3又は4のいずれか1項に記載の組換えDNA分子、又は請求項5に記載のベクターを含んでなる宿主生物。

【請求項7】 原核微生物である、請求項6に記載の宿主生物。

【請求項8】 真核微生物である、請求項6に記載の宿主生物。

【請求項9】 U12スプライソソームのU11/U12 snRNP複合体に会合した35kDタンパク質の機能を有するスプライソソームタンパク質であって、請求項1又は2に記載の配列のいずれかにコードされる前記スプライソ

ソームタンパク質。

【請求項10】 請求項9に記載のスプライソソームタンパク質であって、

a) 配列番号18のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

b) a)に記載の配列と比較して、1つ又はそれ以上のアミノ酸の欠失、アミノ酸の置換、アミノ酸の付加及び/又はアミノ酸の挿入を有するポリペプチド、からなる群から選択される、前記スプライソソームタンパク質。

【請求項11】 請求項1又は2に記載のDNA配列又はそのフラグメントの、相同なDNA配列又はRNA配列を単離するための使用。

【請求項12】 請求項9に記載のスプライソソームタンパク質の、スプライシングモジュレーターを発見するための使用。

【請求項13】 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸及び/又は請求項9又は10のいずれか1項に記載のスプライソソームタンパク質、並びに医薬的に許容される添加剤及び/又は賦形剤を適宜含んでなる医薬品。

【請求項14】 がん、自己免疫疾患、特にグレーブス病、脊髄性筋萎縮症、' - サラセミア、c - e r bがん遺伝子に関連したがん、C型肝炎感染、単純ヘルペスウイルス感染、全身性エリスマトーデス、ヘルマンスキー - ブドゥラック症候群を治療するための医薬品を製造する方法であって、請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸、及び/又は請求項9又は10のいずれか1項に記載のスプライソソームタンパク質を、医薬的に許容される添加剤及び/又は賦形剤とともに製剤化することを含む、前記方法。

【請求項15】 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸及び/又は請求項9又は10のいずれか1項に記載のスプライソソームタンパク質、並びに医薬的に許容される添加剤及び/又は賦形剤を適宜含んでなる診断薬。

【請求項16】 グレーブス病、脊髄性筋萎縮症、' - サラセミア、c - e r bがん遺伝子に関連したがん、C型肝炎感染、単純ヘルペスウイルス感染、全身性エリスマトーデス、ヘルマンスキー - ブドゥラック症候群を診断するための診断薬を製造する方法であって、請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸、及び/又は請求項9又は10のいずれか1項に記載のスプライソソームタンパク質に、医薬的に許容される担体を添加することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、AT-ACスプライソソームのU11/U12 snRNP複合体と会合し、前記スプライソソームに特異的であるスプライソソームタンパク質に関する。さらに本発明は、スプライシング装置における欠陥に起因した自己免疫疾患及び疾患を診断するための前記タンパク質及びそれをコードするDNA配列の使用に関する。

【0002】

グレーブス病に罹患している患者では、不正確なスプライシングにより重要な酵素（チロペルオキシダーゼ）が不活性な形態で産生されることが示されている（Zanelli, E. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 170, 725）。脊髄性筋萎縮障害に関する研究は、欠陥SMN（運動ニューロン生存）遺伝子産物によりsnRNP形成がかなり破壊されることを示す。筋肉ニューロンのスプライシング装置の阻害は神経細胞の麻痺と筋肉組織の破壊をもたらす（Fischer, U. et al., (1997), *Cell*, 90: 1023-9; Liu, Q. et al. (1997), *Cell*, 90: 1013-21; Lefebvre, S. et al., (1997) *Nat. Genet.*, 16, 265）。特に、膜結合性CD44分子の特定の選択的スプライス変異体は、がん細胞の転移においてきわめて重要な役割を担うようである。このCD44遺伝子は複数のエクソンを含み、このうち10個の隣接エクソンはpre-mRNAからmRNAの形成の間に様々な順にスプライスされる。ラットのがん細胞では、転移する変異体はエクソン4～7か、又は6～7を有することが検出されている。エクソン6によりコードされるタンパク質の一部に対する抗体を利用して、転移を有効に抑制することが可能である（Sherman, L., et al., (1996) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213: 249-269）。

【0003】

不正確なスプライシングは、罹患した生物のきわめて特徴的な表現型をもたらす。β-グロビンのイントロンにおける点突然変異がβ-thalassemiaをもたらすことが知られている。点突然変異から誤ったスプライシング位置が生じ、変化したリーディングフレームとペプチド鎖の早期終止をもたらすためである（

Weatherall, D. J. & Clegg, J. B. (1982) *Cell*, 29, 7; Fukumaki, Y. et al. (1982) *Cell*, 28, 585)。例えば、シロイヌナズナ突然変異体では、フィトクロムB遺伝子の5' スプライス部位における点突然変異が不正確な遺伝子の発現につながる。前記の変化により、その配列内に終止コドンを含むイントロンを除去することができなくなる。この遺伝子は光形態形成に関わるので、植物の発根が破壊される (Bradley, J. M. et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 27, 1133)。

【0004】

数多くの真核タンパク質コード遺伝子、又はRNAコード遺伝子は、遺伝子産物の部分領域をコードする個体配列 (エクソン) と遺伝子産物をコードしない介在配列 (イントロン) を交互に有する、モザイク様の組成を有する。従って、そのようなモザイク遺伝子の一次転写物は、そのRNA鎖のなかにコーディングエクソンと非コーディングイントロンを両方含有し、正しい遺伝子発現のために先ずプロセッシングを受けることになる。

【0005】

不可欠なプロセッシング工程の1つは、核内で生じるスプライシングである。タンパク質コード遺伝子を発現する場合、このことは、相対的に長鎖の一次転写物、「プレmRNA」からイントロンRNA配列を切出して、成熟mRNAを形成すること、及びエクソンRNA配列を相互連結させることを含む。このスプライシングプロセスは「スプライソソーム」により触媒されるが、これは、ウリジンに富んだRNA (核内低分子RNA, snRNA) とそれに特異的に結合するタンパク質を含む複数の核内低分子リボ核タンパク粒子 (核内低分子RNP, snRNP)、及び前記snRNPと緊密には結合しないタンパク質、「非snRNPスプライシング因子」から種々の段階で組立てられる、高分子リボ核タンパク質複合体である。一般にスプライシングは2段階の機序により起こり、各段階でトランスエステル化の工程が関わる。第1の工程では、イントロンの5' スプライス部位と「分岐部位」にスプライソソームが結合した後で、遊離の5' エクソンと「ラリアットイントロン構造」が産生され、イントロンは依然として3' エクソンに連結している。第2の工程では、次いで、2つのエクソンが連結され、

