

(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 - 532424

(P2003 - 532424A)

(43)公表日 平成15年11月5日(2003.11.5)

(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 39/395	D 2 G 0 4 5 N 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		45/00	4 B 0 2 9
39/395		48/00	4 B 0 5 0
		A 6 1 P 3/10	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求(全119数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 582544(P2001 - 582544)

(86)(22)出願日 平成13年5月11日(2001.5.11)

(85)翻訳文提出日 平成14年11月11日(2002.11.11)

(86)国際出願番号 PCT/FR01/01441

(87)国際公開番号 W001/085955

(87)国際公開日 平成13年11月15日(2001.11.15)

(31)優先権主張番号 00/06030

(32)優先日 平成12年5月11日(2000.5.11)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 イスタック

I S T A C

フランス共和国,エフ - 59000 リール,リュ

デュ プロフェスール カルメット,1

(71)出願人 アンスティチュ パストゥール ドゥ リ

ール

I N S T I T U T P A S T E U R D

E L I L L E

フランス共和国,エフ - 59000 リール,リュ

デュ プロフェスール カルメット,1

(74)代理人 弁理士 太田 恵一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 R H 1 1 6 ポリペプチドとその断片、および前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと治療の用途

(57)【要約】

本発明は、R H 1 1 6 と命名された、RNAヘリカーゼ (D E X H ボックス) との配列相同性を示す新規な 1 1 6 k D a のポリペプチドと、その断片、c D N A のクローニング、および前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含むクローニングベクターおよび/または発現ベクター、前記ベクターで形質転換された細胞、および前記ポリペプチドに対する特異的な抗体に関するものである。本発明はまた、前記ポリペプチドとポリヌクレオチドを検出、かつ/または分析するための方法、対応する診断キット、そして予防および/または治療処置のための薬品として使用可能なリガンドや化合物のスクリーニングの方法に関するものでもある。

【特許請求の範囲】

【請求項1】アミノ酸配列SEQ ID No 2の、RH116と命名された単離されたポリペプチド。

【請求項2】単離されたポリペプチドであって、

- a) 配列SEQ ID No 2のポリペプチド；
- b) a)で規定されたアミノ酸配列のポリペプチドの変異ポリペプチド；
- c) a)またはb)で規定されたポリペプチドと相同であり、a)の前記ポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド；
- d) a)で規定されたポリペプチドの、少なくとも15の連続するアミノ酸断片；
- e) a)で規定されたポリペプチドの生物学的に活性な断片から選ばれたポリペプチドを含むことを特徴とする、ポリペプチド。

【請求項3】RNAヘリカーゼスーパーファミリーに属する保存されたドメインを少なくとも一つ有することを特徴とする、請求項1または2のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項4】前記保存されたドメインが、以下：

- ・RNAヘリカーゼスーパーファミリーのドメインIに対応するG - GKT配列
- 、
- ・RNAヘリカーゼスーパーファミリーのドメインVに対応するDEAD、DE - D、DEAH配列

から選ばれることを特徴とする、請求項3に記載のポリペプチド。

【請求項5】請求項1に記載のポリペプチドをコードすることを特徴とする、精製または単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】配列SEQ ID No 1の請求項5に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】以下：

- a) 配列SEQ ID No 1；
- b) GenBankデータベースでアクセッション番号No. AC007750およびNo. AC0108176で識別される登録核酸配列、およびEMBL

データバンクでアクセッション番号No. AW589567、No. AW152541およびAW189584で識別される登録核酸配列を除く、配列SEQ ID No 1の少なくとも15の連続するヌクレオチド断片の配列；

c) a)またはb)で規定された配列で最適なアラインメントを行った後、少なくとも85%のパーセンテージ同一性を示す核酸配列；

d) a)、b)またはc)で規定されたような配列に対応する相補的配列またはRNA配列

から選ばれたポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項8】核酸配列の増幅または重合のために、プライマーとして、請求項7に記載のポリヌクレオチドを使用する方法。

【請求項9】核酸配列の検出のために、プローブとして、請求項7に記載のポリヌクレオチドをインビトロで使用する方法。

【請求項10】対応するタンパク質産物の発現を制御するために、センス核酸配列またはアンチセンス核酸配列として、請求項7に記載のポリヌクレオチドをインビトロで使用する方法。

【請求項11】前記ポリヌクレオチドが、放射性化合物または非放射性化合物によって直接または間接に標識されることを特徴とする、請求項8、9、10のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項12】組換えクローニングベクターおよび/または組換え発現ベクターであって、請求項5から7のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含むか、もしくは請求項1から4のいずれか一つに記載のポリペプチドをコードする組換えベクター。

【請求項13】前記ポリヌクレオチドが、前記ベクターに逆方向に挿入されることを特徴とする、請求項5から7のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含む、組換えアンチセンス発現ベクター。

【請求項14】請求項12と13のいずれかに記載のベクターによって形質転換されていることを特徴とする、宿主細胞。

【請求項15】請求項14に記載の細胞を含むことを特徴とする、ヒトを除

く動物。

【請求項16】組換えポリペプチドの作成方法であって、請求項14に記載の宿主細胞を、前記組換えポリペプチドの発現、および場合によっては分泌を可能にする条件下で培養することと、前記組換えポリペプチドを回収することを特徴とする方法。

【請求項17】請求項16に記載の方法によって得られる組換えポリペプチド。

【請求項18】請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドを選択的に結合することを特徴とする、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体およびその断片。

【請求項19】生物サンプルにおける、請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドの検出および/または分析の方法であって、以下の手順：

- a) 生物サンプルを請求項18に記載の抗体と接触させること、
 - b) 形成された抗原 - 抗体複合体を実証すること、
- を含むことを特徴とする方法。

【請求項20】免疫反応により、生物サンプルにおいて、請求項19に記載の方法を実行するための試薬キットであり、以下の要素：

- a) 請求項18に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、
 - b) 場合によっては、免疫反応に好都合な培地を構成するための試薬、
 - c) 免疫反応の際に生じた抗原 - 抗体複合体の検出を可能にする試薬、
- を含むことを特徴とする、試薬キット。

【請求項21】生物サンプルにおける、請求項5から7のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの検出および/または分析の方法であって、以下の手順：

- a) 分析すべき生物サンプルからDNAを単離するか、もしくは生物サンプルのRNAからcDNAを得ること、
 - b) 請求項8に記載のプライマーを用いてDNAを特異的に増幅すること、
 - c) 増幅産物を分析すること、
- を有することを特徴とする方法。

【請求項22】生物サンプルにおける、請求項5から7のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの検出および/または分析の方法であって、以下の手順：

- a) 請求項5から7のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを、生物サンプルと接触させること、
 - b) 前記ポリヌクレオチドと生物サンプルの核酸の間に形成されたハイブリッドを、検出および/または分析すること、
- を有することを特徴とする方法。

【請求項23】請求項5から7のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とするDNAチップ。

【請求項24】請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチド、または請求項18に記載の抗体を含むことを特徴とするタンパク質チップ。

【請求項25】請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドの細胞発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性に影響を与える化合物のスクリーニング方法であって、以下の手順：

- a) 請求項14に記載の宿主細胞、および請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドを発現または含有する、好ましくはヒトの、真核細胞から選ばれた細胞を、前記細胞に浸透または導入されることのできる一つまたは複数の潜在的化合物と接触させること、
 - b) 細胞発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性を検出および/または測定すること
- を有するスクリーニング方法。

【請求項26】請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドのRNAヘリカーゼ活性に影響を与える化合物のスクリーニング方法であり、以下の手順：

- a) 前記ポリペプチドを、RNAヘリカーゼ活性の実施に必要な試薬の存在下で、一つまたは複数の潜在的化合物と接触させること、
 - b) RNAヘリカーゼ活性を検出および/または測定すること
- を有するスクリーニング方法。

【請求項27】前記スクリーニングされた化合物が、請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドの発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性を下げることを特徴とする、請求項25または26のいずれかに記載の方法。

【請求項28】請求項27に記載の方法によって得られる化合物であり、以下：

- a) 請求項10に記載のアンチセンス核酸配列として用いられる、請求項5から7のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド、
 - b) 請求項13に記載のアンチセンス発現ベクター、
 - c) 請求項18に記載の抗体、
 - d) 請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドのアンタゴニスト、
 - e) ムラミルペプチド
- から選ぶことを特徴とする化合物。

【請求項29】ムラミルペプチドはムラプチドであることを特徴とする、請求項28に記載の化合物。

【請求項30】前記スクリーニングされた化合物が、請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドの発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性を上げることを特徴とする、請求項25または26のいずれかに記載の方法。

【請求項31】請求項30に記載の方法を用いて得られる、請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドのアゴニスト化合物。

【請求項32】請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチドの機能的な活性に影響する化合物のスクリーニング方法であり、以下の手順：

- a) 前記ポリペプチドを、核および/またはミトコンドリアのRNAスプライシング反応、RNA編集反応、rRNAプロセッシング反応、翻訳開始反応、核mRNAの細胞質への移出反応、そしてmRNA分解反応の中から選ばれた反応を実施するのに必要な試薬の存在下で、一つまたは複数の潜在的化合物と接触させ

ること、

b) 前記反応を検出および/または測定すること。

を有することを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項33】以下：

a) 請求項1から4または17のいずれか一つに記載のポリペプチド、

b) 請求項5から7のいずれか一つに記載ポリヌクレオチド、

c) 請求項12または13に記載のベクター、

d) 請求項14に記載の細胞、

e) 請求項18に記載の抗体、

f) 請求項28、29および31のいずれか一つに記載の化合物、

から薬品として選ばれることを特徴とする化合物。

【請求項34】癌、急性または慢性の感染症、遺伝性遺伝子疾患、免疫および自己免疫疾患、リウマチ、関節炎、アテローム性動脈硬化症、骨粗鬆症および糖尿病からなるグループから選ばれた病の予防および/または治療、そして臓器移植拒絶反応の予防を目的とした薬品として、請求項33に記載の化合物。

【請求項35】前記感染症は、AIDSとC型肝炎から選ばれることを特徴とする、請求項34に記載の化合物。

【請求項36】ウイルス病の治療を目的とした薬品の調製のために、請求項33に記載の化合物を使用する方法。

【請求項37】ウイルス病が、後天性免疫不全症候群(AIDS)であることを特徴とする、請求項36に記載の使用方法。

【請求項38】治療上有効な量の請求項33に記載の化合物と薬学的に受け入れ可能な賦形剤とを含有することを特徴とする、AIDSの予防と治療の処置用の薬学的組成物。

【請求項39】抗ウイルス治療、好ましくは抗HIV治療において、同時に、別々にまたは時間とともに分割して使用する組み合わせ薬品のように、請求項33に記載の少なくとも一つの化合物と、少なくとも一つの他の抗ウイルス剤とからなる薬品。

【請求項40】ウイルス病が、B型またはC型肝炎であることを特徴とする

、請求項36に記載の使用方法。

【請求項41】患者の体内におけるワクチンへの免疫反応を引き起こし、またはそれを増進させることを目的とした薬品を調製するために、請求項5から7のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド、および/または請求項1から4および17のいずれか一つに記載のポリペプチド、および/または請求項1から4および17のいずれか一つに記載のポリペプチドのアゴニストを使用する方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、RH116と命名されたRNAヘリカーゼ(DEXHボックス)との配列相同性を示す新規な116kDaポリペプチドとその断片、cDNAおよび前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのクローニング、前記ポリヌクレオチドを含むクローニングベクターおよび/または発現ベクター、前記ベクターで形質転換された細胞、および前記ポリペプチドに対する特異的な抗体に関するものである。本発明はまた、前記ポリペプチドとポリヌクレオチドの検出および/または分析の方法、対応する診断キット、およびリガンド、ならびに予防および/または治療処置用の医薬品として使用可能な化合物のスクリーニング方法に関するものでもある。

【0002】

ムラミルペプチドは、合成免疫調節薬の中でも、単球/マクロファージ系の細胞に数多くの免疫薬理学的効果を示したものであり、それらの、感染に非特異的な抵抗性を高め、マクロファージの殺腫瘍活性を増進し、またワクチンのアジュバントとしても作用する。ムラブチド(MB)は、ムラミルジペプチド(MDP)の類似体であって、特に有望な生物学的特徴や、動物およびヒトにおける良好な耐性を理由に選択したものである。実際、MDPやその他の多くの類似体とは異なり、健常者の有志や癌患者における臨床研究の際に、MBは発熱性ではなく、炎症反応を誘発せず、重篤な毒性を示さなかったことが実証済である。

【0003】

その生物学的能力により、MBはAIDS(後天性免疫不全症候群)の分野における有望な抗ウイルス剤である。実際、MBはヒトの免疫不全ウイルス(HIV)の複製を、マクロファージや樹状細胞、同様に、感染した患者の末梢血単核細胞(PBMC)においても阻害する。従って、これら生物学的特性を考慮すると、免疫調節薬MBを対象にしたものには、「HIVのような後天性免疫不全ウイルスの複製を100%まで阻害できるムラミルペプチド組成物」と題されたフランス特許第FR2724845号がある。さらに、HIV陽性の患者について最後まで行ったフェーズIとフェーズIIa臨床試験により、MBの良好な臨床

的耐性が実証されている。

【0004】

本発明者らが実証したところによると、MBは、フィトヘマグルチニン（PHA）で活性化され、そしてインターロイキン2（IL-2）と培養された、CD8リンパ球が減少した患者のPBMCsにおけるウイルスの複製を強く抑制する効果を発揮する。実際、MBは培養物の上澄みにおけるHIVのウイルスタンパク質p24のレベルを70から100%阻害する。この効果は、（スプライシングされない、および一か所スプライシングされた）ウイルスのメッセンジャーRNAの発現レベルと相関関係を有する。さらに、分泌されたサイトカインとケモカインの特性の分析が示すところによると、MBは、HIV複製の阻害剤として知られているケモカインの生成を誘発した。しかしながらこの誘発は、MBの抑制効果と完全な相関関係にあるとは思われない。MBによるHIVの複製の抑制は、ケモカインの生成の誘導のみを必要とするのではないが、それはMBがプロウイルスDNAおよびウイルス転写のレベルにも関わっているからである。これらの同じ細胞培養におけるMBの毒性の欠如は、本発明者らが検証済みであり、彼らが指摘していることは、培養開始時に生きている細胞の数が変わらないままでいるだけでなく、さらに培養終了時に増えているようでもあるということである。

【0005】

従って、本発明者らが得た結果から示唆されるのは、MBはサイトカイン、あるいは今日まで識別されていない他の因子の生成を誘発することであり、そのような因子がHIVの複製に対してサプレッサー活性をもつということである。

【0006】

ウイルス複製の調節に関わるこれらの新しい因子を識別するために、本発明者らは、「ディファレンシャルディスプレイ-RT-PCR（DD-RT-PCR）」という、2つの基本的な手順からなる方法を使用した。第一の手順は、全細胞RNAの逆転写（RT）を行うことであり、ポリA尾部をもつRNAすべての相補的DNAが得られるようにする。ついで、第二の手順は、放射性同位元素で標識されたヌクレオチドの存在下で、基質の役割を果たすcDNAと様々なプラ

イマー対でポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅を行うことである。つぎにPCR産物を電気泳動によりゲル上で分離する。差次的に増幅した断片は、ゲルから切り取り、再び増幅し、そしてクローニングしてシーケンスする。

【0007】

HIV陽性の患者のPBMCsを用いて行われるDD-RT-PCRによって、本発明者らは、MBによる処理の後、差次的に発現した130を越えるcDNA断片を選ぶことができた。これらの断片を、ベクターpCR2.1(Invitrogen社)においてサブクローニングし、つぎに自動シーケンス(ABI Prism 377, Perkin-Elmer)によりシーケンスした。配列は、データバンクとNCBI社のBasic Local Alignment Search Tool(Blast 2)サーバーとを用いて、相同性を調べるように分析された。

【0008】

本発明者らは、RNAヘリカーゼと配列相同性を示す新規なポリペプチドの存在を突き止めた。

【0009】

RNAヘリカーゼ(文献Critical Rev. In Biochemistry and Molecular Biology(1998)33(4):259-296参照)は、RNAが中心的な役割を果たす全てのタイプの生物システムに存在するタンパク質の膨大なファミリーを代表するものである。該RNAヘリカーゼは、広い範囲の生物に偏在的に分布しており、ミトコンドリアと核でのスプライシング過程、RNA編集(RNA editing)、rRNAプロセッシング(rRNA processing)、翻訳の開始、核mRNAの移出およびmRNAの分解に関連している。

【0010】

RNAヘリカーゼは、細胞の分化と発生にとって不可欠の要素をなし、その中には、一本鎖RNAウイルスゲノムの転写と複製において、役割を果たすものもある。

【0011】

RNAヘリカーゼは、ヌクレオチド5' - 三リン酸を加水分解することのできる酵素の大きなグループに属している。

【0012】

DNA依存ATPアーゼの配列の比較検討は、ATPアーゼ AモチーフによるNTPアーゼの新しい分類を可能にした。したがって、DNAヘリカーゼは、別名「ウォーカー」モチーフ(G - X - X - X - X - G - K - T)とも呼ばれるAモチーフに特徴づけられ、スーパーファミリーIに属しているが、RNAヘリカーゼはこのドメイン(A - X - X - G - X - G - K - T)で変異を示し、近接するスーパーファミリーIIを形成する(Gorbalenya et al., 1988)。

【0013】

保存された配列を比較すると、様々なRNAヘリカーゼの間に密接な関連が見られ、示唆されるのは、これらのタンパク質は共通の祖先から派生していることである。

【0014】

事実、RNAヘリカーゼスーパーファミリーIIの様々なメンバーのアミノ酸配列をアラインすることにより、高度に保存された八つのドメインの存在によって特徴付けられる共通の中心領域が明らかになった。現在のところ、八つの保存されたドメイン(ドメインI、II、VIそしてVII)のうちの四つの生化学的機能が解明されている。「DEADボックス」モチーフ(「DEAD Box」)(D - E - A - D : Asp - Glu - Ala - Asp)と呼ばれる、八つの構造要素の五番目において配列相同性が高いことを考慮すれば、スーパーファミリーIIに属するRNAヘリカーゼもまた、「DEADボックス」タンパク質と呼ばれる(Linder et al., 1989)。相違するDEADモチーフが存在することにより、RNAヘリカーゼのスーパーファミリーIIをサブグループに再分割することが可能となる。現在のところ、三つのサブグループが識別されている。最初のサブグループは、従来のDEADボックスタンパク質で構成されており、他の二つのサブグループは、相違するATPアーゼ Bモチーフのために、DEAHおよびDEXHと呼ばれている。

【0015】

保存された中心配列の両側で、RNAヘリカーゼのアミノ-末端およびカルボキシ-末端を特徴づけるのは、長さと内容の変化する配列である。そこから示唆されることは、これらの相違する領域が個別のタンパク質機能を担当しており、それに対し、高度に保存されたドメインがRNAヘリカーゼ活性に関わっているということである。

【0016】

ドメインI (A/G-X-X-G-X-G-K-T:Ala/Gly-X-X-Gly-X-Gly-lys-Thr)は、ATPアーゼのAモチーフとして記載されている(Walker et al., 1982)。

【0017】

ドメインV、あるいはDEADボックス(L-D-E-A-D-X-X-Leu:Leu-Asp-Glu-Ala-Asp-X-X-leu)は、ATPアーゼ Bモチーフの特異的な形態を示し(Walker et al., 1982)、該モチーフはATP加水分解に関わっていると思われる(Pause and Sonenbery, 1992)。

【0018】

ドメインVI、またはSATモチーフ(Ser-Ala-Thr)は、DEADボックスの近傍に位置し、そしてRNAヘリカーゼに特異的なものと思われる。

【0019】

ドメインVIIを特徴づけるのは、YIHRIGRXXXRボックス(Tyr-Ile-His-Arg-Ile-Gly-Arg-X-X-Arg)であり、該ボックスが示すモチーフは、SATと同様にRNAヘリカーゼに特異的なものである。翻訳開始因子eIF-4Aのインビトロでの実験は、このドメインがRNA結合に重要であることを示す。