イントロンが遊離される。

【0006】

後生動物のpre-mRNAイントロンの大部分は、不変のGUジヌクレオチド及びAGジヌクレオチドを末端に有する。これらのイントロンは、前記ジヌクレオチドを認識する「U2依存性スプライソソーム」(又はメジャーなスプライソソーム)により切出される。スプライソソームはU1、U2、U5及びU4/U6 snRNPを含有し、これらは1つ(U1、U2、U5)又は2つ(U4/U6)のRNAと多数のタンパク質、例えばSmクラスのタンパク質からなる。スプライソソームは、RNAとタンパク質の両方が関与する相互作用により、「U2依存性イントロン」のスプライス部位及び分岐部位を認識する。このように、U1 snRNPの70Kタンパク質やCタンパク質、並びにSer及びArgに富んだSRタンパク質ファミリーのタンパク質のような、様々なポリペプチドがU1 snRNAと5'スプライス部位間の二重鎖形成を促進する。同様に、U2 snRNAと分岐部位間の塩基対形成には、数多くのU2-snRNPタンパク質、特にヘテロメリックスプライシング因子のSF3a及びSF3bのサブユニットが必要とされる[R. Reed, Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 215 (1996); C. L. Will and R. Luhrmann, Curr. Opin. Cell Biol. 9, 320 (1997); A. Kramer, Annu. Rev. Biochem. 65: 367 (1996)]。

【0007】

より最近、他のスプライソソームである「AT-ACスプライソソーム」を同定することが可能になったが、これはU11、U12、U5及びU4atac/U6atac snRNPからなり、AUジヌクレオチド及びACジヌクレオチド、又はGTジヌクレオチド及びAGジヌクレオチドをその末端に有する、稀なクラスのpre-mRNAイントロンをスプライスする[C. B. Burge et al. In: The RNA World II, R. F. Gesteland and J. F. Atkins, eds., Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, N. Y., 1999, p. 525]。従って、これらイントロンはU12依存性と呼ばれ、U2依存性イントロンと比較して、ごく稀にしか見出されず、5'スプライス部位及び分岐部位に、U2依存性pre-mRNAイントロンのわずかに保存された配列とは異なる、高度に保存された配列要素を

含有する [C. B. Burge et al. In: The RNA World II, R. F. Gesteland and J. F. Atkins, eds., Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, N. Y., 1999, p. 525; S. L. Hall and R. A. Padgett, J. Mol. Biol. 239: 357 (1994); P. A. Sharp and C. B. Burge, Cell 91: 875 (1997)]。U12 依存性スプライソソームの組立ての間、U11 snRNPは5' スプライス部位に結合し、U12 snRNPは塩基対形成を介して分枝部位へ結合する [S. L. Hall and R. A. Padgett, Science 271: 1716 (1996); W.-Y. Tarn and J. A. Steitz, Cell 84: 801 (1996); W.-Y. Tarn and J. A. Steitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6030 (1997); I. Kolossova and R. A. Padgett, RNA 3: 227 (1997)]。次いで、U5 snRNPとU4atac/U6atac-snRNPは会合して成熟スプライソソームを形成する [W.-Y. Tarn and J. A. Steitz, Science 273: 1824 (1996)]。U11 snRNPとU12 snRNPは、高度に安定な18S U11/U12複合体として核抽出物に存在し [K. M. Wassarman and J. A. Steitz, Mol. Cell Biol. 8, 1276 (1992)]、より最近のインビトロ結合研究から、U11及びU12は前形成された複合体としてpre-mRNAと相互作用するという仮説が導かれている [M. Frilander and J. A. Steitz, Genes & Dev. 13: 851 (1999)]。上記の観察事実は、U12型イントロンが主要クラスイントロンの3' スプライス部位の必須ピリミジン領域を有さないという事実とともに、様々なスプライソソームにおけるスプライス部位認識の機構の間に様々な違いがあるという仮説を導く。

【0008】

従って、U12依存性スプライソソームに特徴的なタンパク質の同定及び特徴づけにより、前記スプライソソームにおけるスプライシングプロセスの詳細な機序についての情報が提供され得るだけでなく、同時に、前記スプライソソームのスプライシング機序における破壊に関連し得る疾患の診断及び治療を可能にし得る。特定のタンパク質を提供することによって、スプライシングプロセスの破壊により引き起こされる疾患の治療にも有利に利用され得る潜在的なスプライシングモジュレーターを発見し開発することがさらに可能になる。

【0009】

従って、本発明の目的はU12依存性スプライソソームに特徴的なタンパク質を提供することである。

この目的は、U12依存性スプライソソームの18S U11/U12 snRNP複合体に会合し、前記スプライソソームに特異的であるスプライソソームタンパク質により達成された。

【0010】

従って、本発明は、U12依存性スプライソソームのU11/U12 snRNP複合体に会合した35kDタンパク質の機能を有するスプライソソームタンパク質に関するものであり、このスプライソソームタンパク質は以下を含んでなる群から選択される核酸（以下に示す本発明の核酸）によりコードされる：

- a) 配列番号18のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA配列；
- b) a)の配列に相補的な配列とハイブリダイズし、U11/U12 snRNP複合体の35kDタンパク質の機能を有するタンパク質をコードし得るDNA配列；及び
- c) 遺伝暗号がa)又はb)に示される配列に関して縮重しているDNA配列。

【0011】

「U12依存性スプライソソームのU11/U12 snRNP複合体に会合した35kDタンパク質の機能を有するスプライソソームタンパク質（以下、本発明のスプライソソームタンパク質）」は、本明細書では、U11/U12 snRNP複合体の天然に存在する、好ましくはヒトの35kDタンパク質の特性を本質的に有する、即ちスプライソソーム複合体における前記スプライソソームの正確な機能を保証する、任意のポリペプチドを意味する。

【0012】

本明細書中のハイブリダイゼーションという用語は、通常ハイブリダイゼーション条件下、特に、当業者に公知のストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーションを意味する [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)]。

【0013】

スプライソソームタンパク質は、好ましくは、配列番号18のアミノ酸配列を有する。しかしながら、このタンパク質は、1つ又はそれ以上のアミノ酸の欠失、アミノ酸の置換、アミノ酸の付加又はアミノ酸の挿入を、それらにより引き起こされるタンパク質の機能に対する有害効果が無視できる限りにおいて、有していてもよい。同様に、例えばスプライソソームタンパク質は外来タンパク配列を（例えば、融合タンパク質として）含有することが可能である。

【0014】

長さ246個のアミノ酸の好ましい本発明のスプライソソームタンパク質は、SDS-PAGEにより決定される見かけの分子量が約35kD、算出分子量が29kD、及び等電点が9.88である。

【0015】

他の主題は、前記タンパク質をコードする請求項1に記載のDNA配列とその配列に相補的な配列、及びそれらのフラグメントである。

前記DNA配列は、他のDNA配列、特に、所望の宿主生物においてタンパク質の発現を可能にする配列に連結し得る。この種の配列は先行技術において公知である。それらは、例えば、プロモーター配列のような調節配列、シャイン・ダルガーノ配列、転写終結シグナル、ポリアデニル化シグナル又はエンハンサー要素であり得る。このようにして、所望のタンパク質を低コストで大量に製造することが可能である。

【0016】

従って、本発明はまた本発明のDNA配列を含有する組換えDNA分子にも関する。

組換えDNA分子は、所望の宿主生物へ直接的に導入されるか、又は先ずベクターに導入され、次にそれ自体公知のやり方で宿主生物を形質転換するために使用されることができる。同様に、本発明はこのようなベクターに関する。使用され得るベクターは、先行技術において一般的なベクター、例えばプラスミド、バクテリオファージ又はウイルスである。好ましいベクターは発現ベクターである

。

【0017】

本発明は、同様に、本発明の組換えDNA分子又はベクターを含有する宿主生物に関する。

好適な宿主生物の例は、原核又は真核の微生物、例えば、大腸菌のような細菌、酵母又は組織細胞である。

【0018】

本発明のDNA配列又はそのフラグメントは、本発明のスプライソソームタンパク質と類似又は同一の機能を保有する相同DNA配列を、様々な生物又は組織型に見出すために使用され得る。

【0019】

さらに、本発明のタンパク質と前記タンパク質をコードするDNA配列は、例えば、自己免疫疾患及びスプライシング機序の破壊に関連し得る疾患の診断薬として、有利にも[欠文]され得る。

【0020】

このように、スプライソソーム成分は自己抗原として作用し得ることが知られている。例えば、自己免疫疾患の全身性エリスマトーデスに罹患している患者は、大部分のsnRNPを沈澱させるのに使用され得る抗体をしばしば産生する。簡便な免疫アッセイにより、本発明のタンパク質は、U12依存性スプライソソームに特異的なタンパク質に対する抗体形成に起因した自己免疫疾患の迅速診断についての可能性を提供する。

【0021】

U12依存性スプライソソームのスプライシング機序の破壊に関連し得る疾患は、この破壊は35kDタンパク質の欠失に起因するのだが、例えば、先行技術において公知のインビトロスプライシング系での相補性検定を利用して診断され得る。ここでは、第一に、スプライソソームによるpre-mRNAの認識とスプライシングプロセスに必要なすべての構造要素を含有するU12依存性イントロンを有するpre-mRNAが、例えばインビトロ転写により産生される。このRNAを、例えば、放射標識する。そうすると、後に、変性尿素ポリアクリルアミドゲ

ル上で分画した後で、特徴的なバンドパターンに基づいて、スプライシング反応が起きたかどうかを評価することが可能になる。引き続き、患者組織からのサンプルを、本発明の35 kDタンパク質を添加して、又は添加せずにアッセイする。次いで、相補性により前記タンパク質の欠失を確認する。

【0022】

他の使用可能なインビトロスプライシング系はPCT/EP00/01595に記載されている。

本発明のDNA配列は、記載の35 kDタンパク質の遺伝子の欠陥の診断、特に出生前診断のための一般的なハイブリダイゼーションアッセイに利用し得る。

【0023】

さらに、本発明のタンパク質は、スプライシングの欠陥に起因した疾患に対する治療薬として使用し得る。

本発明のスプライソソームタンパク質をさらにスプライシングモジュレーター、例えばスプライシングインヒビターを発見し開発することに有利に使用することが可能であり、それはさらなる疾患の治療に適している。こうして、ごく最近、常染色体劣性のヘルマンスキー-ブドゥラック症候群(HPS)の原因である突然変異遺伝子において、U12依存性イントロンが同定された。将来的には、通常引き起こされる疾患に部分的に起因し得るさらなる遺伝子においてそのようなイントロンが見出される可能性があるかと期待することができる。そのような遺伝子に存在するイントロンのスプライシング、従って有害な突然変異遺伝子の発現を特異的に阻害することは、前記疾患を治療するための有望な方法である。U12依存性イントロンが稀であるために、そのようなスプライシングインヒビターを、U2依存性スプライソソームよりもU12依存性スプライソソームに対してより効果的に治療的に使用することも可能である。

【0024】

需要の多いスプライシングモジュレーターは、スプライシング機序の研究についてすでに上記した公知のインビトロアッセイ系を使用することによって見出し得る。このようにして分析され得るスプライシングモジュレーター又はスプライシングインヒビターの例は、モノクローナル抗体である。このように、抗血清又

はモノクローナル抗体を利用して、細胞内でのスプライシングプロセス、例えば成熟mRNAの産生に影響を及ぼすことがすでに記載されている [R. A. Padgett et al., Cell 35: 10 (1983); R. Gattoni et al., Nucleic Acids Res. 24: 2535 (1996)]。

【0025】

マイナーなスプライソソームによるスプライシングの調節プロセスを同定することは、ウイルス学にとっても重要である。最近 (Hibbert et al., 1999)、ラウス肉腫ウイルスにおける負の調節スプライシング配列 (NRS) の領域にある U1 5' スプライス部位の配列が同定された。U1 snRNPのNRSへの結合はスプライシングプロセスを阻害する、即ちNRS活性を増加させる。

【0026】

U1結合部位は、U12依存性スプライソソームの5' スプライス部位にあるNRS上の配列と同一であるU11結合部位と重複する。U11 snRNPがNRSへ結合すると、スプライシングを促進する、即ちNRS活性を低下させる。U1 snRNPとU11 snRNPとの競合は、最適なウイルス複製のためにスプライスされるウイルスRNAとスプライスされないウイルスRNAとの平衡を確立するのに貢献する。

【0027】

Hibbert et al. (1999) による研究が示すように、U1及び/又はU11結合ドメインにおける特定の突然変異は、ウイルスの生活環に影響すること、及びおそらくは制御することにさえ貢献し得る。U11/NRSの相互作用を阻害する戦略は、この研究において得られた、プレスプライソソームの特徴に関連した情報を利用して開発され得る。