【0020】

それゆえ本発明の対象は、アミノ酸配列SEQ ID No2の「RH116」と命名された、単離されたポリペプチド(116kDaのRNAヘリカーゼ)

である。この配列は保存された共通ドメインを含むが、該ドメインは当業者には容易に識別できるものであって、かつ該ドメインは本発明のRH116ポリペプチドを、DEAHまたはDEXHサブグループに分類することを可能にする(Luking et al., (1998)参照)。これらの保存された共通ドメインのうちで、引用すべきは以下のものである：

・配列SEQ ID No 2のアミノ酸332から336に対応し、かつRNAヘリカーゼスーパーファミリーの保存されたドメインI(G-GKT)を構成するGSGKT配列。

・配列SEQ ID No 2のアミノ酸443から446に対応し、サブグループDEXHのRNAヘリカーゼスーパーファミリーの保存されたドメインV(DEH)を構成するDECH配列。

【0021】

これらの二つの保存された共通ドメインは、ATPアーゼ機能に関わっている。

・配列SEQ ID No 2のアミノ酸488から490に対応し、かつサブグループDEAHのRNAヘリカーゼスーパーファミリーの保存されたドメインVI(-A-)を構成するTAS配列。

・配列SEQ ID No 2のアミノ酸820から824に対応し、かつサブグループDEAHのRNAヘリカーゼスーパーファミリーの保存されたドメインVIIを構成するRGRAR配列。

【0022】

これらの二つの保存されたドメイン(ドメインVIとVII)は、RNAヘリカーゼについてより特異的であり、また結合と標的RNAのアンフォールディングを担っている。

【0023】

単離されたポリペプチドを特徴づけるのは、以下のものから選択されたポリペプチドを含むことである。

a) 配列SEQ ID No 2のポリペプチド；

b) a) で規定されたアミノ酸配列のポリペプチドの変異ポリペプチド；

c) a) または b) で規定されたポリペプチドと相同であり、前記 a) のポリペプチドと少なくとも 80% の同一性、好ましくは 85%、87%、90%、95%、97%、98%、99% の同一性を有するポリペプチド；

d) a)、b) または c) で規定されたポリペプチドの少なくとも 15 の連続するアミノ酸、好ましくは 17、20、23、25、30、40、50、100、250 の連続するアミノ酸断片；

e) a)、b) または c) で規定されたポリペプチドの生物学的に活性のある断片。

【0024】

本明細書において、「ポリペプチド」という用語を使用するが、これはタンパク質またはペプチドを等しく指すものである。

【0025】

変異ポリペプチドという用語は、天然に、特にヒトに存在しうる、かつアミノ酸残基の、末端切断、置換、欠失および/または付加に特に対応する、突然変異したポリペプチドの全体を指す。

【0026】

相同ポリペプチドという用語は、天然の RH 116 ポリペプチドと比べて、例えば特に少なくとも一つのアミノ酸の欠失、付加または置換、末端切断、伸長および/またはキメラ融合のような幾つかの修飾を示すポリペプチドを指す。相同ポリペプチドの中でも、好ましいのはアミノ酸配列が、本発明によるポリペプチドのアミノ酸配列と、少なくとも 80% の同一性、好ましくは少なくとも 85%、87%、90%、93%、95%、97%、98%、99% の同一性を示すものである。置換の場合には、一つまたは複数の連続または非連続のアミノ酸を、「同等の」アミノ酸で置換できる。「同等の」アミノ酸という表現は、ここでは、基本構造のアミノ酸の一つと置換しうる一切のアミノ酸を指すが、ただし、アミノ酸配列 SEQ ID No 2、またはその断片のうちの一つにそのアミノ酸配列が含まれているようなポリペプチドを認識する能力のある抗体をインビボで誘導するような、対応するポリペプチドに本質的な機能的特徴または特性、例えば生物学的活性を変更せずに置換するものである。これらの同等のアミノ酸が決

定されうるのは、置換するアミノ酸との構造的な相同性に基づいて、あるいは、様々なポリペプチドが生成できる交わった生物活性についての解析結果に基づいてである。例として言及するのは、結果として生じる対応する修飾されたポリペプチドの生物活性に深刻な変更をもたらすことなく実行されうる置換の可能性であるが、例えば、ロイシンをバリンまたはイソロイシンで、アスパラギン酸をグルタミン酸で、グルタミンをアスパラギンで、アルギニンのリジンで置換えることなどがあり、当然のことながら、同じ条件で逆の置換を行うことも考えられる。

【0027】

生物学的に活性な断片という表現は、特にRNAヘリカーゼ活性を有するという点で、本発明によるポリペプチドの機能的特徴または特性の少なくとも一つを有する、本発明によるポリペプチドのアミノ酸配列の断片を特に指す。本発明による変異ポリペプチド、相同ポリペプチドまたはポリペプチド断片は、RNAヘリカーゼ活性の少なくとも10%、好ましくは20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%を有する。当業者に知られている様々なプロトコルが、本発明によるポリペプチドのRNAヘリカーゼ活性を測定するために記述されているが、注目すべきは、Lain et al. (1990) および Lee et Hurwitz (1993) の記事である。以下の例は、RH116タンパク質のペプチドドメインに応じたこのタンパク質の生物学的機能を提案するものであり、それにより、当業者が生物活性のある断片を識別できるようにするためのものである。

【0028】

ポリペプチド断片という用語は、少なくとも15の連続するアミノ酸、好ましくは17、20、23、25、30、40、50、100、250の連続するアミノ酸からなるポリペプチドを指す。タンパク質分解酵素や化学的試薬による前記ポリペプチドの分断によって、あるいは前記ポリペプチドを非常に酸性の強い環境に置くことによって得られた本発明によるポリペプチド断片もまた、本発明の一部をなす。

【0029】

本発明のポリペプチドは好ましくは、配列SEQ ID No 2からなるポリペプチドであるか、あるいは最適なアラインメントを施した後で、配列SEQ ID No 2と少なくとも80%の同一性、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、98%そして99%の同一性を有する配列である。「最適なアラインメントを施した後で、基準となる配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、98%そして99%のパーセンテージ同一性を示すアミノ酸配列のポリペプチド」という表現は、基準となるポリペプチドと比べて、例えば特に一つまたは複数の欠失または末端切断、伸長、キメラ融合および/または一つまたは複数の置換というような、幾つかの修飾を示すポリペプチドを指す。

【0030】

最適なアラインメントを施した後で、配列SEQ ID No 2または本発明によるそれらの断片の一つと、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、98%そして99%のパーセンテージ同一性を示すアミノ酸配列のポリペプチドの中で好ましいのは、上記のような変異ペプチド配列によってコードされた変異ポリペプチドであり、とりわけ配列SEQ ID No 2に対して、またはそれらの断片の一つと、少なくとも一つのアミノ酸残基の、末端切断、欠失、置換および/または付加に対応する少なくとも一つの突然変異を示すアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、さらに望ましいのは、一つの病状に関連する突然変異をもつ変異ポリペプチドである。

【0031】

本発明のポリペプチドの特徴は、RNAヘリカーゼスーパーファミリーに属する保存されたドメインを少なくとも一つ有することであり、そのようなドメインは、好ましくはドメインIに対応するG - G K T配列、ドメインVに対応するD E A D、D E - DおよびD E A H配列、ドメインVIに対応するS A Tおよび - A - 配列、そしてドメインVII I I Iに対応するY I H R I G R R、H R I G R - R、 - R - G R - - Rそして - - - G R配列から選ばれる。

【0032】

本発明はまた、上記のような配列SEQ ID No 2のポリペプチドをコー

ドすることを特徴とする、精製され、または単離されたポリヌクレオチドに関するものでもある。好ましくは、本発明によるポリヌクレオチドは、配列SEQ ID No 1を有するものである。

【0033】

本発明の精製され、または単離されたポリヌクレオチドの特徴は、ポリヌクレオチドが下記から選ばれることにある：

- a) SEQ ID No 1；
- b) GenBankデータバンクにおけるアクセッション番号No. AC007750およびNo. AC0108176で識別される核酸配列、また95417pbのゲノム配列、さらにEMBLデータバンクにおけるアクセッション番号No. AW589567、No. AW152541およびNo. AW189584で識別される登録された核酸配列も除く、配列SEQ ID No 1の少なくとも15の連続するヌクレオチド、好ましくは少なくとも18、21、24、27、30、35、40、50、75、100の連続するヌクレオチド断片の配列；
- c) a) または b) で規定された配列と、最適なアラインメントを行った後に、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、98%そして99%のパーセンテージ同一性を示す核酸配列；
- d) a)、b) または c) で規定されたような配列に対応する、相補的配列またはRNA配列。

【0034】

核酸、ヌクレオチド配列または核酸配列、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド配列、そしてヌクレオチド配列という用語は、本明細書においては無差別に用いられるが、変更されるかもしくはされない正確な一連のヌクレオチドを指し、それは核酸の断片または領域を規定することを可能にし、天然ではないヌクレオチドを含むことも、また含まないこともあり、そして二本鎖DNA、一本鎖DNA、そして前記DNAの転写産物、および/またはRNA断片に同様に対応することもできる。

【0035】

理解されるべきは、本発明は、天然の染色体環境、すなわち天然の状態でのヌ

クレオチド配列に関するものではないことである。本発明は、単離され、かつ/または精製された配列に関するものであり、つまり直接または間接に、例えばコピーにより採取されたものであって、その環境は少なくとも部分的に変更されている。したがって、化学合成によって得られた核酸をも指す。

【0036】

相補的配列のポリヌクレオチドという表現は、そのヌクレオチドがSEQ ID No 1のヌクレオチド、またはSEQ ID No 1の一部のヌクレオチドに相補的であり、かつ逆方向の、一切のDNAを指す。

【0037】

本発明の意味において、二つの核酸配列または二つのアミノ酸配列における「パーセンテージ同一性」という用語は、最善のアラインメントをした後に得られる、比較すべき二つの配列の間で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の割合を指し、この割合は純粹に統計的であり、また二つの配列間の差異は無秩序に、そしてその配列の全長にわたって分布している。「最善のアラインメント」または「最適のアラインメント」という用語は、以下のように決定されたパーセンテージ同一性が最高になるようなアラインメントを指す。二つの核酸配列またはアミノ酸配列間の配列の比較は、従来、それらを最適な方法でアラインした後、これらの配列を比較することにより行われているのであり、前記比較は、セグメントまたは「比較の窓」ごとに行われ、それにより配列が類似する局所的な領域を識別し、そして比較することになる。その比較のためにこれらの配列を最適にアラインすることは、手動でやる以外にも、Smith et Waterman (1981)の局所的相同アルゴリズムによって、Neddleman et Wunsch (1970)の局所的相同アルゴリズムによって、Pearson et Lipman (1988)の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムを用いるコンピューターソフトウェア(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIに記載のGAP、BESTFIT、BLAST P、BLAST N、FASTAおよびTFASTA)などによって行うことができる。最適のアラインメントを

得るために、B L O S U M 62行列と共に、B L A S Tプログラムを用いることが好ましい。P A MまたはP A M 2 5 0行列もまた使用できる。

【0038】

二つの核酸またはアミノ酸配列間のパーセンテージ同一性は、最適にアラインしたこれらの二つの配列を比較することで決定されるが、比較すべき核酸またはアミノ酸配列は、これらの二配列間の最適なアラインメントにとって基準となる配列に対する付加もしくは欠失を含んでいる可能性がある。パーセンテージ同一性の計算は、二つの配列の間でヌクレオチドまたはアミノ酸残基が同一となるような同一位置の数を測定し、この同一位置の数を比較した位置の総数で割り、そしてこれら二配列間のパーセンテージ同一性を得るように得られた結果を100倍することでなされる。

【0039】

最適なアラインメントを行った後に、基準となる配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、98%および99%のパーセンテージ同一性を示す核酸配列という表現で示すのは、基準となる核酸配列に対して、例えば特に、ある点において欠失、末端切断、伸長、キメラ融合、および/または置換のような、幾つかの変更を有する核酸配列であり、その核酸配列は、最適なアラインメントを行った後、基準となる核酸配列と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、98%および99%の同一性を示す。好ましくは、その相補的配列が、本発明の配列 S E Q I D N o 1 と特異的にハイブリダイズすることのできる配列を指す。望ましいことは、特異的な、あるいは高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、二つの配列の一方ともう一つの配列に相補的な配列との間で、最適なアラインメントを行った後に、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、98%および99%の同一性を確保できるものであることである。

【0040】

高いストリンジェンシーの条件の下でのハイブリダイゼーションが指すのは、温度とイオン強度の条件を、二つの相補的なDNA断片の間でのハイブリダイゼーションを維持することができるように選択するということである。例としては

、以上に説明したポリヌクレオチド断片を規定するためのハイブリダイゼーション手順の高いストリンジェンシーの条件は、以下であることが好適である。

【0041】

DNA - DNAまたはDNA - RNAハイブリダイゼーションを二つの手順で行う：(1)リン酸緩衝液(20mM、pH7.5)で42℃で3時間のプレハイブリダイゼーションを行うが、該緩衝液は5×SSC(1×SSCは、0.15MNaCl+0.015Mクエン酸ナトリウムの溶液に相当する)、50%のホルムアミド、7%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10×Denhardt's、5%の硫酸デキストラン、そして1%の鮭の精子DNAを含有する；(2)ハイブリダイゼーション自体を20時間、プローブの長さに依存する温度で行い(即ち：プローブの長さ>100ヌクレオチドでは42℃)、続いて2×SSC+2%SDSで20分間20℃での洗浄を2回、0.1×SSC+0.1%SDSで20分間20℃での洗浄を1回行う。最後の洗浄を行うのは、0.1×SSC+0.1%SDSで30分間60℃で、プローブの長さ>100ヌクレオチドに対して行う。規定の長さのポリヌクレオチドについて上記に記述した高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、当業者によって、より長いまたはより短いオリゴヌクレオチドに適用してもよいというのが、Sambrook et al., 1989が示すところである。

【0042】

最適なアラインメントを行った後、本発明の配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、98%および99%のパーセンテージ同一性を示す核酸配列の中で、望ましいのは、SEQ ID No 1、またはそれらの断片の変異した核酸配列、つまり対立遺伝子変異体に対応する核酸配列のすべて、すなわち配列SEQ ID No 1の個々の変異でもある。これらの天然の突然変異した配列は、哺乳類、特にヒトに存在する多形性に、特にある病状の発生につながりかねない多形性に対応するものである。

【0043】

変異した核酸配列という表現が指すのは、一切のRNAまたはcDNAでもあり、これらはそのcDNAが配列SEQ ID No 1を有するゲノム核酸配列

のスプライシング部位の突然変異、かつ/または変異の結果生じるものである。

【0044】

更に具体的には、本発明は、本発明によって精製され、または単離された核酸に関するものであって、その特徴は、該核酸が、配列SEQ ID No 1の一つ、その相補的配列、またはSEQ ID No 1に対応するRNA配列を有し、あるいはそれらから構成されていることである。本発明による核酸配列からなることを特徴とするプライマーまたはプローブもまた、本発明の一部をなす。したがって、核酸配列を検出し、識別し、解析し、または増幅するための本発明はまた、本発明によるプライマーまたはプローブに関するものでもあって、これらが可能とするのは、特に変異した核酸配列を実証または区別すること、あるいはcDNAがSEQ ID No 1で示される遺伝子のゲノム配列を識別することで、その際には特にPCR法のような増幅方法またはそれに類似する方法を用いる。本発明によれば、核酸配列を検出し、識別し、解析し、または増幅する方法においてプローブまたはプライマーとして使用可能なポリヌクレオチドは、最短15の塩基、好ましくは少なくとも18、20、25、30、40、50の塩基の長さを示す。

【0045】

したがって本発明のポリヌクレオチドは、プライマーまたはプローブとして使用されうるが、それは特にPCR（ポリメラーゼによる連鎖増幅）技法（Rolfset al., 1991）を用いる方法においてである。この技法が要するのは、増幅されるべき断片と隣接する一対のオリゴヌクレオチドのプライマーを選択することである。例えば、米国特許US No 4683202号に記載された技法を参照されたい。増幅された断片が識別されるのは、例えばアガロースゲル電気泳動またはポリアクリルアミド電気泳動の後、あるいはゲル濾過クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーのようなクロマトグラフィーの技法の後であり、それからシーケンスすることができる。増幅の特異性が制御されるのは、本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列をプライマーとして、これら配列あるいはまた得られた増幅産物を含むプラスミドを基質として用いることによる。増幅したヌクレオチド断片は、ハイブリダイゼーション反応におい

て試薬として用いてもよく、それにより、生物サンプルに、前記増幅したヌクレオチド断片の配列に相補的な配列の標的核酸が存在することを実証できる。本発明はまた、本発明によるプライマーを用いた増幅によって得ることが可能な核酸をも対象にしている。

【0046】

標的核酸増幅の他の技法は、有利には、本発明によるヌクレオチド配列の一对のプライマーを用いるPCR(PCR的)技法に代わるものとして用いられる。PCR的という用語は、核酸配列の直接または間接的な複製を実施する一切の方法、あるいはまた、標識システムが増幅されている方法を指し、これら技法は言うまでもなく、既に知られたものである。一般的に、ポリメラーゼでDNAを増幅することであり；オリジナルのサンプルがRNAの場合には、前もって逆転写を行うべきである。現在、この増幅を可能にする方法は、非常に多く存在しており、例えば、SDA(Strand Displacement Amplification)技法すなわちストランドを置換増幅する技法(Walker et al., 1992)、Kwoh et al.(1989)により記載されたTAS(Transcription-based Amplification System)技法、Guatelli et al.(1990)により記載された3SR(Self-Sustained Sequence Replication)技法、Kievitis et al.(1991)により記載されたNASBA(Nucleic Acid Sequence Based Amplification)技法、TMA(Transcription Mediated Amplification)技法、Landegren et al.(1988)により記載されたLCR(Ligase Chain Reaction)技法、Segev(1992)により記載されたRCR(Repair Chain Reaction)技法、Duck et al.(1990)により記載されたCPR(Cycling Probe Reaction)技法、Miele et al.(1983)により記載されたQ-ベータ-レプリカ-ゼ増幅技法がある。これら技法には、それ以後、改善されているものもある。

【0047】

検出する標的ポリヌクレオチドがmRNAである場合には、本発明によるプライマーを用いた増幅反応を行う前、あるいは本発明のプローブを用いた検出方法を行う前に、逆転写酵素型の酵素を用いるのが好適であり、それにより生物サンプルにおいて得られたmRNAからcDNAを得るようにする。得られたcDNAは、その際に、本発明による増幅または検出方法で用いられるプライマーまたはプローブのための標的として役割を果たす。

【0048】

プローブのハイブリダイゼーション技法は、様々な方法で実施される(Matthews et al., 1988)。最も一般的な方法が含むのは、様々な組織の細胞やサポート(例えばニトロセルロース、ナイロンまたはポリスチレン)で培養した細胞から抽出した核酸を固定して、それにより例えばDNAチップなどを作成するようにすること、ついできちんと規定した条件で、プローブと共に固定された標的核酸を培養することである。ハイブリダイゼーションの後、余ったプローブを除去し、そして形成されたハイブリッド分子を適切な方法(プローブに関連する放射能、蛍光性または酵素活性の測定)によって検出する。

【0049】

本発明による核酸プローブのもう一つの実施例においては、該核酸プローブはキャプチャープローブとして用いられる。この場合、「キャプチャープローブ」というプローブはサポートに固定され、試験すべき生物サンプルから得た標的核酸を特異的なハイブリダイゼーションによって捕らえるのに用い、そして次に標的核酸が「検出プローブ」といわれる、検出しやすい因子で標識した、第二のプローブを使って検出される。

【0050】

有利な核酸断片の中でも、更に言及すべきは、特にアンチセンスオリゴヌクレオチド、すなわち、標的配列とのハイブリダイゼーションにより、対応する産物の発現の抑制を確実にする構造のオリゴヌクレオチドである。また同様に言及すべきは、センスオリゴヌクレオチドであって、これは、対応する産物の発現の調節に関わるタンパク質との相互作用により、この発現の抑制が活性化のどちらか