【0028】

従って、本発明はまた、本発明の核酸及び/又は本発明のスプライソソームタンパク質、並びに医薬的に許容される添加剤及び/又は賦形剤を適宜含んでなる医薬品にも関する。

【0029】

さらに、本発明は、がん、自己免疫疾患、特にグレーブス病、脊髄性筋萎縮症

、' - サラセミア、c - e r bがん遺伝子に関連したがん、C型肝炎感染、単純ヘルペスウイルス感染、全身性エリスマトーデス、ヘルマンスキー - プドゥラック症候群を、製剤化される本発明の核酸又は本発明のスプライソソームタンパク質を用いて治療するための医薬品を製造する方法に関する。

【0030】

同様に、本発明は、本発明の核酸及び/又は本発明のスプライソソームタンパク質、並びに医薬的に許容される添加剤及び/又は賦形剤を適宜含んでなる診断薬にも関する。

【0031】

さらに、本発明は、グレーブス病、脊髄性筋萎縮症、' - サラセミア、c - e r bがん遺伝子に関連したがん、C型肝炎感染、単純ヘルペスウイルス感染、全身性エリスマトーデス、ヘルマンスキー - プドゥラック症候群を、本発明の核酸及び/又は本発明のスプライソソームタンパク質に添加される医薬的に許容される担体で診断するための診断薬を製造する方法に関する。

【0032】

本発明のU11/U12会合35kDタンパク質の単離を以下の実施例により具体的に示す。

以下の実施例は本発明をより詳しく説明するのに役立つが、本発明は前記実施例により制限されるものではない。

【0033】

実施例

HeLa核抽出物の調製

HeLa細胞由来の核抽出物は、HeLa細胞を有する細胞培養物を培養することによって調製した。この細胞を遠心分離(1,000×g、10分)により培地から沈降させ、リン酸緩衝液で洗浄した。次いで、この細胞沈降物を5倍量の緩衝液A(10mM HEPES、1.5mM MgCl₂、10mM KCl、0.5mM DTT、pH7.9、4℃)に取り、10分間インキュベートした。再び細胞を沈降させ、2倍量の緩衝液Aに取った。Dounceホモジェナイザー(プランジャーB)を使用して(プランジャーを10回上下に動かす)、こ

の懸濁物を破壊した。遠心分離により核を沈降させた。次いで、核を再び緩衝液Aに取り、 $25,000 \times g$ で20分遠心分離した。沈降物を3mlの緩衝液B (20mM HEPES、25% (v/v) グリセロール、0.42M NaCl、1.5mM $MgCl_2$ 、0.2mM EDTA、0.5mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、0.5mM DTT、pH 7.9) に取り、再びDounceホモジェナイザーを使用して破壊した。得られた懸濁液を磁気スターラー上で30分間インキュベートし、次いで $25,000 \times g$ で30分遠心分離した。これに次いで、 $25,000 \times g$ (30分) で再び遠心分離した。この上清を50倍量の緩衝液C (20mM HEPES、20% (v/v) グリセロール、0.1M KCl、0.2mM EDTA、0.5mM PMSF、0.5mM DTT、pH 7.9) に対して透析した。この透析物を遠心分離した ($25,000 \times g$ 、20分)。得られた上清は、核抽出物として液体窒素中に保存することができる (Dignam, J. D. et al. (1983) *Nucleic Acids Res.*, 11, 1475)。

【0034】

s n R N P の単離及び分析

トリメチルグアノシン (m3G) キャップのついた、前もって提供されたスプライソソーム s n R N P を、抗m3G抗体を使用する免疫アフィニティークロマトグラフィーによりHeLa細胞の核抽出物から精製し、10~30%強度のグリセロール勾配を介した沈降により分画した [B. Lagerbauer, J. Lauber and R. Luhrmann, *Nucleic Acids Res.* 24: 868 (1996)]。18S U11/U12 s n R N P 複合体を含有する分画をプールし、KCl濃度を250mMに調整した。2.4mlのプールした18S勾配分画から得たs n R N P を12 μ gのオリゴヌクレオチドとともに4 で16時間インキュベートした。このオリゴヌクレオチドは、ヒトU11 s n R N A の2~18番目のヌクレオチドである5' - ACGACAGAAGCCCUUUUdT[·]dt[·]dT[·]dT[·] - 3' (U11オリゴ)、又はヒトU12 s n R N A の11~28番目のヌクレオチドである5' - AUUUUCCUUACUCAUAAGdT[·]dT[·]dT[·]dT[·] - 3' (U12オリゴ) のいずれかに相補的である (ここで、[·]はビオチニル化2' - デオキ

シチミジンであり、A、U、G及びCは2'-O-メチルリボヌクレオチドである)。オリゴヌクレオチドが結合したsnRNPを、それ自体知られたやり方で、ストレプトアビジンアガロースを使用して沈澱させた [A. I. Lamond and B. S. Sproat, in RNA Processing: A Practical Approach, D. Rickwood and B. D. Hames, eds. (Oxford University Press, Oxford, 1996) p. 103]。アガロース沈澱snRNPの1/5から得たRNAを、DH緩衝液(15mM NaCl、1.5mM クエン酸ナトリウム、0.1% SDS)100 μ l中において95 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートすることによって溶出させ、10%強度のポリアクリルアミド/7M尿素ゲル上で分画し、銀染色により可視化した。選択されたRNAの同一性は、ノーザンブロットングにより、U11及びU12として確認された。タンパク質は、S緩衝液(60mM Tris、pH6.8、1mM EDTA、17.5%グリセロール、2% SDS、0.2M DTE)200 μ l中において95 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベーションすることによって、残りのビーズから溶出させ、5倍量のアセトンで沈澱させた。10%(上半分)及び13%(下半分)のポリアクリルアミドゲル上でSDS-PAGEによりこのタンパク質を分画し、クーマシー染色により可視化した。比較のために、出発材料(プールした18S勾配分画)50 μ lに由来するRNA及びタンパク質も分析した。

【0035】

オリゴU11についての結果を図1、レーン2に、オリゴU12についての結果を図1、レーン3に示す。レーン1は出発材料(インプット)のsnRNAを示し;レーン4はオリゴヌクレオチド非存在下での沈澱についての結果を対照(偽)として示す。U11に対するオリゴヌクレオチドでU12を同時選択すると、逆の場合も同じであるが、主にU11/U12 snRNP複合体が選択され、U11モノ粒子又はU12モノ粒子は選択されなかったことを示した。従って、図2、レーン2及び3は、前記snRNPを選択するのにどちらのオリゴヌクレオチドが使用されたかにかかわらず、同一のU11/U12 snRNPのタンパク質パターンを示す。タンパク質の分子量(kD)を右側に示す。レーン1はやはり出発材料(インプット)のタンパク質とそれらの同一性(左側)を示す。レーン4:対照。