を誘発するものである。本発明によるオリゴヌクレオチドは、最短9の塩基、好ましくは少なくとも10、12、15、17、20、25、30、40、50の塩基の長さである。

【0051】

本発明によるプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドは、当業者に周知の方法により、放射性または非放射性的の化合物によって直接または間接的に標識することができ、それにより検出可能および/または定量化可能なシグナルが得られるようにする。本発明によるポリヌクレオチド配列で、標識されないものを、プローブまたはプライマーとして直接使ってもよい。

【0052】

配列が一般的に標識されるのは、多くの用途に使用可能な配列が得られるようにするためである。本発明によるプライマーまたはプローブの標識は、放射性元素または非放射性的の分子で行われる。使用される放射性同位元素の中で言及すべきは、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^3H または ^{125}I である。非放射性的の物の選択は、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ジオキシゲニンのようなリガンド、ハプテン、着色剤、または放射性発光剤、化学発光剤、生物発光剤、蛍光剤または燐光性の発光剤といった発光剤からなされる。

【0053】

本発明はまた、核酸を有し、または本発明によるポリペプチドをコードするクローニングベクターおよび/または発現ベクターに関するものである。このようなベクターはまた、宿主細胞におけるポリペプチドの発現および、場合によっては分泌に必要な配列を含んでいてもよい。このような宿主細胞もまた本発明の課題である。

【0054】

もう一つの側面として、本発明はアンチセンス発現ベクターにも関するものである。このような発現ベクターは、発現ベクターに逆方向で挿入された、本発明によるポリヌクレオチド配列が含まれている。そのようなわけで、当業者が容易に認識できるのは、アンチセンスベクターのDNAに対応するmRNAが、センスベクターのDNAに対応するmRNAとハイブリダイズすることである。アン

チセンス発現ベクターとは、構成的な方法で、もしくは導入後に、適当な宿主細胞において問題のアンチセンスRNAを発現するベクターである。アンチセンスという用語は、特異的な核酸配列を含む一切の組成物を指す。アンチセンス分子は、合成または転写のような方法で作成可能である。このような分子を細胞に導入する場合には、相補的なヌクレオチドは、細胞が生成する天然の配列と組み合わせられて、それにより二本鎖を形成し、ならびに本発明によるポリペプチドの転写または翻訳のどちらかを阻害するようにする。また本発明の範囲内に含まれるのは、RH116RNAヘリカーゼの基質であるRNA分子と対合しうるアンチセンス分子を実現することで、それにより生物学的活性を阻害するようにすることである。

【0055】

本発明によるポリペプチドの発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性を減退または消失させることのできる識別された新規な化合物は、本発明によるポリペプチドのアンタゴニストを構成する。「アンタゴニスト」という用語は、本発明によるポリペプチドと結合する際に、RH116ポリペプチドの生物学的または免疫学的な活性効果の量または持続時間を減少させる分子を指す。アンタゴニストに含まれるのは、タンパク質、核酸、炭水化物およびRH116の効果を減じる能力のある分子すべてである。

【0056】

前記ベクターは、好ましくはプロモーター、翻訳の開始および終了のシグナル、ならびに転写調節にふさわしい領域も含んでいることが望ましい。前記ベクターは、細胞において安定して維持できるものでなくてはならず、また場合によっては翻訳されたタンパク質の分泌を指定する特殊なシグナルを所有してもよい。本発明の特定の実施例によると、プロモーターは、本発明のヒトRH116ポリペプチドをコードする遺伝子上流に天然に存在するプロモーターであってもよい。

【0057】

様々な制御シグナルは、使用される宿主細胞の機能に応じて選ばれる。したがって、本発明による核酸配列が挿入されうるのは、選ばれた宿主の中で自律複製

するベクターの中、あるいは選ばれた宿主に統合したベクターの中である。

【0058】

自律複製システムの中でも、宿主細胞に応じて使用することが望ましいのは、「プラスミド」、「コスミド」または「ミニ染色体」タイプのシステムか、あるいはウイルス型のシステムであり、ウイルスベクターは特にアデノウイルス (Perricaudet et al., 1992)、レトロウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルスまたはヘルペスウイルス (Epstein et al., 1992) であってよい。当業者であれば、これらシステムのそれぞれについて使用可能な技術を知っている。

【0059】

宿主細胞の染色体への配列の組み込みを望む場合には、例えば、プラスミドまたはウイルス型のシステムを使ってもよく；そのようなウイルスとは、例えば、レトロウイルス (Temin, 1986)、またはAAV (Carter, 1993) である。

【0060】

非ウイルスベクターの中で好ましいのは、VICAL社が開発した技術による、裸のDNAや裸のRNAのような裸のポリヌクレオチド、バクテリア人工染色体 (BAC, bacterial artificial chromosome)、酵母における発現のための酵母人工染色体 (YAC, yeast artificial chromosome)、ネズミの細胞における発現のためのマウス人工染色体 (MAC, mouse artificial chromosome)、そして好ましくはヒト細胞における発現のためのヒト人工染色体 (HAC, human artificial chromosome) である。

【0061】

そのようなベクターは、当業者によって広く一般的に用いられる方法にしたがって用意されるのであって、その結果であるクローンを、標準的な方法で相応しい宿主に導入してもよく、それには例えば、リポフェクション、エレクトロポレーション、熱ショック、細胞膜に化学的に透過性付与した後での形質転換、または細胞融合がある。

【0062】

本発明はさらに、宿主細胞、特に本発明によるベクターによって形質転換した真核細胞および原核細胞も含む。本発明の目的において使用可能な細胞の中で、特に言及できるのは、バクテリア細胞(Olins et Lee, 1993)だけでなく、酵母細胞(Buckholz, 1993)もあり、また同様に動物細胞、特に哺乳類細胞の培養物(Edwards et Aruffo, 1993),そして特にチャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞およびヒト細胞もある。また同様に言及できる昆虫細胞においては、例えばバキュロウイルス(Luckow, 1993)を使う方法を用いることができる。本発明のタンパク質を発現するために望ましい宿主細胞は、COS細胞とHeLa細胞からなるものである。

【0063】

本発明が同様に含むのは、ヒトを除く、好ましくは哺乳類の、トランスジェニック動物であり、本発明による前記形質転換した細胞を一つ含んでいる。このような動物が使用されるのは、天然のRH116タンパク質の動物の相同物の有害な変化に関連する病理学の病因論の研究モデル、あるいは、例えばムラブチドのような、RH116アンタゴニストなどの、抗ウイルス治療がある、もしくはないときの、RH116タンパク質の発現に対する、HIVウイルスのようなRNAウイルスが引き起こすウイルス感染の影響の研究モデルとしてである。

【0064】

本発明による哺乳類の中でも、好ましいのは、げっ歯類のような動物、特にマウス、ラットまたはウサギのようなもので、本発明によるポリペプチドを発現するものである。

【0065】

本発明によるトランスジェニック動物は、本発明によるタンパク質をコードする遺伝子、またはそれらの相同遺伝子を過剰発現したり、また突然変異が導入される前記遺伝子が発現したりすることができる。このようなトランスジェニック動物、特にマウスは、例えば、偏在する、性質の強い、または組織のタイプを選択できるプロモーターの制御下で、あるいはウイルス転写の後に、この遺伝子の

コピーのトランスフェクションにより得られる。

【0066】

代わりに、本発明によるトランスジェニック動物は、配列SEQ ID No 2のポリペプチドをコードする遺伝子を、もしくはその相同遺伝子を欠くものにしてよいが、それはLOX-P/CRE組換え酵素システム (Rohlmann et al., 1996) を使用する、もしくは使用しない相同組換えによって目標とされた不活性化により、またはこの遺伝子の発現を不活性化する他のあらゆるシステムによってである。これらトランスジェニック動物を得る方法には、例えば胚性幹細胞での相同組換え、これら幹細胞の胚への移入、生殖系で影響を受けたキメラの選択、そして前記キメラの生長がある。

【0067】

上記のように形質転換をした細胞または哺乳類はモデルとしても用いられ、それにより、本発明によるポリペプチドと、本発明によるポリペプチドの活性に直接または間接に関わる化学化合物またはタンパク質化合物との間の相互作用を研究するようにすることもでき、このことは関連する様々なメカニズムと相互作用を研究するためである。それらは特に、本発明によるポリペプチド、特に配列SEQ ID No 2のタンパク質、または本発明によるそれらの変異体と相互作用を行う生成物を選ぶために用いられうるが、該生成物は補因子、または阻害剤、特に競合阻害剤として、あるいはまた本発明によるポリペプチドの活性に対してのアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有するものとして相互作用を行う。好ましくは、前記形質転換された細胞またはトランスジェニック動物をモデルとして用いるが、それは特に本発明のRH116ポリペプチドの発現レベルまたはRNAヘリカーゼ活性を減退させることができる化合物を選ぶためである。

【0068】

分析モデルとしてのそれらの使用に加え、本発明による細胞や哺乳類を、以下に説明するような、本発明によるポリペプチドの生産方法において用いることも可能である。組換えの形式で本発明のポリペプチドを生産する方法は、それ自体が本発明に含まれるものであるが、その特徴は、形質転換した細胞、特に本発明の細胞の培養を、本発明による核酸配列によってコードされた組換えポリペプチ

ドが発現し、かつ場合に応じて分泌することを可能にするような条件の下で行うことであり、また前記組換えポリペプチドを回収することでもある。この生産方法によって得られることのできる組換えポリペプチドもまた、本発明の一部である。該ポリペプチドは、グリコシル化された、またはグリコシル化されていない形で現れ、また天然タンパク質の三次構造を呈することも、また呈さないこともある。組換えポリペプチドの配列はまた修飾されてもよく、それにより特に水性の溶剤における溶解性を改善する。そのような修飾は当業者に周知のもので、例えば疎水性ドメインの欠失、疎水性アミノ酸の親水性アミノ酸への置換がある。

【0069】

これらのポリペプチドを、当業者に周知の組換えポリペプチド生産技法によって、以上に規定された核酸配列から生産してもよい。この場合、使用する核酸配列はシグナルの制御下に置かれ、該シグナルは細胞宿主における該ポリペプチドの発現を可能にする。

【0070】

組換えポリペプチド生産の効率的なシステムは、本発明によるベクターと宿主細胞の準備を必要とする。これらの細胞を得られるようにするのは、以上に規定したベクターに挿入されたヌクレオチド配列の宿主細胞への導入であり、ついで、前記細胞を、トランスフェクションしたヌクレオチド配列の複製および/または発現を可能にするような条件の下で培養することである。

【0071】

組換えポリペプチドを精製するために用いられる方法は、当業者に周知のものである。組換えポリペプチド精製は、細胞の溶解産物か抽出物から、あるいは培地の上澄みから行われることができ、用いられる方法は、分画法、クロマトグラフィー法、特異的なモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を用いるイムノアフィニティー技法などを単独で、または組み合わせて使用してもよい。好ましい変異体は、「キャリア」タンパク質（キメラタンパク質）に融合した組換えポリペプチドを生成したものからなる。このシステムの利点は、組換え産物のタンパク質加水分解の安定化および減退、インビトロでの再生中の溶解性の増大、および/または融合の相手が特異的なリガンドに親和性を有する場合の精製の単

純化、などを可能にすることである。

【0072】

本発明によるポリペプチドは、周知の多くのペプチド合成の一つを使つての化学的合成、例えば固体相を用いる技法（特にStewart et al., 1984参照）、または部分的固体相を用いる技法や、断片の濃縮、または従来の溶液での合成によつても得ることができる。化学的合成によつて得られ、かつ対応する天然ではないアミノ酸を含むポリペプチドも、本発明に含まれる。

【0073】

本発明はまた、モノクローナルまたはポリクローナル抗体とその断片に関するものであり、それらは本発明によるポリペプチドに選択的におよび/または特異的に結合することを特徴とするものである。キメラ抗体、ヒト化抗体、そして一本鎖抗体もまた、本発明の一部をなす。本発明による抗体の断片は、好ましくはFab、F(ab')₂またはFvの断片であることが望ましい。

【0074】

本発明によるポリペプチドにより、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用意することが可能になる。モノクローナル抗体は、有利には1975年にKohler et Milsteinによつて記載された技法による、ハイブリドーマから調製することができる。

【0075】

ポリクローナル抗体の調製は、例えば動物に、特にマウスに、免疫応答のアジュバントを組み合わせた本発明によるポリペプチドで免疫性を与え、ついで、免疫性を与えられた動物の血清に含まれた特異的な抗体を、抗原として用いられたポリペプチドを前もつて固定させたアフィニティーカラム上で精製することによつてできる。本発明によるポリクローナル抗体の調製はまた、本発明によるポリペプチドを前もつて固定したアフィニティーカラム上で精製することによつてもできる。

【0076】

本発明のある特定の実施例によると、その抗体はRH116ポリペプチドと、それが結合するRNA配列との間の相互作用を抑制することができるが、それに

より前記RH116ポリペプチドの生理機能を弱める。

【0077】

本発明はまた、本発明によるポリペプチドの検出および/または精製方法にも関するものであり、本発明による抗体を用いることを特徴とする。本発明はさらにまた、精製されたポリペプチドを含み、本発明による方法によって得られることを特徴とする。

【0078】

更に、ポリペプチドの精製のためにそれらを用いる他にも、本発明の抗体、特にモノクローナル抗体は、生物サンプルにおいてこれらポリペプチドを検出するためにも用いられ得る。

【0079】

このような様々な用途のため、本発明の抗体を、本発明の核酸プローブについて前述したものと同一方法で、および好ましくは酵素タイプ、蛍光タイプまたは放射性タイプの標識法で、標識する。

【0080】

本発明の抗体はまた、例えば免疫蛍光法、金標識、酵素免疫複合体による、本発明のポリペプチドの発現を解析する手段を構成する。更に一般的には、本発明の抗体を、本発明によるポリペプチドの発現が観察されるべきあらゆる状況において、そして更に具体的には免疫細胞化学、免疫組織化学または「ウェスタンブロットティング」の実験において好適に使用することができる。

【0081】

それらの実験により、生物の組織または試料における、これらポリペプチドの異常な発現を実証することが特に可能になる。

【0082】

更に一般的には、本発明の抗体を、有利にはあらゆる状況において使用することが可能であるが、この場合、本発明によるポリペプチドの発現は、正常でも突然変異でも、観察されなければならない。したがって、生物サンプルにおける本発明によるポリペプチドの検出方法は、生物サンプルを本発明による抗体と接触させ、また形成された抗原-抗体複合体を実証するという手順からなるが、それ

もまた本発明の一つの対象である。

【0083】

また、本発明の範囲に含まれるのは、ある生物サンプルにおける本発明によるポリペプチドの検出および/または解析のための試薬キットであり、その特徴は：(i) 上述したようなモノクローナルまたはポリクローナル抗体、(ii) 場合によっては、免疫反応に好都合な培地を構成するための試薬、(iii) 免疫反応によって生成される抗原-抗体複合体を検出する試薬、という要素からなることを特徴とする。このキットは特にウェスタンブロッティングの実験を行うのに用いられる；これら実験により、組織または細胞からの本発明によるポリペプチドの発現の調節を研究することが可能になる。このキットはまた、本発明によるポリペプチドと相互作用するタンパク質を特に実証するための免疫沈降実験でも用いられる。このキットはまた、本発明によるポリペプチドの検出および/または解析を行うのにも用いられるが、ここではE L I S A法、免疫蛍光法、放射性免疫法(R I A技法)またはそれと同等の技法を含む方法が用いられる。

【0084】

本発明はまた、ある生物サンプルにおける、本発明によるポリヌクレオチドを検出および/または解析する方法であって、以下の手順を含むことを特徴とする：それは(i) 分析すべき生物サンプルからDNAを単離すること、もしくは生物サンプルのRNAからcDNAを得ること；(ii) プライマーを用いて本発明によるポリペプチドをコードするDNAを特異的に増幅すること；(iii) 増幅産物を分析することである。本発明はまた、生物サンプルにおける、本発明による核酸の検出および/または解析のためのキットを提供することも対象としており、以下の要素を含むことを特徴としている：それは(i) 本発明による一対の核酸プライマー、(ii) DNA増幅反応を行うのに必要な試薬、そして、場合によっては(iii) 増幅された断片の配列を検証することを可能にする構成要素、より具体的には本発明によるプローブである。

【0085】

本発明はまた、生物サンプルにおいて、本発明による核酸を検出および/または解析する方法を含み、以下の手順を有することを特徴とする：それは(i) 生

物サンプルと本発明によるポリヌクレオチドを接触させること、(ii)前記ポリヌクレオチドと生物サンプルの核酸との間に形成されたハイブリッドを検出および/または分析することである。本発明がまた対象とするのは、生物サンプルにおいて、本発明による核酸の検出および/または解析を行うためのキットを提供することであって、以下の要素を含むことを特徴としている：それは(i)本発明によるプローブ、(ii)ハイブリダイゼーション反応を行う為に必要な試薬、および/または場合によっては、(iii)本発明による一対のプライマー、ならびにDNA増幅反応の為に必要な試薬である。

【0086】

好ましくは、検出と解析を行う本発明による生物サンプルは、例えばヒトまたは動物の血清または血液のような体液、またはバイオプシーからなるものである。

【0087】

同様に本発明の一部をなすのは、対立遺伝子変異性、突然変異、欠失、ヘテロ接合度の喪失、あるいは本発明によるポリペプチドをコードする遺伝子の遺伝異常の測定方法であり、本発明による核酸配列、ポリペプチドあるいは抗体を使用することを特徴とするものである。

【0088】

これら突然変異を直接検出できるのは、本発明による核酸および配列(RNAまたはcDNA)を解析することによるが、本発明によるポリペプチドを介しても可能である。特に、突然変異を有するエピトープを認識する本発明による抗体の使用は、「健康な」タンパク質と「病理に関連する」タンパク質との間の区別を可能にする。

【0089】

この診断および/または予後評価の方法は、予防的に、あるいは患者の臨床状態を明らかにしおよび/または確認することに役立つように用いてもよい。解析は、遺伝子(即ちエキソン)の全部または一部のシーケンシングによって実施しても、あるいは当業者に周知の他の方法によって実施してもよい。特に使用するものは、PCRに基づく方法で、例えばPCR-SSCPは、点突然変異の検

出を可能にする。同様に実施しうる解析は、本発明によるプローブを、本発明によるポリヌクレオチドを少なくとも一つ含むDNAチップに固定させること、もしくはこれらマイクロプレートでハイブリダイゼーションを行うことによる。本発明による配列を含むDNAチップもまた、本発明の対象の一つである。

【0090】

同様に、本発明によるアミノ酸配列を含むタンパク質チップもまた、本発明の対象の一つである。そのようなタンパク質チップにより、本発明によるポリペプチドと、他のタンパク質または化学化合物との間の相互作用の研究が可能になり、そして本発明によるポリペプチドと相互作用する化合物をスクリーニングするのに用いることもできる。本発明によるタンパク質チップは、患者の血清に本発明によるポリペプチドに対する抗体が存在するのを検出するためにも使用できる。本発明による抗体を含むタンパク質チップも使用できる。

【0091】

物質を試験、および識別するのは、本発明のポリペプチドの酵素活性を調節する能力についてである。「酵素活性を調節する物質」という表現は、試験すべき物質がない場合に測定した酵素活性と比べ、酵素活性を変える物質を指す。例えばこのような物質は、RNAヘリカーゼ活性の一部または全部を抑制することができ；このような活性は、当業者に周知の方法で測定可能である。例えば、合成オリゴヌクレオチドを一つの基質に固定し、そして標識した相補的オリゴリボヌクレオチドとハイブリダイズさせることができる。ハイブリダイズしたオリゴリボヌクレオチドを、次いで本発明のポリペプチドと共に用いるが、該ポリペプチドは、基質に付着していない、標識された、一定の測定可能な量のオリゴヌクレオチドを、RNAヘリカーゼ活性を前提にして塩析させる。本発明のRH116 RNAヘリカーゼの潜在的な修飾因子、またはその一断片の有無による効果をそのように試験できる。もう一つの別のやり方は、Jaramillo et al. (1991)により記載されたプロトコルを用いることからなり、；この方法は、³²Pで標識した二本鎖RNA基質と、本発明のポリペプチドとを緩衝溶液において混合することで；反応は、グリセロール/SDS/EDTA/プロモフェノールブルーの混合物を添加することによって止まり、該混合物をつぎに、標