【0036】

U11/U12 snRNP複合体と会合したタンパク質の同定

U11/U12複合体に見出される20種の異なるタンパク質のなかで、8種がSm snRNPの核タンパク質、B'、B、D3、D2、D1、E、F及びGとともに移動したが、これらはメジャーなスプライソソームsnRNPのなかに存在する(図2、レーン1~3)。B'/B、D3、D2、F又はGと特異的に反応する抗体は、U11/U12複合体の免疫プロット上で同一の分子量を有するタンパク質さえも認識した。従って、U11/U12は、メジャーなスプライソソームにおいても見出される同一の8種のSmタンパク質を含有する。

【0037】

残る12種のU11/U12タンパク質のなかで、U11/U12複合体の160kD、150kD、130kD及び49kDのタンパク質は、必須のスプライシング因子であるSF3Bを構成する、17S U2複合体に特異的な4種のタンパク質、即ちU2-160、U2-150、U-120及びU2-53とともに移動した。さらに、U2-160、U2-150及びU2-120に対する抗体は、U11/U12複合体の160kD、150kD及び130kDのタンパク質と強く反応した。U11/U12複合体の160kD、150kD、130kD及び49kDのタンパク質のミクロ配列決定により得られたペプチド配列(表1)は、公知のSF3b配列と実質的に同一であることが証明された。このように、上記した4種のタンパク質はSF3bから識別されるタンパク質と同一である可能性がきわめて高く、同一移動するタンパク質のなかで見かけの分子量がやや変動するのは、U2 snRNPタンパク質の最初の同定に適用された電気泳動条件における違いによる可能性がある。

【0038】

【表1】

U11/U12 タンパク質	ペプチド
160kD	KMNARTYMDVMREQHLTK KLTATPTPLGGMTGF KAIVNVIGMH
150kD	KRIFEAFK KLRRMNRFTVAE KRTGIQEMREALQEK KLTIHGDLYYEG
130kD	KLGAVFNQVAFPLQYT KLLRVYDLGK KNVSEELDRTPPEVSK KLENIAQRYAF
49kD	KVSEPLLXELFLQ KDRVTGQHGGYGFVEFLSEE

【0039】

ここでXは任意のアミノ酸を意味する。

U11/U12 snRNP複合体と会合した35kDタンパク質の特徴づけ
残るタンパク質のなかで、U11/U12 snRNP複合体と会合した35
kDタンパク質を特徴づけた。この目的のために、ゲル上で分画され、トリプシ
ンで消化された35kDタンパク質をマイクロ配列決定することによって、ペプチ
ドのKEYDPLK及びKRWQEREPTRVWPDNDを得た。これらのペ
プチドを使用して、TBLASTNプログラムによるcDNAについて、国立バ
イオテクノロジー情報センターのESTデータベースをスクリーニングした。い
ずれのペプチドも、未知のタンパク質をコードするヒトマクロファージ細胞由来
のcDNA(Genbank受託番号:U44798)のORFに見出された。
同一のORFを含有する、pBluescript SKに組み込まれたヒト筋
肉細胞由来の第2のcDNA(Genbank受託番号:AA211268)を
大腸菌HB101へ形質転換させ、次いでABI PRISM配列分析機を使用
して完全に配列決定した。この35kDタンパク質をコードするDNA配列を、

それから誘導されるアミノ酸配列とともに配列番号17に示す。配列番号17は、非コード5'及び3'配列を含む完全なcDNA配列を固有に示す。

【0040】

このcDNAのインビトロ翻訳(TNT(転写/翻訳のカップリング)キット、プロメガ)によりタンパク質を調製した。このタンパク質はSDSポリアクリルアミドゲル上で、精製された35kDタンパク質とともに移動し、このDNAが完全なタンパク質をコードすることを証明した。

【0041】

U11/U12 35kDタンパク質はRNA認識モチーフ(RRM;アミノ酸51~129番目)を有する。この領域と隣接するグリシンに富んだ領域はU170Kタンパク質のある領域に酷似している。さらに、35kDタンパク質に対する抗血清は、勾配により分画され、U11モノ粒子を含有するsnRNPの混合物からU11を効率的に沈澱させた。従って、U170Kタンパク質に類似して、このU11 35kDタンパク質も5'スプライス部位認識を促進する可能性がある。さらに、このタンパク質は、メジャーなスプライソソームの成分と相互作用して、エクソン連結に関わる可能性がある。

【配列表】

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> HeLa-Zellen

<400> 4
Lys Arg Ile Phe Glu Ala Phe Lys
1 5

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> HeLa-Zellen

<400> 5
Lys Leu Arg Arg Met Asn Arg Phe Thr Val Ala Glu
1 5 10

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> HeLa-Zellen

<400> 6
Lys Arg Thr Gly Ile Gln Glu Met Arg Glu Ala Leu Gln Glu Lys
1 5 10 15

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> HeLa-Zellen

<400> 7
Lys Leu Thr Ile His Gly Asp Leu Tyr Tyr Glu Gly
1 5 10

<210> 8

<211> 16
 <212> PRT
 <213> HeLa-Zellen

<400> 8
 Lys Leu Gly Ala Val Phe Asn Gln Val Ala Phe Pro Leu Gln Tyr Thr
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> HeLa-Zellen

<400> 9
 Lys Leu Leu Arg Val Tyr Asp Leu Gly Lys
 1 5 10

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> HeLa-Zellen

<400> 10
 Lys Asn Val Ser Glu Glu Leu Asp Arg Thr Pro Pro Glu Val Ser Lys
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> HeLa-Zellen

<400> 11
 Lys Leu Glu Asn Ile Ala Gln Arg Tyr Ala Phe
 1 5 10

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> HeLa-Zellen

auuuuccuua cucauaagdd dd

22

<210> 17

<211> 1067

<212> DNA

<213> HeLa-Zellen

<220>

<221> CDS

<222> (214)..(954)

<400> 17

```

ctgacatcag gagtttgagg cgggcttggg acatggtgaa atcctgtctg tactagaaat 60
gcaaaaatta gctgggcgtg gtggtgtgtg tctgtgatcc cagctgctcg gcctcccaag 120
gtgctgggat tacaggcgtg agccaccgcg tctggcctca gccaaagttt ttaagtaaca 180
tatttcagca ttggctctac agcgttcgag aac atg aac gat tgg atg ccc atc 234
                               Met Asn Asp Trp Met Pro Ile
                               1             5
gcc aag gag tat gat cca ctc aaa gcg ggc agc att gat ggc acc gat 282
Ala Lys Glu Tyr Asp Pro Leu Lys Ala Gly Ser Ile Asp Gly Thr Asp
      10             15             20
gaa gac cca cac gac cgc gcg gtc tgg agg gca atg ctg gca cga tat 330
Glu Asp Pro His Asp Arg Ala Val Trp Arg Ala Met Leu Ala Arg Tyr
      25             30             35
gtc ccc aac aaa ggt gtc ata gga gat ccc ctc ctc acc ctg ttt gtg 378
Val Pro Asn Lys Gly Val Ile Gly Asp Pro Leu Leu Thr Leu Phe Val
      40             45             50             55
gcc aga cta aac ttg cag acc aag gag gac aaa tta aag gaa gtc ttt 426
Ala Arg Leu Asn Leu Gln Thr Lys Glu Asp Lys Leu Lys Glu Val Phe
      60             65             70
tcc cgc tat ggt gac atc cgg cgg ctt cgg ctg gtc agg gac ttg gtc 474
Ser Arg Tyr Gly Asp Ile Arg Arg Leu Arg Leu Val Arg Asp Leu Val
      75             80             85
aca ggt ttt tca aag ggc tac gcc ttc atc gaa tac aag gag gag cgt 522
Thr Gly Phe Ser Lys Gly Tyr Ala Phe Ile Glu Tyr Lys Glu Glu Arg
      90             95             100
gcc gtg atc aaa gct tac cga gat gct gat ggc ctg gtt att gac cag 570

```

Ala Val Ile Lys Ala Tyr Arg Asp Ala Asp Gly Leu Val Ile Asp Gln
 105 110 115

cat gag ata ttt gtg gac tac gag ctg gaa agg act ctc aaa ggg tgg 618
 His Glu Ile Phe Val Asp Tyr Glu Leu Glu Arg Thr Leu Lys Gly Trp
 120 125 130 135

atc cct cgg cga ctt gga ggc ggt ctt ggg gga aaa aag gag tct ggg 666
 Ile Pro Arg Arg Leu Gly Gly Gly Leu Gly Gly Lys Lys Glu Ser Gly
 140 145 150

caa ctg aga ttt ggg gga cgg gac cgg cct ttt cga aaa cct att aac 714
 Gln Leu Arg Phe Gly Gly Arg Asp Arg Pro Phe Arg Lys Pro Ile Asn
 155 160 165

ttg cca gtt gtt aaa aac gac ctc tat aga gag gga aaa cgg gaa agg 762
 Leu Pro Val Val Lys Asn Asp Leu Tyr Arg Glu Gly Lys Arg Glu Arg
 170 175 180

cgg gag cga tct cga tcc cga gaa aga cac tgg gac tcg agg aca agg 810
 Arg Glu Arg Ser Arg Ser Arg Glu Arg His Trp Asp Ser Arg Thr Arg
 185 190 195

gat cga gac cat gac agg ggc cgg gag aag aga tgg caa gaa aga gag 858
 Asp Arg Asp His Asp Arg Gly Arg Glu Lys Arg Trp Gln Glu Arg Glu
 200 205 210 215

ccg acc agg gtg tgg ccc gac aat gac tgg gag aga gag agg gac ttc 906
 Pro Thr Arg Val Trp Pro Asp Asn Asp Trp Glu Arg Glu Arg Asp Phe
 220 225 230

aga gat gac agg atc aag ggg agg gag aag aag gaa aga ggc aag tag 954
 Arg Asp Asp Arg Ile Lys Gly Arg Glu Lys Lys Glu Arg Gly Lys
 235 240 245

aggcccaaca gcagaacccc aaagtgaagt tacagtggaa atgagtggag ggggattgtc 1014

tttcaacgca gcgtgagtct aatggttgaa taaaacttac tgatgatcaa aaa 1067

<210> 18
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> HeLa-Zellen

<400> 18
 Met Asn Asp Trp Met Pro Ile Ala Lys Glu Tyr Asp Pro Leu Lys Ala
 1 5 10 15