準的な条件で、SDS-PAGEゲル(8%)で調製する。RNAヘリカーゼ活性が評価されるのは、二本鎖RNAの量に対する一本鎖RNAの量の比率による。他のプロトコルも使用可能である(Rozen et al.(1990); Pause et al.(1992); Lain et al.(1993), Lee et Hurwitz(1993))。これら解析はマイクロプレートで行われ、それにより本発明によるポリペプチドの大量の修飾因子、および/または阻害剤の試験を同時に行うことが可能である。

【0092】

そのような物質は分子モデリングすることにより前もって明らかにし、選択させておくこともでき、それにより本発明のポリペプチドと反応できる物質を識別する。ATP、あるいはRNA、DNAまたはRNA/タンパク質複合体のような他の物質と結合する本発明のタンパク質の能力に影響を与える物質を識別することは可能である。本発明のタンパク質の基質結合部位と、あるいは、そのような機能のエピトープに影響を与える部位を妨害する基質は、当業者に周知の方法で識別することが可能である(詳しくはFruehleis et al.(1987); Perun et al.(1989); Van De Waterbeemd(1994), Blundell(1996)参照)。

【0093】

それゆえ本発明は、本発明によるRH116ポリペプチドの細胞発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性に影響を与える化合物のスクリーニング方法に関するものであり、該方法は以下の手順、(i)本発明の宿主細胞から選んだ細胞と、本発明によるポリペプチドを発現または含有する真核細胞の、好ましくはヒトの細胞とを、前記細胞に浸透するか、あるいは導入される可能性のある一つまたは複数の潜在的化合物もしくはリガンドと接触させること、および(ii)細胞発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性を検出および/または測定することからなる。宿主細胞または真核細胞、好ましくはヒトの細胞に存在する、本発明によるポリペプチドをコードする遺伝子は、少なくとも本発明のそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に対応しており、好ましくはゲノムDNAまたはcDNAの形態であり、ヒトRH116遺伝子の、またはマ

ウスなどの動物種の相同遺伝子のプロモーター配列に機能的に連結されている。そのような方法でスクリーニングされ、およびRH116RNAヘリカーゼの発現レベルに影響を与える可能性のある化合物は、好ましくは本発明によるポリペプチドを天然にコードする遺伝子の（プロモーター、上流配列、「エンハンサー」、「サイレンサー」、「インスレーター」等の）調節ポリヌクレオチド配列と相互作用する可能性のある化合物、または本発明によるポリペプチドをコードする遺伝子の転写の調節に関わる転写因子（基本転写因子または組織特異的因子）と相互作用する可能性のある化合物であり、それにより本発明のRH116ポリペプチドをコードする遺伝子の転写に影響する、つまり前記遺伝子の転写を増大させ、減少させ、調整し、もしくはなくす可能性のある複合体を形成する。転写活性を検出および/または測定する技法は、当業者に周知である。特に言及すべきは、ノーザンブロットィング法とRT-PCR技術であり、これらは、プローブあるいはプライマーとしてそれぞれに使用される本発明のポリペプチドと実行可能なものである。

【0094】

本発明はまた、本発明によるポリペプチドのRNAヘリカーゼ活性に影響を与える可能性のある化合物をスクリーニングする方法に係るものであり、それは以下の手順、(i)前記ポリペプチドを、RNAヘリカーゼ活性を実現させるのに必要な試薬の存在下で、一つまたは複数の潜在的な化合物またはリガンドと接触させること、および(ii)RNAヘリカーゼ活性を検出および/または測定すること、からなる。

【0095】

好ましい実施例においては、以上に記載した化合物をスクリーニングする方法は、前記スクリーニングされた化合物が、本発明のRH116ポリペプチドの発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性を減退させ、あるいは消滅させることを特徴とする。以上に記載した方法を用いて得られ、かつ本発明のRH116ポリペプチドの発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性を減退させる化合物は、RH116のアンタゴニストであり、また本発明の目的の一つともなっており；この化合物の特徴は、アンチセンス核酸配列として使用される本発明

によるポリヌクレオチド、本発明によるアンチセンス発現ベクター、本発明による抗体、そしてムラミルペプチド、好ましくはムラブチド、または本発明によるポリペプチドの他のあらゆるアンタゴニストから選ばれることである。

【0096】

実際、本発明のRH116ポリペプチドおよびその断片の生物活性の一部または全部をブロックすることは、ウイルス複製を阻害あるいは消滅させる手段を構成する。すなわち、スプライシングされていないゲノムRNAと、HIVのようなレトロウイルスの不完全にスプライシングされたmRNAは、パッケージングおよび/または翻訳のために、細胞質へと移出する必要がある。このようなプロセスを仲介するのは、単純なレトロウイルスの為のCISで作用する輸送配列(CIS作用の構成的な輸送配列またはCTE)によるか、あるいは、HIVのような複合レトロウイルスのための応答配列(RREのRev応答配列)とTRANSで作用するRevウイルスタンパク質による。本発明によるRH116RNAヘリカーゼは、CTEの補因子を構成し、またPREが媒介する遺伝子発現における役割をも果たし、ならびにHIV複製においても役割を果たす能力がある。

【0097】

したがって本発明が提案するのは、本発明のポリペプチドのRNAヘリカーゼ活性を部分的または全体的にブロックする可能性のある化合物を提供することで、それによりウイルス複製を減少または消滅させる。その中で特に言及すべきは、アンチセンス核酸配列として使用される本発明によるポリヌクレオチド、本発明によるアンチセンス発現ベクター、本発明による抗体、ムラミルペプチド、好ましくはムラブチド、もしくは本発明によるポリペプチドの他のあらゆるアンタゴニストである。好ましくは、ムラミルペプチドとムラブチドは、HIV陽性患者の細胞においてRH116のアンタゴニストを構成する。

【0098】

本発明は、HIVウイルスのみに限定されるものではなく、その複製においてRNAヘリカーゼを直接または間接に伴うウイルス全体に限定するものである。ウイルスという用語は、エンベロープのある、あるいはない、一本鎖または二本

鎖の、DNAまたはRNAウイルスを指す。好ましくは、ウイルスは、レトロウイルス科、オルトミクソウイルス科、ラブドウイルス科、ブニヤウイルス科、アデノウイルス科、ヘパドナウイルス科、ヘルペスウイルス科またはポックスウイルス科に属するものである。好ましくは、ヘパドナウイルスはB型肝炎ウイルスまたはC型肝炎ウイルスである。

【0099】

本発明のポリペプチドの生物活性は、ウイルスRNAの転写後調節のみに限定されるのではなく、一般のRNAの転写調節にも貢献している。したがって、本発明のポリペプチドが構成するのは、他の正常なあるいは異常な生物学的プロセスに関与するRNAヘリカーゼ活性を弱める能力のある化合物にとっての有益な療法標的である。

【0100】

RNAヘリカーゼは、癌を治療する目的の化合物にとっての選択の標的となる。実際、科学論文の様々な記事では、RNAヘリカーゼの腫瘍形成への関与を論じている。したがって、DEAD-box1 (DDX1) タンパク質の過剰発現が、神経芽細胞腫 (Nb) と網膜芽細胞腫のような腫瘍の進行においてある役割を果たす (Godbout et al. 1998) が、それは癌細胞のRNAの正常な二次構造と発現レベルとを損なうことによる。他のRNAヘリカーゼが、直接または間接に腫瘍形成に関与してきた。したがってネズミp68タンパク質は、紫外線に誘発され、腫瘍に突然変異し；すなわちDDX6 RNAヘリカーゼ遺伝子は、B細胞リンパ腫を伴う染色体の切断点に位置している。同様に、DDX10とヌクレオポリンNUP98を有するキメラタンパク質は、幾つかの骨髄性疾患の病因に関連しているようである。それゆえ、RH116のRNAヘリカーゼ活性を減退あるいはなくす能力のある化合物は、癌の予防または治療の処置を目的とする有益な化合物となる。RH116のアンタゴニスト化合物で治療可能な癌の中でも、特に言及すべきは、以下に上げるがそれに限定するものではない：腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、神経膠腫または奇形癌、そして、更に具体的に副腎癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、乳癌、消化管癌、肝臓癌、肺癌、膵癌、卵巣癌、子宮癌、精巣癌、前立腺癌そして咽喉癌である。

【0101】

同様に、RH116のRNAヘリカーゼ活性を減退あるいはなくす能力のある化合物は、それゆえ、以下の他の病の予防または治療処置を目的とした有益な化合物をなすが、該病とは例えばリウマチ、遺伝疾患、関節炎、アテローム性動脈硬化症、骨粗鬆症、急性または慢性感染症、自己免疫疾患、糖尿病、ならびに移植の際の臓器拒絶に関連する問題である。更に具体的には、本発明はAIDS（後天性免疫不全症候群）をも含む免疫および自己免疫疾患に関するものである。

【0102】

阻害剤、アンタゴニストおよびRH116のRNAヘリカーゼ活性を減退あるいはなくす能力のある他の化合物は、自己免疫疾患の予防または治療の処置にとって有益な化合物となる。実際、Takeda et al. (1999)によって最近報告されたところによると、RNAヘリカーゼAは、全身性エリテマトーデスを患う患者において自己抗原として作用する。したがって、アンチセンス核酸配列として用いられる本発明によるポリヌクレオチド、本発明によるアンチセンス発現ベクター、本発明による抗体、ムラミルペプチド、そして好ましくはムラプチド、あるいは本発明によるRH116ポリペプチドの他のあらゆるアンタゴニストを、自己免疫疾患の治療処置に用いることが可能である。自己免疫疾患の中でも、特に言及すべきは、ぶどう膜炎、ベーチェット病、サルコイドーシス、シェーグレン症候群、慢性関節リウマチ、若年性関節炎、フィサンジェーロイ-ライター症候群、痛風、変形性関節症、全身性エリテマトーデス、急性播種性エリテマトーデス、多発性筋炎、心筋炎、原発性胆汁性肝硬変、クローン病、潰瘍性結腸炎、多発性硬化症およびその他の脱髄性疾患、再生不良性貧血、血小板減少性紫斑病、多発性骨髄腫およびBリンパ腫、シモンズ症汎下垂体機能低下症、バセドウ-グレイブス病およびバセドウ病眼病、亜急性甲状腺炎および橋本病、アジソン病、インスリン依存性糖尿病（I型）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、貧血、喘息、自己免疫性溶血性貧血、気管支炎、アトピー性皮膚炎、肺気腫そして偶発性リンパ球減少症である。

【0103】

本発明のもう一つの実施例においては、本発明の化合物のスクリーニング方法

は、前記スクリーニングされた化合物が、本発明のRH116ポリペプチドの発現レベルおよび/またはRNAヘリカーゼ活性を増進させることを特徴とする。このようにスクリーニングされた化合物は、本発明の目的の一つでもあるが、本発明によるポリペプチドのアゴニストとなる。本発明の方法によって得ることが可能なアゴニスト化合物の中でも、特に言及すべきは、ムラミルペプチドで、好ましくはムラプチドであり；実際、本発明者等が実験によって実証したところによると、後者の化合物、すなわちムラプチドは、健康なドナーの細胞においてRH116の発現レベルを増大させ、そうして本発明のポリペプチドのアゴニストとして機能する。

【0104】

もう一つの実施例においては、本発明は、本発明によるポリペプチドの機能活性に影響を与える能力のある化合物のスクリーニング方法を含んでいる。このような方法は、次の手順、(i)核および/またはミトコンドリアのRNAスプライシング反応、RNA編集反応、rRNAプロセッシング反応、翻訳開始反応、核mRNAの細胞質への移出反応、そしてmRNA分解反応の中から選んだ一つの反応を実現するのに必要な試薬の存在下で、前記ポリペプチドを一つまたは複数の潜在的リガンドと接触させること、そして(ii)前記反応の検出および/または測定をすることからなる。この方法によって得られる可能性のあるスクリーニングされた化合物もまた、本発明の範囲に入る。

【0105】

それゆえ本発明は、以下、本発明による抗体、本発明によるポリペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、本発明によるオリゴヌクレオチド、本発明によるベクター、本発明によるアンチセンス発現ベクター、本発明による細胞、そして本発明による様々なスクリーニング方法を用いて、薬品として、そして特に薬品の活性原理として、得ることが可能な化合物、から選ばれることを特徴とする化合物に関係するものであり；このような化合物は、薬学的に受け入れ可能な腑形剤と組み合わせさせた、優先的に溶解可能な形態にすることとする。薬学的に受容可能な腑形剤という表現では、注入できる組成物、すなわち希釈剤または懸濁剤、例えば生理食塩水または緩衝食塩水を調製するのに従来用いられるあらゆるタ

イブの腑形剤を指す。好ましくはこれら化合物が投与されるのは、全身から、特に静脈投与、筋肉投与、皮内投与または経口投与による。それらの最適な投与方法、薬量および薬剤の形態が決定されるのは、患者に相応しい処置の確立を考慮した一般的な基準になされるが、それは例えば、患者の年齢または体重、病状全般の重篤性、治療への耐性および観察される副作用等である。

【0106】

好ましくは、薬品としての本発明の化合物が目的とするのは、癌、HIVまたはB型またはC型肝炎ウイルスによる感染症のような急性または慢性感染症、遺伝性遺伝子疾患、免疫および自己免疫疾患、リウマチ、関節炎、アテローム性動脈硬化、骨粗しょう症そして糖尿病からなるグループから選択された病の予防および/または治療、そして臓器移植の拒絶反応の予防である。

【0107】

本発明の薬品としての化合物の中でも、RH116ポリペプチドのアンタゴニスト化合物は、後天性免疫不全症候群(AIDS)または肝炎のようなウイルス性の病変の治療を目的とした薬品の調製用に特に好まれる。

【0108】

本発明の目的の一つはまた、ウイルス病、しかも特にAIDSまたは肝炎の予防および治療の処置のための、薬学的組成物を提供することでもあって、該組成物の特徴は、RH116ポリペプチドのアンタゴニスト化合物と、薬学的に受け入れ可能な腑形剤を、治療上効果のある量含んでいることである。更に具体的に本発明がまた目指すのは、抗ウイルス治療、好ましくは抗HIV治療において同時に、別々に、あるいは時間とともに分割して使用するための組み合わせ製品として、少なくとも一つのRH116アンタゴニスト化合物と少なくとももう一つの他の抗ウイルス剤とを含む製品を供給することである。この他の抗ウイルス剤は、好ましくは次に列挙するもの、(i)例えば、3'-アジド-3'-デオキシチミジン(AZT)、2',3'-ジデオキシイノシン(ddI)、2',3'-ジデオキシシチジン(ddC)、(-)2',3'-ジデオキシ-3'-チアシチジン(3TC)、2',3'-ジデヒドロ-2',3'-ジデオキシチミジン(d4T)、(-)2'-デオキシ-5-フルオロ-3'-チアシチジン(

FTC)、TIBO、HEPT、TSAO、-APA、ネビラピン、BAHP、ホスホノホルム酸(PFA)のような逆転写酵素のヌクレオチドまたは非ヌクレオチド阻害剤と、(ii)インジナビルやサキナビルのようなウイルスプロテアーゼ阻害剤から選ばれる

【0109】

もう一つの実施例によれば、本発明の範囲内には、本発明によるRH116ポリペプチドの発現または活性の増大に関連する疾患の治療または予防の処置の方法を提供することにもある。この方法には、本発明のポリペプチドのアンタゴニストの治療上効果のある量を、そのような処置を必要とする患者に投与することを含む。

【0110】

本発明はまた、病の予防的処置を目的とする薬品の調製用の、本発明によるポリペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、本発明によるRH116ポリペプチドのアンタゴニスト化合物の使用にかかわる。実際、ワクチンは一般的に感染もしくは疾患に対する免疫を誘発するが、それは患者において、感染もしくは疾患に関連するある特異的な抗原に対する免疫反応を引き起こすことによる。しかしながら、多くの場合、精製された抗原は、弱い免疫原である。そのような場合には、免疫反応を増大させるために、アジュバントまたは免疫刺激剤のような免疫調節薬を用いなければならない。しかしながら、現在用いられている多くのアジュバントの欠点の一つは、その毒性である。それゆえ現実に必要なとされているのは、特異的な免疫反応を増大させることができる新規な化合物を識別することであり；それは本発明において提案されていることである。実際、本発明のポリペプチドとポリヌクレオチド、そして本発明によるRH116ポリペプチドのアゴニスト化合物を、患者におけるワクチンへの免疫反応を引き起こし、または増大させる目的の薬品調製のために、用いてよい。

【0111】

本発明の他の特徴と利点は、以下に示す例を伴う説明において明らかになる。これらの例においては、以下の図を参照されたい。

【0112】

図1：RH116をコードするcDNAの3'末端を得るために用いられる方法

上部の短い断片は、DD-RT PCRで得られる164bpの最初の断片であり、本発明のRH116ポリペプチドをコードするcDNAの3'領域に対応する。この1260bpの、より長い断片は、3'RACEの後に得られるものである(下の線)。

【0113】

図2：RH116をコードするcDNAの5'領域を得る方法

(A)5'末端部分を得られるのは、Rapid Amplification of cDNA Ends、すなわちcDNA末端の急速増幅(5'RACE)のための、二度のPCR反応の後であり、得られた断片は(.....)(R3)および(----)(R8)で表される。したがってこの方法により、本発明者等は853個のアミノ酸のオープンリーディングフレーム(ORF:open reading frame)を得ることができる。RT-PCRのためのプライマーの役割を果たすオリゴヌクレオチドHELI 1およびHELI 2が示されている。(B)RH116ポリペプチドに対応するcDNAの5'末端部分は、プライマーR16からのPCR反応(5'RACE)の後に得られた。964bpの得られた断片は、破線(----)で表される。

【0114】

図3：ヒトRNAヘリカーゼRH116と推定されるアミノ酸配列とRNAヘリカーゼ(RIG-1)と推定されるものとの比較

(A)「DEAD-BOX」タンパク質ファミリーのATP依存RNAヘリカーゼと推定されることを特徴とする高度に保存されたアミノ酸の領域の図示である。保存されたモチーフ(「x」は任意のアミノ酸を指す)は四角く囲まれ、SATモチーフでは、-A-は高度に保存されたアミノ酸であり、SとTは、いずれの個々の場合においても任意のアミノ酸とも置き換え可能である(Lukin et al., 1998)。モチーフVIにおいて、(X)₁₋₂は、アミノ酸2個のいずれかを指す。(B)RH116タンパク質のアミノ酸配列は、cDNA配列(アクセッション番号 EMBL AY017378)から導き出され

た。「DEAD-BOX」タンパク質ファミリーの特徴をなす保存された6つのモチーフは、太字で示されている。(C)1025aaのオープンリーディングフレーム(クローン10.5)(上部の配列)とSUN Y.W.によって記載されたヒトRNAヘリカーゼ(RIG-1)(アクセッション番号AF038963)(下部の配列)との配列のアラインメント。配列の相同は、二つの配列の中間の列に示されている。四角く囲まれた配列は、RNAヘリカーゼの保存されたドメインに対応しており;ドメインG-GKTとDEXHは、ATPアーゼドメインに対応しており、RNAヘリカーゼに特有のドメインSAT(-A-)およびRGR-R(GR--R)は、標的RNAの結合とアンフォールディングを担っている。

【0115】

図4：多様なヒト組織におけるRH116メッセンジャーRNAの発現のノーザンブロットによる分析(CLONTECH)