Gly Ser Ile Asp Gly Thr Asp Glu Asp Pro His Asp Arg Ala Val Trp
 20 25 30

Arg Ala Met Leu Ala Arg Tyr Val Pro Asn Lys Gly Val Ile Gly Asp
 35 40 45

Pro Leu Leu Thr Leu Phe Val Ala Arg Leu Asn Leu Gln Thr Lys Glu
 50 55 60

Asp Lys Leu Lys Glu Val Phe Ser Arg Tyr Gly Asp Ile Arg Arg Leu
 65 70 75 80

Arg Leu Val Arg Asp Leu Val Thr Gly Phe Ser Lys Gly Tyr Ala Phe
 85 90 95

Ile Glu Tyr Lys Glu Glu Arg Ala Val Ile Lys Ala Tyr Arg Asp Ala
 100 105 110

Asp Gly Leu Val Ile Asp Gln His Glu Ile Phe Val Asp Tyr Glu Leu
 115 120 125

Glu Arg Thr Leu Lys Gly Trp Ile Pro Arg Arg Leu Gly Gly Gly Leu
 130 135 140

Gly Gly Lys Lys Glu Ser Gly Gln Leu Arg Phe Gly Gly Arg Asp Arg
 145 150 155 160

Pro Phe Arg Lys Pro Ile Asn Leu Pro Val Val Lys Asn Asp Leu Tyr
 165 170 175

Arg Glu Gly Lys Arg Glu Arg Arg Glu Arg Ser Arg Ser Arg Glu Arg
 180 185 190

His Trp Asp Ser Arg Thr Arg Asp Arg Asp His Asp Arg Gly Arg Glu
 195 200 205

Lys Arg Trp Gln Glu Arg Glu Pro Thr Arg Val Trp Pro Asp Asn Asp
 210 215 220

Trp Glu Arg Glu Arg Asp Phe Arg Asp Asp Arg Ile Lys Gly Arg Glu
 225 230 235 240

Lys Lys Glu Arg Gly Lys
 245

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、精製されたsnRNPのsnRNAの組成を示す。

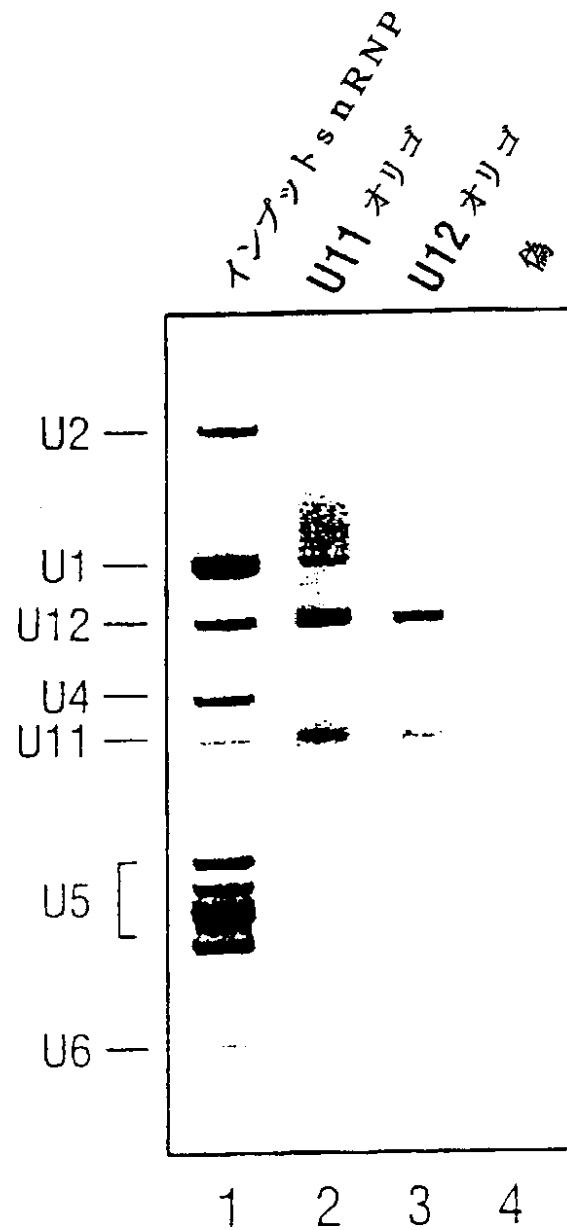
【図2】 図2は、オリゴヌクレオチドを使用して選択されたU11/U12 snRNPのタンパク質組成を示す。

【配列の簡単な説明】

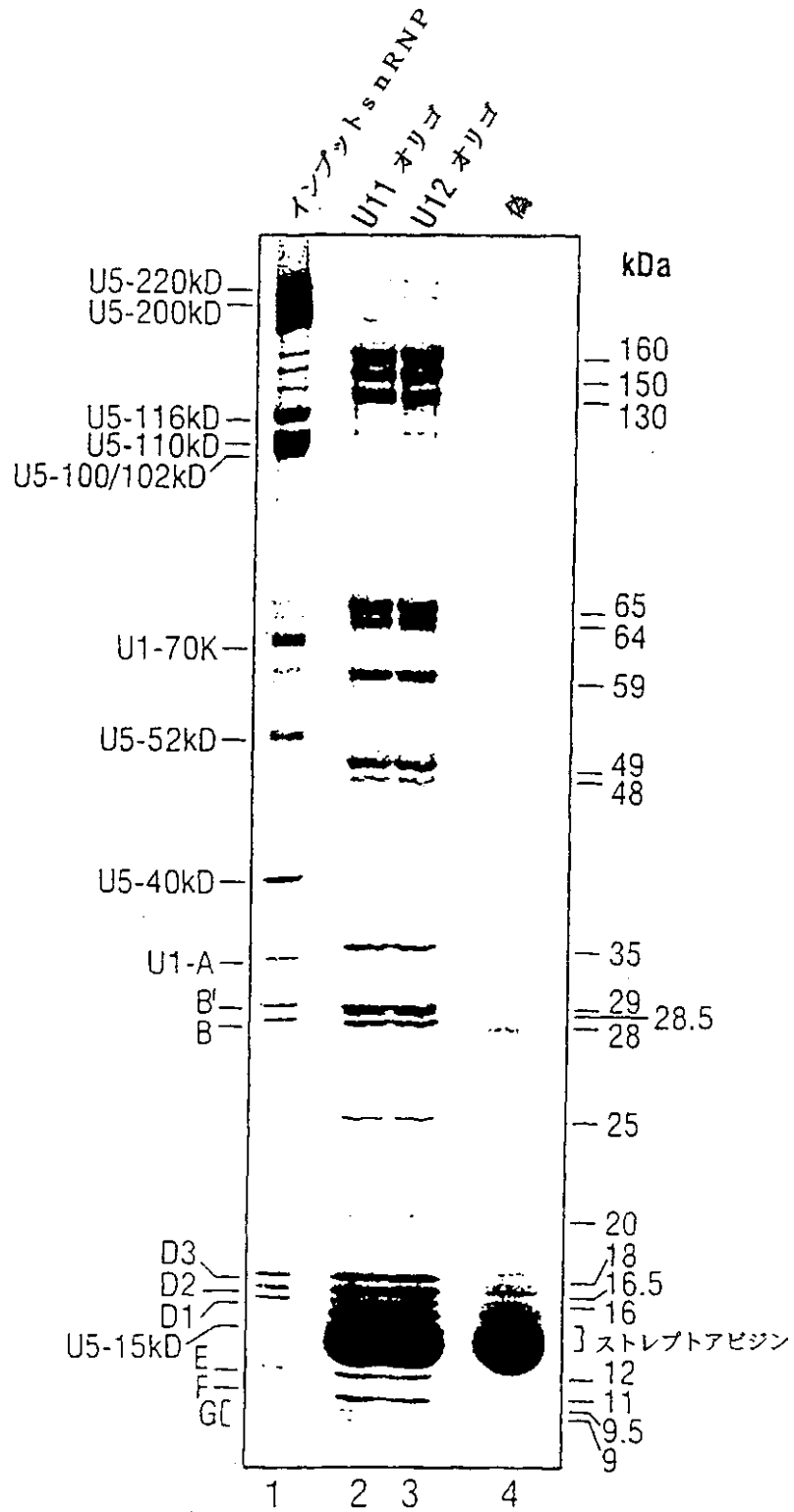
【配列番号17】 配列番号17は、非コード配列を包含するU12会合35 kDタンパク質についてのゲノムDNA配列を示す。コード配列は以下の誘導されたアミノ酸配列により示され、配列番号18に対応する。

【配列番号18】 配列番号18は、246個のアミノ酸を含んでなる、U12会合35 kDタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【図1】



【図2】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年6月11日(2001.6.11)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】 AT-ACスプライソソームのU11/U12 snRNP複合体に会合した35kDタンパク質の機能を有するスプライソソームタンパク質をコードするDNA配列であって、

a) 配列番号18のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA配列；

b) 配列番号17のヌクレオチド配列を含んでなるa)のDNA配列；

c) a)の配列に相補的な配列とハイブリダイズし、U11/U12 snRNP複合体の35kDタンパク質の機能特性を有するタンパク質をコードし得るDNA配列；及び

d) 遺伝暗号がa)又はc)に示される配列に関して縮重しているDNA配列、
からなる群から選択される配列、及び前記配列のフラグメント、並びにa)、b)、c)及びd)に示される配列又はそれらのフラグメントに相補的な配列。