脳(1)、心臓(2)、骨格筋(3)、結腸(4)、胸腺(5)、脾臓(6)、腎臓(7)、肝臓(8)、小腸(9)、胎盤(10)、肺(11)、そして末梢血白血球(12)から得たポリA+RNAを、RH116メッセンジャーRNA由来で、およびリン³²Pでその末端を標識したオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせた(図の上部)。同等の量のポリA+RNAもまた、コントロールとして用いられる β -アクチン(β -actin)プローブとハイブリダイズさせた(図の下部)。心臓と骨格筋には同時に、二つの形態の β -アクチンメッセンジャーRNA、2kbの形態および1.6-1.8kbの形態が存在する。このサイズの違いは、メッセンジャーRNAの分解によるものではなく、 β -アクチンの β 形態または β 形態の、プローブとのハイブリダイゼーションによるものである(メーカーCLONTECH社からの指示参照)。

【0116】

図5：内因性感染およびCD8を消耗したPBMCにおけるムラブチド(Murabutide)によって誘発されるRH116メッセンジャーRNAの発現の抑制

PHAによって活性化されおよびCD8を消耗したPBMCを、6ないし24

時間、ムラブチドの無い状態（培地（medium））もしくは $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のムラブチドのある状態で、培養を維持する。（A）RNAサンプル（20、100および500ng）を、RH116メッセンジャーRNAを検出するために、一対の特異的なプライマーでRT-PCRにより増幅する対象とする。構成的に発現したGAPDHメッセンジャーRNA（内部コントロール）もまた、同じサンプル内で増幅する。（B）RH116メッセンジャーRNA発現の抑制の割合平均は、HIV-1に感染した5人の患者サンプルにおいて観察された。

【0117】

図6：U937細胞から得た ^{125}I ヨウ素で標識した細胞抽出物からのRH116タンパク質の免疫沈降

（A）全細胞抽出物（Total extracts）（1、2）または核抽出物（Nuclear extracts）（3、4）を標識し、正常な血清（1、3）またはRH116₁₋₃₃₅タンパク質に対して得られたネズミ血清（2、4）から精製された $20\mu\text{g}$ の免疫グロブリンを用いて免疫沈降させた。サンプルを8%のSDS-PAGEゲルにロードした。（B）細胞分画の質はウェスタンブロットによる分析で検証するが、それには全体抽出物（1）および/または核抽出物（2）における、ゴルジ装置の58kDaタンパク質（細胞質タンパク質）に対する抗体（Anti-Golgi）と、抗ヒストン1（核タンパク質）抗体（Anti-Histone）とが用いられる。

【0118】

図7：HeLa-CD4+細胞におけるRH116タンパク質の免疫局在
メタノールで固定したHeLa-CD4+細胞は、正常なネズミ血清（A）、抗ヒストンH1モノクローナル抗体（Santa Cruz社）（B）、またはRH116₁₋₃₃₅タンパク質に対するネズミ抗血清（C）で培養し、およびFITCと結合したヤギの抗マウスIgG抗体、および/またはヨウ化プロピジウムで染色する。免疫蛍光法が示すのは、緑のFITC染色（1）、ヨウ化プロピジウムに対応する赤の核の対比染色（2）、そして二重染色（3）である。

【0119】

図8：トランスフェクションされ、かつHIV-1_{LA1}ウイルスに感染したH

e L a C D 4 + 細胞によるウイルス抗原 P 2 4 の発現

He L a C D 4 + 細胞は一時的にトランスフェクションされるが、一方では、プラスミド p E G F P (G F P) または、R H 1 1 6 または S S A の c D N A をそれぞれクローニングしたプラスミド p E G F P (それぞれ G F P - R H 1 1 6 および G F P - S S A) で行われ、他方では、プラスミド p C R 3、あるいは T a t をクローニングしたプラスミド p C R 3 (p C R 3 - T a t) で行われるが；それら細胞を 2 4 時間後に H I V 1_{LA1} ウイルスに感染させる。細胞の感染後二日目から、培地を毎日、五日目まで回収する。

【 0 1 2 0 】

ウイルス複製の評価は、(5×10^5 細胞 / m l で標準化した細胞濃度の) 細胞による P 2 4 抗原を、G F P、G F P - R H 1 1 6 または G F P - S S A でトランスフェクションした細胞 (A)、および p C R 3 または p C R 3 - T a t でトランスフェクションした細胞 (B) の培養上澄みで塩析することによって行う。(C) は感染し、G F P - R H 1 1 6、G F P - S S A または T a t でトランスフェクションした細胞の、それぞれ対応するコントロール (G F P または p C R 3 それぞれ) と比較したときの P 2 4 抗原の増大を示す。結果が対応するのは、5 回の (G F P - R H 1 1 6 および G F P - S S A) および 3 回の個別実験 (p C R 3 - T a t) について得られた平均値 \pm 標準偏差である。

【 0 1 2 1 】

図 9 : H I V 1_{LA1} ウイルスに感染し、またトランスフェクションした H e L a - C D 4 + 細胞におけるウイルス D N A とメッセンジャー R N A の発現を示す半定量的 R T P C R

R N A サンプル (5 0 0、1 0 0、2 0 および 4 n g) は、特異的なプライマーでの R T P C R 増幅の対象であり、それにより R H 1 1 6、S S A - 5 6 または T A T タンパク質をコードする m R N A の過剰発現を検出する (A)。R N A サンプルは、ウイルス m R N A を検出する (B) ために、R T P C R 増幅を受けるが、それはスプライシングされていない G A G または P O L の m R N A を検出するための一対のプライマー G A G 0 4 - G A G 0 6、および中間のサイズで一か所スプライシングされたウイルス転写産物を検出するための一対のプライ

マーBSS/KPNAを用いて行う。これらメッセンジャーRNAは、それらが含むエクソン(exon)、およびそれらが産生するタンパク質に基づいて名づけられた(Neuman, 1994)。(C)全DNAを感染後24時間抽出し、様々な濃度(150、30、6および1.2ng)を、一对のプライマーGAG04-GAG06を用いてのPCR増幅の基質として用いるが、それによりHIV-1のGAG遺伝子を検出する。同等の細胞を、アクチン(actin)またはGAPDH遺伝子の増幅により決定する。

【0122】

図10：コントロールの健常者と抗レトロウイルス治療の前後のHIV感染患者におけるRH116タンパク質に対する自己抗体の検出

水平のバーは、算術平均値を示している。

【0123】

例

【0124】

材料と方法

【0125】

1. 細胞と培養条件

(LABORATOIRE DE VIROLOGIE, Lille, FranceのHUBER博士によって提供される) HeLa-CD4+細胞とU937細胞はそれぞれの培養を、DMEM培地またはRPMI1640培地で行うが、両培地は、熱により不活性化した10%のウシ胎児血清(LIFE-TECHNOLOGIES-INVITROGEN, Cergy-Pontoise, France)、2mMのL-グルタミン(LIFE-TECHNOLOGIES-INVITROGEN, Cergy-Pontoise, France)および1%のゲンタマイシン(SHERING-PLOUGH, Levallois-Perret, France)を補われている。

【0126】

2. ヒトの末梢血単核細胞(PBMC)の調製

静脈血をHIV-1に血清反応陽性の患者から採取し、そして末梢血単核細胞

(PBMC)をFicoll-Hypaque (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Uppsala, Sweden)に基づく遠心分離により単離する。細胞を丁寧に洗浄して血小板を除去し、そして抗CD8抗体で覆った電磁球 (DYNAL, Oslo, Norway) を用いてCD8+細胞を消耗させる。メーカーのプロトコルの実行により得られた消耗したPBMCは、フローサイトメトリーによる分析の後、3%未満のCD8+細胞を含む。続いて細胞を、熱により不活性化した10%のAB血清 (ETABLISSEMENT DE TRANSFUSION SANGUINE, Lille, France) を補ったRPMI 1640で培養し、つぎにフィットヘマグルチニン (PHA) で刺激する (5 µg/mlで3日間)。つぎに、PBMCを、ムラブチド (N アセチル - ムラミル - L - アラニル - D - グルタミン - n - ブチルエステル) (ISTAC SA, Lille, France) によって提供される (10 µg/ml)、およびインターロイキン2 (IL-2) (10 µg/ml) の存在下または不在下で、6ないし24時間、培養してから、回収する。

【0127】

3. 「ディファレンシャルディスプレイ - RT - PCR」 (DD - RT - PCR) 実験

前述したようにDD - RT - PCRを、HIV 1患者から得たPHAの活性化とCD8の消耗をしたPBMCからの全RNA抽出物で実施する (Liang et Pardee, 1992に幾らか修正を加えた)。簡潔には、1mgの全RNAを、75 °Cで10分間、2mMのオリゴ (dT) プライマー、T₁₂BA (BはG、T、Cの混合物)、T₁₂VT (VはA、G、Cの混合物)、T₁₂HG (HはA、C、Tの混合物)、T₁₂DC (DはA、G、Tの混合物)、そしてリボヌクレアーゼのない水と共に、最終的な体積が11 µlの状態に培養した。つぎに相補的DNA (cDNA) を、RNアーゼHスーパースク립ト逆転写酵素 (LIFE - TECHNOLOGIES - INVITROGEN, Cergy - Pontoise, France) を用いて合成するが、それは10mMのジチオスレイトール、20 µMのdNTPを含む25 µlにおいて37 °Cで1時間行い、その後95 °Cで10分間変性させる。合成したcDNAをつぎに増幅する

が、それは、一ユニットのAmpli Taq Goldポリメラーゼ (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, United States)、2.5mMのMgCl₂、2μMのdNTP、および2μCiの³³P-dATP (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)で、つぎのような特異的な下流のプライマーと上流のランダムプライマーを用いて行う: AP0: TAT CGA CTC CAA G (SEQ ID No 27); AP1: TTA GCT AGC ATG G (SEQ ID No 28); AP2: TGC TAA GAC TAG C (SEQ ID No 29); AP3: TTG CAG TGT GTG A (SEQ ID No 30); AP4: TGT GAC CAT TGC A (SEQ ID No 31); AP5: TGT CTG CTA GGT A (SEQ ID No 32); AP6: TGC ATG GTA GTC T (SEQ ID No 33); AP7: TGT GTT GCA CCA T (SEQ ID No 34); AP8: TAG ACG CTA GTG T (SEQ ID No 35); AP9: TTA GCT AGC AGA C (SEQ ID No 36); AP10: TCA TGA TGC TAC C (SEQ ID No 37); AP11: TAC TCC ATG ACT C (SEQ ID No 38); AP12: TAT TAC AAC GAG G (SEQ ID No 39); AP13: TAT TGG ATT GGT C (SEQ ID No 40); AP14: TAT CTT TCT ACC C (SEQ ID No 41); AP15: TAT TTT TGG CTC C (SEQ ID No 42); AP16: TTA TCT ATA CAG G (SEQ ID No 43); AP17: TTA TGG TAA AGG G (SEQ ID No 44); AP18: TTA TCG GTC ATA G (SEQ ID No 45); AP19: TTA GGT ACT AAG G (SEQ ID No 46)。増幅パラメーターは、94 で1分、40 で1分、72 で1分、その後72 で5分の最終伸長の手順が続く。PCR産物をつぎに、6%ポリアクリルアミド 8M尿素ゲルでの電気泳動により分離する。乾燥後、ゲルをつぎにHyperfilm-HPフィルムにさらす。差次的に発現したcDNAバンドを、ゲルから切除

し、100 µlの滅菌水に溶離し、沈殿させ、それから10 µlの滅菌水で再懸濁させる。cDNA断片をついで再増幅するが、それには以上に記載した同じプライマー対を用いて行い、ついで、クローニングベクターTOPO TA PCR II (INVITROGEN, Groningen, The Netherlands) にクローニングする。

【0128】

4. DNA配列:

クローニングされたcDNAは、APPLIED BIOSYSTEMS社製の「PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator」シーケンスキットを用いてシーケンスするために基質として使用した。サンプルを、ABI 377 DNAシーケンサーで電気泳動にかけ、該配列は、APPLIED BIOSYSTEMS社製のABI Prismソフトウェア, version 2.2.1を用いて自動的に読み取られ、そして記録される。ヌクレオチドデータベースにおける相同性検索は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) プログラムを用いて行われた。

【0129】

5. 遺伝子発現検出のための半定量的RT PCR:

RNA plusキット(Q-BIOgene, Illkirch, France)を用いて抽出した全細胞RNAは、DNアーゼIで前処理される。ポリA+ RNA上の第一鎖の合成は、p(dT)₁₅プライマー(BOEHRINGER MANNHEIM, ROCHE DIAGNOSTICS, France)で開始され、そしてモロニーマウス白血病ウイルス(M-MLV)(PROMEGA, Madison, CA, USA)由来の逆転写酵素によって実行した(37 °Cで1時間、92 °Cで3分)。結果としてのcDNAをつぎに、Ampli Taq GoldポリメラーゼDNA (APPLIED BIOSYSTEMS)での反復増幅に25から35回かける。GAPDH配列のPCR増幅を行い、それにより内部コントロールが得られるようにする。特異的なオリゴヌクレオチドプライマーは次の通りである: GAPDH [センス鎖: 5' - GCC ATC AAT

GAC CCC TTC ATT GAC - 3' (SEQ ID No19)
 ; アンチセンス鎖 : 5' - TGA CGA ACA TGG GGG CAT
 CAG CAG - 3' (SEQ ID No20)]、RH116 [センス鎖 :
 5' - GGA AGT ACA ATG AGG GCC TAC AAA - 3'
 ' (SEQ ID No13) ; アンチセンス鎖 : 5' - TCC TCA GT
 C CTA GTA TAT TGC TCC - 3' (SEQ ID No14
)]、SSA - 56 [センス鎖 : 5' - GAA AGA GAG GTC GC
 A GAG GCC TGT - 3' (SEQ ID No47) ; アンチセンス
 鎖 : 5' - TGA TAA GGC TGA GGA AGG GAA ATG
 - 3' (SEQ ID No48)]、Tat (センス鎖 : 5' - CTA GA
 C CCC TGG AAG CAT CCA - 3' (SEQ ID No49
) ; アンチセンス鎖 : 5' - TCG GGC CTG TCG GGT CCC
 CTC - 3' (SEQ ID No50))。

【0130】

全PCR産物をつぎに、2%のアガロースゲルで分離し、ついでエチジウムブ
 ロマイド染色により視覚化する。映像化装置 (IMAGE MASTER 1D
 PRIME, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) を用
 いて、メッセンジャーRNA発現の割合の変化が、前述したように、対応する内
 部標準のレベルに対する標準化を行った後で推定された (Amiel et a
 l., 1999)。

【0131】

6. 完全長cDNAのクローニング :

完全長RH116cDNAのクローニングは、SMART (登録商標) RA
 CE cDNA増幅キット (CLONTECH, Palo Alto, CA, U
 SA) を用いて、CD8を消耗した健常者のPBMCからのポリA+RNAサン
 プルで実行した。さらに、ヒト脾臓ライブラリー (Triplex (登録商標)
 Library CLONTECH) を、メーカーの指示に従って、リン³²
 Pで標識した特異的なプローブでスクリーニングした。

【0132】

7. ノーザンブロッティング分析:

ノーザンブロッティング分析は、メーカーの指示に従って、「Multiple Tissue Northern」キット(MTN(登録商標))(CLONTECH)を用いて行われた。ポリA+RNAをバイブリダイズするのは、オリゴヌクレオチド5'-CGT GCT GAT TCC TCA GTC CTA GTA TAT TGC-3'(SEQ ID No26)および5'-GCA TCT GCA ATG GCA AAC TTC TTG CAT GGC-3'(SEQ ID No18)によるが、該オリゴヌクレオチドは、RH116cDNA配列由来で、また末端をリン³²Pで標識したものである。膜は、ヒト-アクチンcDNAプローブと再びハイブリダイズさせた。

【0133】

8. His-Tagで標識したタンパク質の発現とマウスのポリクローナル抗体の作成:

RH116メッセンジャーRNAの第一の335個のアミノ酸に対応する部分的断片は、特異的なオリゴヌクレオチド(SEQ ID No21とSEQ ID No22)を用いて増幅し、そして前もってBamHIとSalI酵素によって切断された、ベクターpQE-81(QIAGEN, Courtaboeuf, France)にサブクローニングした。結果としてのプラスミドpQE-81-His6-RH116₁₋₃₃₅を、つぎに大腸菌TOP10F'細胞へと形質転換する。形質転換した細胞を、つぎに培養して、1mMのイソプロピル-1-チオ-D-ガラクトピラノシドで、5時間誘導する。変性条件下での精製は、メーカーの推奨により、Ni-NTAビーズ(QIAexpressionist(登録商標)QIAGEN)を用いて行う。

【0134】

RH116₁₋₃₃₅の部分的に組換えられたタンパク質(50μg)を、完全なフロイントアジュバント(SIGMA, Saint-Louis, MI, USA)に乳化させ、腹腔内注射してマウスを免疫化する。その動物を、30日後に不完全なフロイントアジュバント(SIGMA)に乳化した同じ組換えタンパク質50μgにより、さらに15日後にアジュバントのない同じタンパク質50μg

により刺激する。血清を回収するのは最後の刺激から10日後で、そして抗RH116抗体のレベルを試験する。つぎに免疫グロブリンを、カプリル酸を用いる方法(Steinbuch et Audran, 1969)に従って抗血清から精製し、そして飽和した硫酸アンモニウムでの沈殿により濃縮する。免疫化の前に、血清を回収して、ネガティブコントロールとして用いる。抗血清と免疫グロブリンの活性を、以下に述べるように、ELISA法で試験する。

【0135】

9. 間接蛍光抗体法による解析:

間接蛍光抗体法による解析については、HeLa-CD4+細胞をチャンバースライド(NALGE, Nunc, Rochester, NY, USA)で培養し、-20℃で10分間、メタノール/アセトン(2V/1V)混合物で固定しそして透過性を与える。1%のウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSで30分間加湿したあと、サンプルを0.5%のBSAを含むPBSで45分間、室温で一次抗体と培養する。正常なマウスの血清とRH116₁₋₃₃₅に対する抗血清を、1/20に希釈して用いるが;そこでアンチヒストン1モノクローナルIgG2a抗体(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIES, USA)と、このタイプの同位体に対応するコントロールの抗体を1/50の濃度で用いる。PBSでの三回の洗浄の後、サンプルを、FITC(フルオレイセンイソチオシアネート)(SIGMA)と結合したヤギの抗マウスIgG抗体で染色する。数回の洗浄後、サンプルを0.5µg/mlのヨウ化プロピジウムを含むPBSで3分間培養し、つぎに蛍光顕微鏡で検査する。

【0136】

10. 亜細胞の分画:

亜細胞の分画を、Li-Ru et al.(1999)により記載されている通りに準備する。簡潔には、細胞の全細胞溶解物を準備するために、10mM Tris-HCL pH 7.1、1mM EDTA、1%トリトンX-100、1mM PMSF、1mM Na₃VO₄、10µM E-64(トランス-エポキシ-サクシニル-L-ロイシルアミド-(4-グアニジノ)-ブタン)、1µg/mlのペプスタチン、および0.1%のアプロチニンを含む緩衝液で細

胞を溶解する。核分画の準備には、細胞ペレットを、低張緩衝液(20 mM HEPES pH7.4、1 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.5%のNonidet P40、0.5 mM ジチオスレイトール(DTT)、1 mM PMSF、1 mM Na₃VO₄、10 μM E64、1 μg/ml ペプスタチン、そして0.1%のアプロチニン)で30分間、4℃で培養する。遠心分離の後、結果として生じた、核を含むペレットを、イオン強度の高い緩衝液(1 mM HEPES, pH7.4、20%グリセロール、0.4 M NaCl、1 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.5 mM DTT、1 mM PMSF、1 mM Na₃VO₄、10 μM E64、1 μg/ml ペプスタチン、10 μg/ml ロイペプチン、そして0.1%のアプロチニン)で再び懸濁させる。分画の質は、ヒストン1(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)(核タンパク質)、および58Kゴルジタンパク質(SIGMA)(細胞質タンパク質)に対するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティング法で制御する。