【**請求項2**】 請求項1に記載のDNA配列を含んでなる、組換えDNA分子。

【**請求項3**】 スプライソソームタンパク質をコードするDNAが、原核細胞又は真核細胞において前記タンパク質の発現を可能にする調節配列に連結している、請求項2に記載の組換えDNA分子。

【**請求項4**】 請求項1に記載の配列、又は請求項2又は3のいずれか1項に記載の組換えDNA分子を含んでなるベクター。

【**請求項5**】 請求項2又は3のいずれか1項に記載の組換えDNA分子、

又は請求項4に記載のベクターを含んでなる、ヒトを除く宿主生物。

【請求項6】 原核微生物である、請求項5に記載の宿主生物。

【請求項7】 真核微生物である、請求項5に記載の宿主生物。

【請求項8】 U12スプライソソームのU11/U12 snRNP複合体に会合した35kDタンパク質の機能を有するスプライソソームタンパク質であって、請求項1に記載の配列のいずれかにコードされる前記スプライソソームタンパク質。

【請求項9】 請求項8に記載のスプライソソームタンパク質であって、

a) 配列番号18のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

b) a)に記載の配列と比較して、1つ又はそれ以上のアミノ酸の欠失、アミノ酸の置換、アミノ酸の付加及び/又はアミノ酸の挿入を有するポリペプチド、からなる群から選択される、前記スプライソソームタンパク質。

【請求項10】 請求項1に記載のDNA配列又はそのフラグメントの、相同なDNA配列又はRNA配列を単離するための使用。

【請求項11】 請求項8に記載のスプライソソームタンパク質の、スプライシングモジュレーターを発見するための使用。

【請求項12】 請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸及び/又は請求項8又は9のいずれか1項に記載のスプライソソームタンパク質、並びに医薬的に許容される添加剤及び/又は賦形剤を適宜含んでなる医薬品。

【請求項13】 がん、自己免疫疾患、特にグレーブス病、脊髄性筋萎縮症、' -サラセミア、c - e r bがん遺伝子に関連したがん、C型肝炎感染、単純ヘルペスウイルス感染、全身性エリスマトーデス、ヘルマンスキー - プドゥラック症候群を治療するための医薬品を製造する方法であって、請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸、及び/又は請求項8又は9のいずれか1項に記載のスプライソソームタンパク質を、医薬的に許容される添加剤及び/又は賦形剤とともに製剤化することを含む、前記方法。

【請求項14】 請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸及び/又は請求項8又は9のいずれか1項に記載のスプライソソームタンパク質、並びに医薬的に許容される添加剤及び/又は賦形剤を適宜含んでなる診断薬。

【請求項15】 グレーブス病、脊髄性筋萎縮症、' - サラセミア、c - e r bがん遺伝子に関連したがん、C型肝炎感染、単純ヘルペスウイルス感染、全身性エリスマトーデス、ヘルマンスキー - プドゥラック症候群を診断するための診断薬を製造する方法であって、請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸、及び/又は請求項8又は9のいずれか1項に記載のスプライソソームタンパク質に、医薬的に許容される担体を添加することを含む、前記方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/EP 00/03949
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N5/10 C12N1/21 C07K14/47 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, STRAND, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL SEQUENCES 'Online! Accession No. Q16560, 1 November 1996 (1996-11-01) ADAMS D.S. ET AL.: "UI-SNRNP binding protein homolog" XP002146486 cited in the application the whole document	1-16
P, X	WILL C.L. ET AL.: "Identification of both shared and distinct proteins in the major and minor spliceosomes." SCIENCE, vol. 284, 18 June 1999 (1999-06-18), pages 2003-2005, XP002146485 the whole document	1-16
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 4 September 2000		Date of mailing of the international search report 18/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Galli, I

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/03949

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 561 222 A (KEENE JACK D ET AL) 1 October 1996 (1996-10-01) the whole document -----	1-16

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/03949

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5561222 A	01-10-1996	US 5866680 A	02-02-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
A 6 1 P	25/00	A 6 1 P	31/22	4 H 0 4 5
	31/14		35/00	
	31/22		37/02	
	35/00	C 0 7 K	14/47	
	37/02	C 1 2 N	1/15	
C 0 7 K	14/47		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 Q	1/68	A
	1/21	G 0 1 N	33/53	M
	5/10		33/564	
C 1 2 Q	1/68		33/566	
G 0 1 N	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/564		5/00	A
	33/566	A 6 1 K	37/02	

(72)発明者 ウィル, シンディ
 ドイツ連邦共和国37073 ゲッティンゲン,
 ニコラオスベルガー・ヴェーグ 72

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA03 CA04
 DA06 EA04 GA11 HA01 HA12
 HA15
 4B063 QA01 QA18 QR55 QR62 QS25
 QS34 QX04
 4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14
 BA02 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08
 BA22 BA23 CA27 CA29 DC50
 NA14 ZA012 ZA752 ZA942
 ZB072 ZB262 ZB332
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA14
 ZA01 ZA75 ZA94 ZB07 ZB26
 ZB33
 4H045 AA10 AA11 AA30 CA41 EA22
 EA28 EA29 EA50 EA51 EA52
 FA74 HA05

专利名称(译)	Spliceosomal蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2003501085A	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2001502573	申请日	2000-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	阿温提斯研究技术两合公司		
申请(专利权)人(译)	安万特公司的研究UND技术有限公司UND岛卡格		
[标]发明人	バオアーベツティア リュウハーマンラインハルド ウィルシンディ		
发明人	バオアー,ベツティア リュウハーマン,ラインハルド ウィル,シンディ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K48/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P31/14 A61P31/22 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/564 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P21/00 A61P25/00 C07K14/47		
FI分类号	A61K31/7088 A61K48/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P31/14 A61P31/22 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/564 G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX04 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065 /BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA27 4C084/CA29 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084 /ZA012 4C084/ZA752 4C084/ZA942 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA75 4C086/ZA94 4C086/ZB07 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/EA22 4H045 /EA28 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/HA05		
优先权	19925668 1999-06-04 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及剪接体蛋白，其与U12依赖性剪接体的U11 / U12 snRNP复合体缔合并对所述剪接体具有特异性。该蛋白质和编码该蛋白质的DNA序列可用作特定的自身免疫疾病和由剪接装置缺陷引起的疾病的诊断剂。