【0137】

11. ウェスタンブロッティング法による分析

細胞溶解物を、100℃で5分間培養した2×SDSローディングバッファーと混合し、つぎに15%ポリアクリルアミドSDS-PAGEゲルでの電気泳動によって分離し、そして最後にはニトロセルロース膜(Hybond-C-Amersham)上に移す。膜を5%の無脂肪ミルクを含むPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で室温で1時間飽和させ、その後で一次抗体(アンチヒストン1抗体を1/100に希釈;抗58Kゴルジ抗体を1/1000に希釈)を4℃で一晩培養する。PBS 0.1% Tween-20での洗浄後、膜は、セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合した二次抗体(1/1000)(SIGMA)と室温で1時間培養する。膜に移したバンドを、強化した化学ルミネセンス試薬(ECL)(Amersham)で培養することにより検出し、そしてKODAK XOMATフィルムに露光する。

【0138】

12. 免疫沈降

それぞれの細胞抽出物の500 µgは、クロロミンT方法を用いて、500 µCiの¹²⁵Iヨウ素で放射性同位元素による標識をする。3 × 10⁶ CPMの細胞抽出物を、正常なマウス血清と50 µlのプロテインGセファロース (PHARMACIA) と共に2時間前処理するが、それはTNSTEN緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH8.2、0.5 M NaCl、0.1% SDS、0.5% トリトン X100、5 mM EDTA、0.02% NaN₃、そして0.1%のアプロチニン) において行う。免疫沈降は、抗RH116₁₋₃₃₅血清から、または正常な血清と50 µlのプロテインGセファロースから精製した、20 µgの免疫グロブリンを添加することによって行う。4 で一晩培養した後、セファロースビーズをTNSTEN緩衝液で十回洗浄し、つぎに2X濃縮SDS-PAGEローディングバッファーにおいて再懸濁、ついで沸騰させる。タンパク質は、8% SDS PAGEゲル上に分離し、つぎにオートラジオグラフィーにより分析する。

【0139】

13. DNAトランスフェクション:

使用されたすべてのプラスミドは、エンドトキシンのない材料 (「EndoFree (登録商標)」、Giga Kit、QIAGEN) を用いて調製した。HeLa-CD4+細胞における一過性発現のために、RH116 cDNAを含むXhoI-BamHI断片を、哺乳類発現ベクターpEGFP-N1 (CLONTECH) にサブクローニングする。結果として生じるキメラ構造物は、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) のカルボキシ末端の端に融合した、完全長RH116タンパク質からなる。cDNAの正確なリーディングフレームにおける融合の制御は、シーケンシングによる。(本発明者等の実験室で得ることが可能な)SSAのような任意のタンパク質のコード配列は、pEGFP-N1ベクターにサブクローニングし (GFP-SSA)、コントロールとして用いた。ポジティブコントロールについて、本発明者等が研究したのは、前述したようなpCR3にクローニングされたTatの一過性発現の効果であり (Billaut-Mulot et al., 2001);つまり天然のpCR3は、対応するコントロールとなる。トランスフェクションは、トランスフェクション試薬としてメ

ーカーのプロトコルに従ってEffectene (QIAGEN) を用いて行う。簡潔には、トランスフェクションの前日に、ウェル当たり 2×10^5 個の細胞を12ウェルプレートに播種し、ついで三回の実験において、 $1 \mu\text{g}$ のDNAと $10 \mu\text{l}$ のEffecteneを用いてトランスフェクションする。細胞は、トランスフェクションの24時間後にHIV-1_{LA1}に感染させる。

【0140】

14. インビトロ感染

HIV-1_{LA1}に対する親和性をもったT細胞株を、Laboratoire de Virologie Centrale de Lille, Franceから入手した。トランスフェクションした細胞を感染させるために、 5×10^4 CPMのウイルス逆転写酵素(RT)を、各ウェルに加える。細胞を、37度で一晩培養する。つぎにウイルスを除去し、細胞を2度洗浄し、新鮮な培地を加える。感染の1日後、および次の4日間、上澄みをそれぞれのウェルにおいて採取し、細胞を回収し、数える。ウイルス複製の評価は、感染の24時間後のHIV-1のDNAとRNAの検出により、あるいは、感染の2日から5日後の間の、上澄みにおけるp24タンパク質の存在の検出により行う。

【0141】

15. HIV-1のDNAとRNAの検出

全細胞DNAを、感染の24時間後に、HIV-1に感染した細胞から抽出し、そして「Ampli Taq Gold」DNAポリメラーゼで35回の増幅にかける。 - アクチン配列のPCR増幅は、オリゴヌクレオチド5' - GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG - 3' (SEQ ID No 51) および5' - GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG - 3' (SEQ ID No 52) で実行し、それにより細胞間の等価性を標準化する。各サンプルのHIV-1プロウイルスDNAの測定に使うのは、プライマ - GAG06 (5' - GCI TTI AGC CCI GAA GTI ATA CCC ATG - 3' ; SEQ ID No 53) およびGAG04 (5' - CAT ICT ATT TGT TCI TGA AGG GTA CTA G - 3' ; SEQ ID No 54) である。HIV-1のRNAのレベルを測

定するため、全細胞RNAを、RNA plusキット(Q-BIOgene)を使って抽出し、次にrTthポリメラーゼ(Applied Biosystems)を使って増幅を行うが、その際に存在するのは、HIV-1のスプライシングされていないGAG-POL mRNAを検出するための一対のプライマーGAG06-GAG04であり、また前述したような(Amiel et al., 1999)一か所スプライシングされたメッセンジャーRNAの中間的なサイズを検出するための一対のプライマーBSS(5'-GGC TTG CTG AIG NGC ICA CIG CAA GAG G-3'; SEQ ID No55)-KPNA(5'-AGA GTI GTG GTT GNT TCN TTC CAC ACA G-3'; SEQ ID No56)である。PCR産物の全てを、アクリルアミドゲル上で分離させ、エチジウムブロマイド染色によって視覚化する。映像システム(Image Master 1D Prime; Amersham PHARMACIA BIOTECH)を使って、HIV-1 DNAとRNAの発現の変化を、対応する標準的な内部コントロール(それぞれGAPDHまたは-アクチン)に対する標準化の後に推定する。簡潔には、HIV RNAレベルを、-アクチンレベルに標準化するが、それには-アクチンの体積に対するHIVのRNAバンドの体積の比率を計算することによる。したがって、HIV発現の増加率は、RH116、SSAまたはTatでトランスフェクションした細胞と、GFPまたはpCR3でトランスフェクションしたHeLa CD4+細胞を比較することにより推定される。

【0142】

16. p24試験

ウイルス複製の評価を行うのは、HIV-1 p24抗原試験キット(Coulter, Miami, USA)をメーカーの指示に従って用い、培養物の上澄みにおけるp24抗原レベルを測定することによる。

【0143】

17. HIV陽性患者の血清における自己抗体のELISA法による検出

HIV-1患者の血清におけるRH116に対する抗体の存在を評価するために、HIV-1に感染した32人の被験者グループを、潜在的抗レトロウイルス

剤による治療の前と後に試験した。グループは女性8人と男性24人からなり、(25から64歳の範囲で)平均年齢37歳である。抗レトロウイルス治療を始める前に、血漿中の平均ウイルス量は、421326コピー/mlであり、CD4+細胞の平均数(+標準偏差)は150(+14)細胞/ μ lである。2つの逆転写酵素阻害剤と一つのプロテアーゼ阻害剤での14ヶ月の平均的な治療期間の後、ウイルス量は3272コピー/mlの平均レベルに落ち、そしてCD4+細胞の数は313(+23)細胞/ μ lまで増加した。患者の血清における抗体レベルを、対応する性別と年齢のコントロールの健常者40人の血清に存在するレベルと比較する。血清におけるRH116に対する自己抗体の存在を、ELISA法により追求した。簡潔には、プレートを1 μ g/mlのRH116₁₋₃₃₅でコーティングするが、それはコーティング緩衝液(30mM Na₂CO₃、70mM NaHCO₃)において3時間4で行う。0.05%のTween-20(PBS-Tween)を含むPBSでの三回の洗浄後、プレートを1/300から1/2700に希釈した血清で2時間培養する。つぎにプレートを洗浄し、ペルオキシダーゼに結合したヒトIgG抗体(SIGMA)で4で一晩培養する。PBS-Tweenでの3回の洗浄、およびPBSでの一回の洗浄後、プレートを30分間、0-フェニレンジアミン二塩酸塩(SIGMA)の基質0.5mg/mlと、0.1% H₂O₂を用いて成長させ、そして反応を、1N HClの50 μ l/ウェルの添加により止める。吸光度は、自動マイクロプレートリーダー(TITERTEK MULTISKAN, LABYSYSTEMS, Finland)を使って、492nmで読み取る。同様のプロトコルを用いて、免疫化したマウスの血清における抗RH116抗体の存在を評価するが、抗ヒトIgG抗体の代わりに抗マウス抗体を結合に用いることは例外である。

【0144】

例1：ムラブチドにより調節されたRH116遺伝子のDD-RT-PCRによる識別

【0145】

刺激していないPBMCからの、そしてムラブチドで刺激した、CD8を消費し、HIV-1患者から得たPBMCからのRNAのサンプルを、DD-RT-

PCRにより分析する。本発明者等は、HIV陽性患者のPBMCをムラブチドで処理した後、差次的に発現する130を越えるcDNA断片を選択した。これらの断片を、ベクターPcr2.1(Invitrogen)へとサブクローニングし、つぎに自動シーケンス(ABI Prism 377, Perkin-Elmer)でシーケンスした。配列の分析は、相同性を検索するためであり、データバンクとNCBIのBasic Local Alignment Search Tool(Blast 2)サーバーとを用いた。

【0146】

一定数の遺伝子の発現は、ムラブチドで6ないし24時間処理した後、正の調節または負の調節をされているように思われる。これらのうち3つの遺伝子はalu反復に対応し、20の配列がESTまたはゲノムデータバンクの配列に対応し、そして49の配列がよく特徴づけられた遺伝子である。ムラブチドで調節された遺伝子のうち、28が増大した発現を示し、21が抑制された発現を有した。ムラブチドにより正の調節をされた14の遺伝子と、負の調節をされた7の遺伝子の発現特性を、RT-PCRにより、または他の3患者から得た、CD8を消耗したPBMCのRNA抽出物での「ドットプロット」の形(データは示されていない)での逆ノーザンプロット法により確認した。ムラブチドによる発現の調節も、ESTに対応するDD-RT-PCRによって識別された配列、またはデータバンクのゲノム配列から確認した。したがって、6つのクローンが増大した発現を示したが：4つのクローン(クローン1、71、87および99)は6時間の処理に続いて、2つのクローン(クローン11と89)は24時間の処理に続いてである。他方で、識別された4の配列は発現の抑制を誘発する：すなわち2つのクローン(クローン7と10)はムラブチドへの6時間の曝露に続いて、そして2つのクローン(クローン62と96)はムラブチドへの24時間の曝露に続いてである。

【0147】

ムラブチドによって調節され、かつクローン10に対応する新しい遺伝子の発現特性を、半定量的RT-PCRにより研究し、そして対応する完全長cDNAをクローニングして特徴付けた。

【0148】

例2：ムラブチドによって調節されたRH116遺伝子の完全長クローニング

【0149】

クローン10に対応する完全長DNA配列を、5'および3'RACE方法で得た。DDRT-PCRによって得たcDNA断片を基に、5'RACEと3'RACEの第一のサイクルにより、本発明者等が、この新しい遺伝子のポリA+末端を特徴付け、そしてcDNA配列を遺伝子の5'部分で伸長させることができるようになった。cDNAの完全な5'末端は、5'RACEの3つの手順を経て得た。cDNAライブラリーのスクリーニングにより、本発明者等が完全長cDNA配列を確認することが可能になった。完全なヌクレオチド配列を得たのは、2つの異なるクローンの重複する配列を決定することによる。完全長cDNAの配列を、GeneBankに提出した(アクセッション番号AY017378)。

【0150】

更に詳細には、DD-RT-PCRによって得た長さ164bpの断片(SEQ ID No3)から、本発明者等は二つの特異的なプライマーを合成したが、そこにはF1:5'TGA TGA GGG TGG TGA TGA TGA GTA TTG TG 3'(SEQ ID No4)が含まれ、それにより5'および3'RACEによる第一の増幅を実現するようにする。したがって本発明者等は、F1からの増幅により1284bpの断片を得ることができた。この断片は幾つかの手順でシークエンスしたが、それは特異的な内部プライマーF2(5'-GCA GTG AGT TCA AAC CCA TGA CAC AGA ATG-3')(SEQ ID No5)およびR2:(5'-CAG CAT TCT GAA TAG TCA AGA TTG GGA AAT G-3')(SEQ ID No6)を用いることにより;この断片の配列は、配列SEQ ID No7に対応する。このことが示すのは、潜在的な終止コドンまでの380個のアミノ酸のオープンリーディングフレームであり、該終止コドンの119bp後に、ポリA+尾部が続く(図1)。

【0151】

cDNAの5'部分を得るために、本発明者等が合成したのは、プライマーR3 (SEQ ID No 8) であり、それはF1に対して相補的な配列に対応しており；プライマーR3は、PCR後に、194bpの配列を得ることを可能にする(図2Aに点線...で示される)。

【0152】

この配列から、本発明者等が合成したのは新しいプライマーR8 (SEQ ID No 9) : 5' - GTA GGG CCT CAT TGT ACT TC C TCA AAT - 3') であり、それにより決定するのはcDNAの位置5'における配列であり：PCR反応により、約1200bpの断片(図2aに破線- - - -で示される)を得ることが可能になった (SEQ ID No 10) 。断片の完全なシーケンシングを実現するのはいくつかの手順により、それは内部オリゴヌクレオチドR8 - seq 1 (5' CTC CAA CAC CA G GTG AAG CTG 3') (SEQ ID No 11) およびR8 - seq 2 (5' CAG ATG AAG AGA ATG TGG CAG 3') (SEQ ID No 12) を用いることによる。リーディングフレームはオープンのみであり、それにより853aaのリーディングフレームの識別が可能になる。

【0153】

これらの二つの配列から、本発明者等が合成したのは、二つのプライマーHELI 1 (5' - GGA AGT ACA ATG AGG GCC TAC AAA - 3') (SEQ ID No 13) およびHELI 2 (5' - t c c t c a g T c c t a g t a t a t t g c t c c - 3') (SEQ ID No 14) であるが、それぞれ断片F1とR3から取って、それにより対応するmRNAの差別的な発現の分析のためのRT-PCRを行う(例4参照)。

【0154】

配列SEQ ID No 10から、本発明者等が合成したのは、一つの新しいプライマーR16 (5' - CTA AGC AGC TGA CAC TTC CTT CTG CCA AAC TTG TGT CTG - 3') (SEQ

ID No 15)であり、それによりcDNAを5'に戻すようにしたが; PCR反応により、964bp断片(図2bで破線(-----)で示される)を得ることが可能になった。

【0155】

PCR反応(5'RACE)の後に得られた964bpの5'末端は、潜在的なATGコドンを含み、それに先行して終止コドンが位置し、その存在は後に確認されることになる。それゆえこの方法により、本発明者等は1025個のアミノ酸のオープンリーディングフレーム(ORF open reading frame)を得ることができた。

【0156】

RH116に対応するcDNAの完全な配列は、ここでは3372bpであり、SEQ ID No 1に対応し、SEQ ID No 2に対応する1025aaのタンパク質をコードする。

【0157】

SEQ ID No 1の特異的な二つのプライマ-F4:(5'-ggg ccc tgt gga caa cct cgt cat tgt-3')(SEQ ID No 16)およびR14:(5'-CCA GAG TGG CTG TTT ACA TTG CCA AGG ATC ACT-3')(SEQ ID No 17)を用いるPCR方法が開発されたのは、ATG翻訳開始コドンの存在、ならびにそのコドンの上流における終止コドン(TGA)の存在を確かめるためである。そのため、本発明者等は、以上に述べた二つのプライマーを用いて5'RACE基質でPCRを行い、またクローニングおよびシーケンスされた、期待したサイズの断片を得た。この断片の配列により確認されたのは、開始コドンであるATGコドンの前にTGAコドンが存在することであり、そのようにして、本発明者等はcDNAの完全なコピーを得たことを確認した。

【0158】

cDNA配列(3372の塩基対)が含むのは、位置155での開始コドン一つと、3075の塩基対のオープンリーディングフレーム(ORF)、ならびに21の塩基対のポリA+尾部の24塩基対上流に位置するコンセンサスポリアデ

ニル化シグナルAATAAAAを伴う141塩基対の3'非転写領域が一つある。ORFは1025個のアミノ酸ポリペプチドをコードするが(図2B)、116kダルトンの計算された分子量と5.2の等電点をもつ。

【0159】

例3：完全長のRH116配列とデータベースの配列との比較研究

【0160】

本発明者等は、1025個のアミノ酸の推定されたアミノ酸配列と、データベースに存在する配列とを比較した。

【0161】

本発明者等が識別したのは、この配列における、RNAヘリカーゼスーパーファミリー、より正確には、ATP依存RNAヘリカーゼ機能をもつことが知られているタンパク質ファミリーに属する保存されたドメインである。この配列相同性に基づくヘリカーゼのクラス(Luking et al., 1998)の中にあるのは、「DEAD-BOX」と呼ばれるタンパク質である。すべての「DEAD-BOX」RNAヘリカーゼの一つの重要な特徴は、保存された距離で互いに間隔をおいて、特徴的なモチーフが存在することである(Luking et al., 1998; Linder et Daugeron, 2000)。小さな差異はあるものの、これらモチーフは、クローニングされた新しい配列にも存在する(図3Aと3B)。その点から、本発明者等が考えたことは、RH116と呼ばれる、このタンパク質(116kダルトンのRNAヘリカーゼ)が、ATP依存RNAヘリカーゼの「DEAD-BOX」タンパク質のサブファミリーのメンバーを構成することである。本発明者等はまた、アミノ酸の位置349にKKKKモチーフが存在することにも注目したが、二極性の核局在化シグナルモチーフAははっきりと識別されなかった。8か所のN-グリコシル化部位が検出され、潜在的なリン酸化部位が、cAMP依存キナーゼならびにプロテインキナーゼCについても見いだされた；これら部位の生物学的重要性はまだ研究されていない。

【0162】

データバンクで行われた検索の過程で、本発明者等が注目したのは、RH11

6タンパク質が、「DEAD-BOX」タンパク質ファミリーのメンバーと全般的に配列が相同的であることのほかに、仮説上の、および現在のところまだ特徴付けられておらず、「RIG-1」(図3b C)と呼ばれる、Sun, Y.W (Genbank, アクセッション番号: AF038963)によって記載されたヒトRNAヘリカーゼと、高いパーセンテージの相同性を示すことである。配列のアラインメントは、図3b Cに示されている。二つのタンパク質間の全アミノ酸配列の同一性は31%であり、保存的な交換を含む類似性は44%である。

【0163】

様々なデータベースの検索により、本発明者等は他の様々なゲノムクローンにヌクレオチド配列の一部を見つけることができた。配列の一部は、アクセッション番号gb/AC007750で登録されたNH0576116クローンに見出され、第二の部分はNoAC108176で登録されたゲノムクローンRP11-214A4に見出された。また特に言及すべきは、EMBLデータベースにおいてアクセッション番号AW589567、AW152541およびAW189584で登録されているEST(発現した配列タグ)であって、これらそれぞれが、配列SEQ ID No1の配列2879-3350、2870-3350および2818-3350の断片のそれぞれと、100%、99%および97%の相同性を示していることである。

【0164】

例4: RH116のmRNAのさまざまな組織における発現のノーザンブロット法による研究

【0165】

さまざまな組織のポリA+RNAを試験するのはノーザンブロット法によるが、用いたのは、末端を標識し、かつRH116のcDNA配列由来のオリゴヌクレオチドであり;コード配列に特異的な、ヌクレオチド配列5'-GCA TCT GCA ATG GCA AAC TTC TTG CAT GGC-3'(SEQ ID No18)およびヌクレオチド配列5'-CGT GCT GAT TCC TCA GTC CTA GTA TAT TGC-3'(SE

Q I D No 26) を合成し、そして³²P (T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ , Amer sham) で標識し、それによりノーザンブロッティング法を実行するプローブの役目を果たすようにした。2 μ g のポリ A + RNA (Clontec h) を含む膜のハイブリダイゼーションの結果を図4に示した。

【0166】

約3.5 kbに見積もられたサイズのメッセンジャーRNAに対応する特異的なシグナルが検出されたが、それは単離したcDNA配列が完全長配列であることを示す(図4)。12のヒト組織(脳、心臓、骨格筋、結腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺および末梢白血球)におけるメッセンジャーRNAの発現レベルを研究した。放射性シグナルの強度は、脳、結腸、胸腺、小腸および末梢白血球ではやや下がっているが、非常に強力な放射性シグナルが心臓と腎臓に現れた。

【0167】

例5：ムラブチド処理後、または処理のない、HIV陽性患者とコントロールの健常者とのPBMCsにおけるRH116の差次的な発現のRT-PCRによる研究

【0168】

RH116のメッセンジャーRNAの発現は、ムラブチドにより抑制される。本発明者等がさらに研究したのは、RH116メッセンジャーRNAが、ムラブチドにより調節された新しい遺伝子なのかどうかであり、その際にRH116のcDNA由来の特異的なオリゴヌクレオチドを用いた半定量的RT-PCRを用いた。

【0169】

HIVに感染した患者(P)の、あるいはコントロールの健康なドナー(C)のPBMCを、単離し、CD8+リンパ球を消耗し(Dynabeads, Dynal)、およびフィットヘマグルチニンPHA(5 μg/ml)で3日間刺激した。ついで、条件ごとに最低5.10⁶個の細胞の割合で、6ないし24時間、10%のウシ胎児血清(SVF)を補ったRPMI培地で、インターロイキン2(IL2)(10 U/ml)の存在の下に、ムラブチド(10 μg)により、そ

れら細胞を処理し、または処理せずにおいた。処理の後に、細胞のRNAを抽出し(RNAplus, Quantum-bioprobe)、ついでDNアーゼ(Boehringer)で処理し、そしてMu-MLV逆転写酵素(Superscript II, Gibco)の存在下でオリゴ(dT)を用いて逆転写(RT)した。RTの質を検証したのは、PCR(25サイクル)によるが、その際に用いるのは、20、100および500ngの全RNAからの、GAPDHに特異的なプライマー、(5'GCC ATC AAT GAC CCC TTC ATT GAC 3')(SEQ ID No19)および(5'TGACGA ACA TGG GGG CAT CAG CAG 3')(SEQ ID No20)である。つぎに本発明者等は、RT-PCR(35サイクル)を行ったが、その際に使用したのは、新しいRH116ポリペプチドに特異的なプライマーHeli 1とHeli 2(5'GGA AGT ACA ATG AGG GCC TAC AAA 3')(SEQ ID No13)および(5'TCC TCA GTC CTA GTA TAT TGC TCC 3')(SEQ ID No14)である。増幅のサイクル数は、前もって決定された(35サイクル)。増幅した断片を、エチジウムブロマイドが存在するアガロースゲル(1%)上で視覚化し、つぎにprogramme Imager master(Pharmacia)を用いて定量化する。各希釈ごとに、研究対象の遺伝子についての所与の値を、GAPDHの値と関係づける(割合=R)。各患者および各時間(6時間ないし24時間)ごとに、ムラプチドで処理した細胞のRを、処理をしていない細胞のRに関係づける。結果は、処理をしていない細胞に対する遺伝子発現の増加ないし抑制の%で表した。注意すべきは、各希釈の検査ごとに、Rはわずかに変化することがあることであり、複数のRの平均は、常に増幅の直線位相にあるように注意して算出されたことである。

【0170】

この研究は、12人の患者と10人のコントロールの健常者について行われた。患者についての研究により明らかになったのは、6ないし24時間のムラプチドでの処理後に、RH116遺伝子の発現が、処理をしていない細胞に対して有意に抑制されたことである。一方で、健康なドナーのPBMCsで行った研究に

より明らかにされたことは、RH116遺伝子の発現に非常に有意な増大があることであるが、それは特にムラブチドで処理した6時間後である。

【0171】

図5は、処理の6および24時間後に、患者のPBMCsについて得られたRT-PCRの結果を示している。

【0172】

HIV-1に感染した患者から得たCD8を消耗したPBMCについて行った典型的なRT-PCRは、図5Aに示されており、またムラブチドで6ないし24時間処理した後の、メッセンジャーRNAの発現が有意に抑制されることを示している。

【0173】

図5Bに示される結果が示すのは、RH116メッセンジャーRNA発現抑制の平均割合であり、実証しているのは、5人の患者のCD8を消耗したPBMCをムラブチドで処理すると、RH116メッセンジャーRNAの発現が相当に抑制されることであり、このときムラブチド処理の6時間後に患者第5号に最大平均抑制(90%)が観察されており、そしてこの効果は、24時間維持可能であり、最大平均抑制(57%)は患者第3号で観察された。

【0174】

例6：大腸菌システム(pQE)における組換えタンパク質の発現

【0175】

PCRを行ったのは脾臓cDNAであり、ATG:Helix ATG:(5'-TGA GAG GAT CCG ATG TCG AAT GGG TAT TCC 3')(SEQ ID No21)、およびSTOP(5'-AAT GTC GAC CTA ATC CTC ATC ACT AAA TAA-3')(SEQ ID No22)に対応するヌクレオチドプライマーを用いた。

【0176】

断片を、BamHI/SalI制限酵素で消化したベクターpQE80(Qiagen)にクローニングした。

【0177】

TOP 10F' バクテリアの形質転換後、組換えタンパク質の発現をIPTGで誘発し、発現時間を最適化し2時間と見積もったが、実際には、5時間の誘発後にも、本発明者等は組換えタンパク質を全く検出できなかった。タンパク質は弱く発現しており(培養物の500ml当たり約500 μ g)、しかも可溶性の形を呈している。

【0178】

例7：真核生物システムにおける組換えタンパク質の発現

【0179】

「RH116」タンパク質は、哺乳類の細胞の細胞質ないし核に発現するので、本発明者等は、真核細胞に組換えタンパク質を過剰に発現させる方法を開発し、それによりHIVの制御における役割を評価した。

【0180】

そのために、cDNAの完全なコピーの増幅に用いたプライマーは、heli-GFP-ATG(Xho I)(5'-TGA GAG CTC GAG ATG TCG AAT GGG TAT TCC ACA GAC-3')(SEQ ID No23)およびHeli-GFP(Bam HI)(5'-TGT TTA TTT AGT GAT GAG GAT CGG GAT CCG ATT GAA-3')(SEQ ID No24)であり；増幅した断片を、Xho I/BamHIで消化したベクターpEGFPにクローニングし、それからシークエンスした。「グリーン蛍光タンパク質」(GFP)をコードするcDNAは、クローニングした挿入断片の3'に位置づけられた。

【0181】

更に、cDNAの完全なコピーの増幅に用いたプライマーは、Heli ATG Bam(5'-TGA GAG GAT CCG ATG TCG AAT GGG TAT TCC-3')(SEQ ID No21)およびHeli STOP XhoI(5'-ttc aat ctc gag atc ct c atc act aaa taa aga-3')(SEQ ID No25)であり、増幅した断片を、BamHI/Xho Iで消化したベクターpc

DNA 6にクローニングした。このシステムにおいて、タンパク質は6つのヒスチジンおよびタンパク質V5に融合させるが、該タンパク質に対しては、モノクローナル抗体が使用できる。

【0182】

例8：真核細胞におけるトランスフェクション

【0183】

トランスフェクション実験は、cos-7細胞とHeLa細胞において実施し、それに使用したのは、例5で述べたような、RH116ポリペプチドの完全な配列を含む、組換えプラスミドpEGFPとpcDNA6である。

【0184】

トランスフェクションを行ったのは(Effectene-Qiagen)、1µgの組換えプラスミドと10µlのEffecteneによる。RT-PCR分析により、RH116ポリペプチドをコードするmRNAの過剰発現を確認できた。融合した組換えタンパク質の発現の検証は、フローサイトメトリー(GFPとの融合)またはウェスタンブロットティング法(V5-HIS6との融合)で行った。

【0185】

例9：RH116タンパク質をコードするcDNA分子の特徴付け

【0186】

天然のRH116タンパク質分子の特徴付けは、免疫グロブリンを用いて行ったが、該免疫グロブリンは、部分的に組換えたRH116₁₋₃₃₅タンパク質に対するマウスの血清を精製したものである。細胞の標識、および免疫沈降は、130から140kダルトンのタンパク質産物を産生するが、それはコードされたタンパク質の計算された分子量と整合しており、該タンパク質は高度にグリコシル化されていなければならない。RH116タンパク質は、U937細胞から得られた全細胞溶解物、および核抽出物の濃縮分画で免疫沈降した(図6A)。類似の結果は、HeLa細胞についても得られる(データは示されていない)。図6Bは、亜細胞分画の質の制御を示し、また濃縮された核抽出物を表すが、該抽出物は、全抽出物におけるヒストン1(34kダルトン)の増大した発現、および

細胞質タンパク質のより少ない発現（約60kダルトンと40kダルトン）を示している。

【0187】

例10：RH116タンパク質の免疫局在の研究

【0188】

天然のRH116タンパク質の細胞局在を調べるため、本研究者等が行ったのは、HeLa-CD4+細胞の単層培養での免疫細胞化学実験である（図7）。RH116₁₋₃₃₅タンパク質に対するマウスの抗体は、HeLa-CD4+細胞の細胞質を強く染色する（図7C）。正常なマウスの血清をネガティブコントロールとして用い（図7A）、そして核の染色を抗ヒストン1モノクローナル抗体の使用によって観察する（図7B）。RH116タンパク質の局在もまた、U937細胞の免疫局在の研究によって確認される（データは公開されていない）。更に、異なっているのは、GFP（GFP-RH116）のカルボキシ末端に融合した完全長RH116タンパク質をコードするキメラcDNA構造体によってトランスフェクションしたHeLa-CD4+細胞におけるRH116タンパク質の細胞内の局在である。実際、トランスフェクションしたHeLa-CD4+細胞で発現したGFP-RH116タンパク質の標識は、細胞質と核での局在を示す（データは示されていない）。この所見は、免疫沈降分析や、RNAヘリカーゼの「DEAD-BOX」タンパク質サブファミリーメンバーの推定上の活性より、はるかに確実なものである。

【0189】

例11：RH116によるP24ウイルスタンパク質の発現の増大

【0190】

ムラブチドの「HIV阻害剤」活性によって発現が抑制される、RH116タンパク質の推定上の役割を解明する目的において、本発明者等が明らかにしようと試みたのは、RH116がウイルスの発現の制御におけるある役割を果たせるかどうかである。したがって、本発明者等が着手したのは、GFP-RH116タンパク質をトランスフェクションされ、かつHIV-1_{LAI}ウイルスに24時間後に感染したHeLa-CD4+細胞によるP24の発現の研究である。

【0191】

様々な時点での培養物の顕微鏡検査、トリパンブルー染色による分析が明らかにしたことは、GFP-RH116でトランスフェクションした細胞の感染は、GFPによってトランスフェクションした細胞やGFP-SSA（関連のないタンパク質）細胞の感染と比較して、細胞の生存率に影響することである。したがって本発明者等は、 5×10^5 の細胞ごとにP24抗原のレベルを標準化した。GFP、GFP-RH116またはGFP-SSAを発現するHeLa-CD4+細胞の上澄みにおけるP24ウイルスタンパク質の発現の研究を、5つの個別実験で行った。pCR3とpCR3-Tatで形質転換したHeLa-CD4+細胞の上澄みにおけるP24ウイルスタンパク質の発現の研究は、3つの個別実験で行った。図8Aと8Bに示されるのは、得られた結果である。図8Aが示すのは、GFP-RH116でトランスフェクションしたHeLa-CD4+細胞の上澄みにおけるP24抗原（ナノグラム/ml ± 標準偏差）の発現が、GFPを発現する細胞（第3日と第5日でそれぞれ $2.65 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$ と $690 \pm 272 \text{ ng/ml}$ ）と比べ、第3日（ $12.1 \pm 1.48 \text{ ng/ml}$ ）から第5日（ $9770 \pm 648 \text{ ng/ml}$ ）まで劇的に抑制されたことである。

【0192】

pCR3-Tatでトランスフェクションした細胞の上澄みにおけるP24抗原のレベルは、図8Bに（ナノグラム/ml + 標準偏差）で示されている。予想された通り、その結果が示すのは、pCR3でトランスフェクションした細胞の第2日（ $1 \pm 0.08 \text{ ng/ml}$ ）および第5日（ $74 \pm 22 \text{ ng/ml}$ ）に比べ、第2日（ $2.2 \pm 0.18 \text{ ng/ml}$ ）から第5日（ $2.994 \pm 391 \text{ ng/ml}$ ）までTatでトランスフェクションした細胞によるP24放出の相当な増大である。図8Cは、3または5の個別実験で得られた増加倍率を示している。これらの結果が明らかに示すのは、GFP-RH116の過剰発現は、GFP-SSAの過剰発現（第2日： 1.18 ± 0.25 ；第5日： 1.35 ± 0.37 ）に比べて、第2日（ 3.43 ± 0.17 ）から第5日（ 18.2 ± 10 ）まで、P24の相当な増大を誘発することであり、また同等な増加がTATの過剰発現で得られることである（第2日： 3.0 ± 8.42 ；第5日： $18.7 \pm$

4.2)。

【0193】

例12：RH116タンパク質によるウイルスP24 mRNAの発現調節

【0194】

RH116の過剰発現に反応してP24の発現が増大するメカニズムを決定するために、本発明者等は、トランスフェクションされかつ感染したHeLa-CD4+細胞の全RNAを単離し、つぎに、スプライシングされていない、一か所スプライシングされた、あるいは中間サイズのメッセンジャーRNAのレベルを、半定量的RT-PCRにより決定した。HIVのメッセンジャーRNA発現の増加倍率を、3つの個別実験で得た(平均+標準偏差)(データは示されていない)。まず始めに、GFP単独でトランスフェクションした細胞と比較して、GFP-RH116でトランスフェクションをした細胞はGFP-SSAでトランスフェクションした細胞よりも、スプライシングされていないRNAでより高いレベルを示した(それぞれ 3.14 ± 1.5 および 0.81 ± 0.12)。中間のサイズの、または一か所スプライシングされたHIV-1のmRNAもまた、GFP-SSAでトランスフェクションした細胞(0.91 ± 0.14)に比べ、GFP-RH116でトランスフェクションした細胞(2.81 ± 0.73)において増加した。

【0195】

Tatの過剰発現に関しては、二つの独立した実験から結果が得られ；スプライシングされていない、および中間サイズの、または一か所スプライシングされたメッセンジャーRNAレベルは、それぞれ 4.75 ± 1.25 および 4.18 ± 0.31 である。感染の3日後に得られたRT-PCRの分析が、図9に示されている。図9Aは、RH116、SSAまたはTATのmRNAの過剰発現が、一過性トランスフェクションされた細胞において起こったことを示す。図9Bが示すのは、過剰に発現したRH116タンパク質(右側)とTATタンパク質(左側)の、スプライシングされていない、または中間サイズの、または一か所スプライシングされたmRNAの増大である。プロウイルスDNAの形成の研究(図8C)が明らかにしたことは、トランスフェクションした細胞のいずれにも

有意な差はないことである。これらの結果が示唆することは、RH116によるHIVの発現の調節は、転写または転写後のレベルで起きることである。

【0196】

例13：HIV-1に感染した患者における自己抗原を構成するRH116タンパク質

【0197】

RH116が自己抗原となりうるかという問題は、ELISA分析により、健康なドナーから得た血清と、抗レトロウイルス治療の前と後にHIV-1患者から得た血清とを用いて研究された。図10に示された結果は、コントロールの健康者からのものと比較して、患者からの血清における自己抗体レベルが有意に増加していることを実証している。その上、治療を行わないHIV-1患者において観察されたRH116自己抗体の高レベルは、効果的な抗レトロウイルス剤での有意な治療を行った後でさえも、常に有意なものとなっている。

【0198】

参考文献

Amiel et al. (1999) J. Infect Dis. 179: 83-91.

Billaut-Mulot et al. (2001) Vaccine In press.

Blundell (1996) Nature 384: 23.

Buckholz (1993) Curr. Op. Biotechnology 4: 538.

Carter (1993) Curr. Op. Biotechnology 3: 533.

Duck et al. (1990) Biotechniques 9: 142.

Edwards et Aruffo (1993) Curr. Op. Biotechnology 4: 558.

Epstein (1992) Medicine/Sciences 8: 902

- .
- Fruehleis et al. (1987) *Int. Ed. Engl.* 26 : 403 .
- Godbout et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 : 21161 .
- Gorbalenya et al. (1988) *Nature* 333 : 22 .
- Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 1874 .
- Jaramillo et al. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11 : 5992 .
- Kievitis et al. (1991) *J. Virol. Methods* 35 : 273 .
- Kohler et Milstein (1975) *Nature* 256 : 495 .
- Kwoh, et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 1173 .
- Lain et al. (1990) *Nucleic Acid. Res.* 18 : 7003 - 7006 .
- Landegren et al. (1988) *Science* 241 : 1077 .
- Lee et Hurwitz (1993) *Drosophila J. Biol. Chem.* 268 : 16822 - 16830 .
- Liang et Pardee (1992) *Science* 257 : 967 - 971 .
- Linder et al. (1989) *Nature* 337 : 121 - 122 .
- Linder et Daugeron (2000) *Nat. Struct. Biol.* 7 : 97 - 99 .

- Li-Ru et al. (1999) *J. Virol.* 73:2841-2853.
- Luckow (1993) *Curr. Op. Biotechnology* 4:564.
- Luking et al. (1998) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:259-296.
- Matthews et al. (1988) *Anal. Biochem.* 169:1-25.
- Miele et al. (1983) *J. Mol. Biol.* 171:281.
- Neddleman et Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443.
- Olins et Lee (1993) *Curr. Op. Biotechnology* 4:520.
- Pause and Sonenbery (1992) *EMBO J.* 11:2643-2654.
- Pearson et Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444.
- Perricaudet et al. (1992) *La Recherche* 23:471.
- Perun et al. (1989) *Eds Computer-aided drug design* (Marcel Dekker Inc. New York).
- Rohlmann et al. (1996) *Nature Biotech.* 14:1562.
- Rolfs, A. et al. (1991) *Berlin: Springer-Verlag.*
- Rozen et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:1134.

Segev (1992) Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.

Smith et Waterman (1981) Ad. App. Math. 2 : 482.

Steinbuch et Audran (1969) Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. 14: 1054-1058.

Stewart et Yound (1984) Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford.

Takeda et al. (1999) J. Immunol. 163: 6269-6274.

Temin, (1986) Retrovirus vectors for gene transfer. In Kucherlapati R., Ed. Gene Transfer.

Van de Waterbeemd, Advanced Computer-assisted techniques in drug discovery (Verlagsgesellschaft, Weinsheim, 1994).

Walker et al. (1982), EMBO J. 1: 945-951.

【0199】

【図面の簡単な説明】

【図1】RH116をコードするcDNAの3'末端を得る方法を示した図

。

【図2】RH116をコードするcDNAの5'領域を得る方法を示した図

。

【図3】ヒトRNAヘリカーゼRH116と推定されるアミノ酸配列とRNAヘリカーゼ(RIG-1)と推定されるものとの比較を示した図。

【図4】多様なヒト組織におけるRH116メッセンジャーRNA発現のノ

ーザンプロットによる分析結果。

【図5】内因性感染およびCD8を消耗したPBMCにおけるムラブチドによって誘発されるRH116メッセンジャーRNAの発現の抑制を示した図。

【図6】U937細胞から得た¹²⁵Iヨウ素で標識した細胞抽出物からのRH116タンパク質の免疫沈降を示した図。

【図7】HeLa-CD4+細胞におけるRH116タンパク質の免疫局在を示した写真。

【図8】トランスフェクションされ、かつHIV-1_{LA1}ウイルスに感染したHeLaCD4+細胞によるウイルス抗原P24の発現を示したグラフ。

【図9】HIV-1_{LA1}ウイルスに感染し、またトランスフェクションしたHeLa-CD4+細胞におけるウイルスDNAとメッセンジャーRNAの発現を示す半定量的RT-PCRの結果。

【図10】コントロールの健常者と抗レトロウイルス治療の前後のHIV感染患者におけるRH116タンパク質に対する自己抗体の検出を示したグラフ。

【配列表】

105		110		115												
ctc	ctt	cag	ccc	act	ctg	gtg	gac	aag	ctt	cta	gtt	aga	gac	gtc	ttg	559
Leu	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Val	Asp	Lys	Leu	Leu	Val	Arg	Asp	Val	Leu	
120					125					130					135	
gat	aag	tgc	atg	gag	gag	gaa	ctg	ttg	aca	att	gaa	gac	aga	aac	cgg	607
Asp	Lys	Cys	Met	Glu	Glu	Glu	Leu	Leu	Thr	Ile	Glu	Asp	Arg	Asn	Arg	
			140						145					150		
att	gct	gct	gca	gaa	aac	aat	gga	aat	gaa	tca	ggg	gta	aga	gag	cta	655
Ile	Ala	Ala	Ala	Glu	Asn	Asn	Gly	Asn	Glu	Ser	Gly	Val	Arg	Glu	Leu	
			155					160						165		
cta	aaa	agg	att	gtg	cag	aaa	gaa	aac	tgg	ttc	tct	gca	ttt	ctg	aat	703
Leu	Lys	Arg	Ile	Val	Gln	Lys	Glu	Asn	Trp	Phe	Ser	Ala	Phe	Leu	Asn	
		170					175						180			
gtt	ctt	cgt	caa	aca	gga	aac	aat	gaa	ctt	gtc	caa	gag	tta	aca	ggc	751
Val	Leu	Arg	Gln	Thr	Gly	Asn	Asn	Glu	Leu	Val	Gln	Glu	Leu	Thr	Gly	
	185					190					195					
tct	gat	tgc	tca	gaa	agc	aat	gca	gag	att	gag	aat	tta	tca	caa	gtt	799
Ser	Asp	Cys	Ser	Glu	Ser	Asn	Ala	Glu	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Gln	Val	
200					205					210					215	
gat	ggt	cct	caa	gtg	gaa	gag	caa	ctt	ctt	tca	acc	aca	gtt	cag	cca	847
Asp	Gly	Pro	Gln	Val	Glu	Glu	Gln	Leu	Leu	Ser	Thr	Thr	Val	Gln	Pro	
			220						225					230		
aat	ctg	gag	aag	gag	gtc	tgg	ggc	atg	gag	aat	aac	tca	tca	gaa	tca	895
Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Trp	Gly	Met	Glu	Asn	Asn	Ser	Ser	Glu	Ser	
			235					240					245			
tct	ttt	gca	gat	tct	tct	gta	gtt	tca	gaa	tca	gac	aca	agt	ttg	gca	943
Ser	Phe	Ala	Asp	Ser	Ser	Val	Val	Ser	Glu	Ser	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala	
		250					255					260				
gaa	gga	agt	gtc	agc	tgc	tta	gat	gaa	agt	ctt	gga	cat	aac	agc	aac	991
Glu	Gly	Ser	Val	Ser	Cys	Leu	Asp	Glu	Ser	Leu	Gly	His	Asn	Ser	Asn	
	265					270					275					
atg	ggc	agt	gat	tca	ggc	acc	atg	gga	agt	gat	tca	gat	gaa	gag	aat	1039
Met	Gly	Ser	Asp	Ser	Gly	Thr	Met	Gly	Ser	Asp	Ser	Asp	Glu	Glu	Asn	
280					285					290					295	
gtg	gca	gca	aga	gca	tcc	cgg	gag	cca	gaa	ctc	cag	ctc	agg	cct	tac	1087
Val	Ala	Ala	Arg	Ala	Ser	Pro	Glu	Pro	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Pro	Tyr	
			300						305					310		
caa	atg	gaa	ggt	gcc	cag	cca	gcc	ttg	gaa	ggg	aag	aat	atc	atc	atc	1135
Gln	Met	Glu	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Leu	Glu	Gly	Lys	Asn	Ile	Ile	Ile	
			315					320					325			
tgc	ctc	cct	aca	ggg	agt	gga	aaa	acc	aga	gtg	gct	ggt	tac	att	gcc	1183
Cys	Leu	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Arg	Val	Ala	Val	Tyr	Ile	Ala	
		330				335						340				
aag	gat	cac	tta	gac	aag	aag	aaa	aaa	gca	tct	gag	cct	gga	aaa	ggt	1231
Lys	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Lys	Lys	Lys	Ala	Ser	Glu	Pro	Gly	Lys	Val	
	345				350						355					

ata gtt ctt gtc aat aag gta ctg cta gtt gaa cag ctc ttc cgc aag	1279
Ile Val Leu Val Asn Lys Val Leu Leu Val Glu Gln Leu Phe Arg Lys	
360 365 370 375	
gag ttc caa cca ttt ttg aag aaa tgg tat cgt gtt att gga tta agt	1327
Glu Phe Gln Pro Phe Leu Lys Lys Trp Tyr Arg Val Ile Gly Leu Ser	
380 385 390	
ggt gat acc caa ctg aaa ata tca ttt cca gaa gtt gtc aag tcc tgt	1375
Gly Asp Thr Gln Leu Lys Ile Ser Phe Pro Glu Val Val Lys Ser Cys	
395 400 405	
gat att att atc agt aca gct caa atc ctt gaa aac tcc ctc tta aac	1423
Asp Ile Ile Ile Ser Thr Ala Gln Ile Leu Glu Asn Ser Leu Leu Asn	
410 415 420	
ttg gaa aat gga gaa gat gct ggt gtt caa ttg tca gac ttt tcc ttc	1471
Leu Glu Asn Gly Glu Asp Ala Gly Val Gln Leu Ser Asp Phe Ser Phe	
425 430 435	
att atc att gat gaa tgt cat cac acc aac aaa gaa gca gtg tat aat	1519
Ile Ile Ile Asp Glu Cys His His Thr Asn Lys Glu Ala Val Tyr Asn	
440 445 450 455	
aac atc atg agg cat tat ttg atg cag aag ttg aaa aac aat aga ctc	1567
Asn Ile Met Arg His Tyr Leu Met Gln Lys Leu Lys Asn Asn Arg Leu	
460 465 470	
aag aaa gaa aac aaa cca gtg att ccc ctt cct cag ata ctg gga cta	1615
Lys Lys Glu Asn Lys Pro Val Ile Pro Leu Pro Gln Ile Leu Gly Leu	
475 480 485	
aca gct tca cct ggt gtt gga ggg gcc acg aag caa gcc aaa gct gaa	1663
Thr Ala Ser Pro Gly Val Gly Gln Ala Thr Lys Gln Ala Lys Ala Glu	
490 495 500	
gaa cac att tta aaa cta tgt gcc aat ctt gat gca ttt act att aaa	1711
Glu His Ile Leu Lys Leu Cys Ala Asn Leu Asp Ala Phe Thr Ile Lys	
505 510 515	
act gtt aaa gaa aac ctt gat caa ctg aaa aac caa ata cag gag cca	1759
Thr Val Lys Glu Asn Leu Asp Gln Leu Lys Asn Gln Ile Gln Glu Pro	
520 525 530 535	
tgc aag aag ttt gcc att gca gat gca acc aga gaa gat cca ttt aaa	1807
Cys Lys Lys Phe Ala Ile Ala Asp Ala Thr Arg Glu Asp Pro Phe Lys	
540 545 550	
gag aaa ctt cta gaa ata atg aca agg att caa act tat tgt caa atg	1855
Glu Lys Leu Leu Glu Ile Met Thr Arg Ile Gln Thr Tyr Cys Gln Met	
555 560 565	
agt cca atg tca gat ttt gga act caa ccc tat gaa caa tgg gcc att	1903
Ser Pro Met Ser Asp Phe Gly Thr Gln Pro Tyr Glu Gln Trp Ala Ile	
570 575 580	
caa atg gaa aaa aaa gct gca aaa gaa gga aat cgc aaa gaa agt gtt	1951
Gln Met Glu Lys Lys Ala Ala Lys Glu Gly Asn Arg Lys Glu Ser Val	
585 590 595	

tgt gca gaa cat ttg agg aag tac aat aag gcc cta caa att aat gac	1999
Cys Ala Glu His Leu Arg Lys Tyr Asn Lys Ala Leu Gln Ile Asn Asp	
600 605 610 615	
aca att cga atg ata gat gcg tat act cat ctt gaa act ttc tat aat	2047
Thr Ile Arg Met Ile Asp Ala Tyr Thr His Leu Glu Thr Phe Tyr Asn	
620 625 630	
gaa gag aaa gat aag aag ttt gca gtc ata gaa gat gat agt gat gag	2095
Glu Glu Lys Asp Lys Lys Phe Ala Val Ile Glu Asp Asp Ser Asp Glu	
635 640 645	
ggg ggt gat gat gag tat tgt gat ggt gat gaa gat gag gat gat tta	2143
Gly Gly Asp Asp Glu Tyr Cys Asp Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp Leu	
650 655 660	
aag aaa cct ttg aaa ctg gat gaa aca gat aga ttt ctc atg act tta	2191
Lys Lys Pro Leu Lys Leu Asp Glu Thr Asp Arg Phe Leu Met Thr Leu	
665 670 675	
ttt ttt gaa aac aat aaa atg ttg aaa agg ctg gct gaa aac cca gaa	2239
Phe Phe Glu Asn Asn Lys Met Leu Lys Arg Leu Ala Glu Asn Pro Glu	
680 685 690 695	
tat gaa aat gaa aag ctg acc aaa tta aga aat acc ata atg gag caa	2287
Tyr Glu Asn Glu Lys Leu Thr Lys Leu Arg Asn Thr Ile Met Glu Gln	
700 705 710	
tat act agg act gag gaa tca gca cga gga ata atc ttt aca aaa aca	2335
Tyr Thr Arg Thr Glu Glu Ser Ala Arg Gly Ile Ile Phe Thr Lys Thr	
715 720 725	
cga cag agt gca tat gcg ctt tcc cag tgg att act gaa aat gaa aaa	2383
Arg Gln Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Gln Trp Ile Thr Glu Asn Glu Lys	
730 735 740	
ttt gct gaa gta gga gtc aaa gcc cac cat ctg att gga gct gga cac	2431
Phe Ala Glu Val Gly Val Lys Ala His His Leu Ile Gly Ala Gly His	
745 750 755	
agc agt gag ttc aaa ccc atg aca cag aat gaa caa aaa gaa gtc att	2479
Ser Ser Glu Phe Lys Pro Met Thr Gln Asn Glu Gln Lys Glu Val Ile	
760 765 770 775	
agt aaa ttt cgc act gga aaa ata aat ctg ctt atc gct acc aca gtg	2527
Ser Lys Phe Arg Thr Gly Lys Ile Asn Leu Leu Ile Ala Thr Thr Val	
780 785 790	
gca gaa gaa ggt ctg gat att aaa gaa tgt aac att gtt atc cgt tat	2575
Ala Glu Glu Gly Leu Asp Ile Lys Glu Cys Asn Ile Val Ile Arg Tyr	
795 800 805	
ggg ctc gtc acc aat gaa ata gcc atg gtc cag gcc cgt ggt cga gcc	2623
Gly Leu Val Thr Asn Glu Ile Ala Met Val Gln Ala Arg Gly Arg Ala	
810 815 820	
aga gct gat gag agc acc tac gtc ctg gtt gct cac agt ggt tca gga	2671
Arg Ala Asp Glu Ser Thr Tyr Val Leu Val Ala His Ser Gly Ser Gly	
825 830 835	
ggt atc gaa cgt gag aca gtt aat gat ttc cga gag aag atg atg tat	2719

Val Ile Glu Arg Glu Thr Val Asn Asp Phe Arg Glu Lys Met Met Tyr
 840 845 850 855
 aaa gct ata cat tgt gtt caa aat atg aaa cca gag gag tat gct cat 2767
 Lys Ala Ile His Cys Val Gln Asn Met Lys Pro Glu Glu Tyr Ala His
 860 865 870
 aag att ttg gaa tta cag atg caa agt ata atg gaa aag aaa atg aaa 2815
 Lys Ile Leu Glu Leu Gln Met Gln Ser Ile Met Glu Lys Lys Met Lys
 875 880 885
 acc aag aga aat att gcc aag cat tac aag aat aac cca tca cta ata 2863
 Thr Lys Arg Asn Ile Ala Lys His Tyr Lys Asn Asn Pro Ser Leu Ile
 890 895 900
 act ttc ctt tgc aaa aac tgc agt gtg cta gcc tgt tct ggg gaa gat 2911
 Thr Phe Leu Cys Lys Asn Cys Ser Val Leu Ala Cys Ser Gly Glu Asp
 905 910 915
 atc cat gta att gag aaa atg cat cac gtc aat atg acc cca gaa ttc 2959
 Ile His Val Ile Glu Lys Met His His Val Asn Met Thr Pro Glu Phe
 920 925 930 935
 aag gaa ctt tac att gta aga gaa aac aaa gca ctg caa aag aag tgt 3007
 Lys Glu Leu Tyr Ile Val Arg Glu Asn Lys Ala Leu Gln Lys Lys Cys
 940 945 950
 gcc gac tat caa ata aat ggt gaa atc atc tgc aaa tgt ggc cag gct 3055
 Ala Asp Tyr Gln Ile Asn Gly Glu Ile Ile Cys Lys Cys Gly Gln Ala
 955 960 965
 tgg gga aca atg atg gtg cac aaa ggc tta gat ttg cct tgt ctc aaa 3103
 Trp Gly Thr Met Met Val His Lys Gly Leu Asp Leu Pro Cys Leu Lys
 970 975 980
 ata agg aat ttt gta gtg gtt ttc aaa aat aat tca aca aag aaa caa 3151
 Ile Arg Asn Phe Val Val Val Phe Lys Asn Asn Ser Thr Lys Lys Gln
 985 990 995
 tac aaa aag tgg gta gaa tta cct atc aca ttt ccc aat ctt gac tat 3199
 Tyr Lys Lys Trp Val Glu Leu Pro Ile Thr Phe Pro Asn Leu Asp Tyr
 1000 1005 1010 1015
 tca gaa tgc tgt tta ttt agt gat gag gat tagcacttga ttgaagattc 3249
 Ser Glu Cys Cys Leu Phe Ser Asp Glu Asp
 1020 1025
 ttttaaata ctatcagtta aacatttaat atgattatga ttaatgtatt cattatgcta 3309
 cagaactgac ataagaatca ataaaatgat tgttttactc tccaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3369
 aaa 3372
 <210> 2
 <211> 1025
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Ser Asn Gly Tyr Ser Thr Asp Glu Asn Phe Arg Tyr Leu Ile Ser

1	5	10	15
Cys Phe Arg Ala Arg Val Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu 20 25 30			
Asp Tyr Leu Thr Phe Leu Pro Ala Glu Val Lys Glu Gln Ile Gln Arg 35 40 45			
Thr Val Ala Thr Ser Gly Asn Met Gln Ala Val Glu Leu Leu Leu Ser 50 55 60			
Thr Leu Glu Lys Gly Val Trp His Leu Gly Trp Thr Arg Glu Phe Val 65 70 75 80			
Glu Ala Leu Arg Arg Thr Gly Ser Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Met Asn 85 90 95			
Pro Glu Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Phe Glu Asn Ala His Asp 100 105 110			
Glu Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys 115 120 125			
Leu Leu Val Arg Asp Val Leu Asp Lys Cys Met Glu Glu Glu Leu Leu 130 135 140			
Thr Ile Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ala Glu Asn Asn Gly Asn 145 150 155 160			
Glu Ser Gly Val Arg Glu Leu Leu Lys Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn 165 170 175			
Trp Phe Ser Ala Phe Leu Asn Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asn Glu 180 185 190			
Leu Val Gln Glu Leu Thr Gly Ser Asp Cys Ser Glu Ser Asn Ala Glu 195 200 205			
Ile Glu Asn Leu Ser Gln Val Asp Gly Pro Gln Val Glu Glu Gln Leu 210 215 220			
Leu Ser Thr Thr Val Gln Pro Asn Leu Glu Lys Glu Val Trp Gly Met 225 230 235 240			
Glu Asn Asn Ser Ser Glu Ser Ser Phe Ala Asp Ser Ser Val Val Ser 245 250 255			
Glu Ser Asp Thr Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Ser Cys Leu Asp Glu 260 265 270			
Ser Leu Gly His Asn Ser Asn Met Gly Ser Asp Ser Gly Thr Met Gly 275 280 285			
Ser Asp Ser Asp Glu Glu Asn Val Ala Ala Arg Ala Ser Pro Glu Pro 290 295 300			
Glu Leu Gln Leu Arg Pro Tyr Gln Met Glu Val Ala Gln Pro Ala Leu 305 310 315 320			
Glu Gly Lys Asn Ile Ile Ile Cys Leu Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr			

Asp Glu Asp Glu Asp Asp Leu Lys Lys Pro Leu Lys Leu Asp Glu Thr
 660 665 670
 Asp Arg Phe Leu Met Thr Leu Phe Phe Glu Asn Asn Lys Met Leu Lys
 675 680 685
 Arg Leu Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Glu Asn Glu Lys Leu Thr Lys Leu
 690 695 700
 Arg Asn Thr Ile Met Glu Gln Tyr Thr Arg Thr Glu Glu Ser Ala Arg
 705 710 715 720
 Gly Ile Ile Phe Thr Lys Thr Arg Gln Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Gln
 725 730 735
 Trp Ile Thr Glu Asn Glu Lys Phe Ala Glu Val Gly Val Lys Ala His
 740 745 750
 His Leu Ile Gly Ala Gly His Ser Ser Glu Phe Lys Pro Met Thr Gln
 755 760 765
 Asn Glu Gln Lys Glu Val Ile Ser Lys Phe Arg Thr Gly Lys Ile Asn
 770 775 780
 Leu Leu Ile Ala Thr Thr Val Ala Glu Glu Gly Leu Asp Ile Lys Glu
 785 790 795 800
 Cys Asn Ile Val Ile Arg Tyr Gly Leu Val Thr Asn Glu Ile Ala Met
 805 810 815
 Val Gln Ala Arg Gly Arg Ala Arg Ala Asp Glu Ser Thr Tyr Val Leu
 820 825 830
 Val Ala His Ser Gly Ser Gly Val Ile Glu Arg Glu Thr Val Asn Asp
 835 840 845
 Phe Arg Glu Lys Met Met Tyr Lys Ala Ile His Cys Val Gln Asn Met
 850 855 860
 Lys Pro Glu Glu Tyr Ala His Lys Ile Leu Glu Leu Gln Met Gln Ser
 865 870 875 880
 Ile Met Glu Lys Lys Met Lys Thr Lys Arg Asn Ile Ala Lys His Tyr
 885 890 895
 Lys Asn Asn Pro Ser Leu Ile Thr Phe Leu Cys Lys Asn Cys Ser Val
 900 905 910
 Leu Ala Cys Ser Gly Glu Asp Ile His Val Ile Glu Lys Met His His
 915 920 925
 Val Asn Met Thr Pro Glu Phe Lys Glu Leu Tyr Ile Val Arg Glu Asn
 930 935 940
 Lys Ala Leu Gln Lys Lys Cys Ala Asp Tyr Gln Ile Asn Gly Glu Ile
 945 950 955 960
 Ile Cys Lys Cys Gly Gln Ala Trp Gly Thr Met Met Val His Lys Gly
 965 970 975

Leu Asp Leu Pro Cys Leu Lys Ile Arg Asn Phe Val Val Val Phe Lys
 980 985 990

Asn Asn Ser Thr Lys Lys Gln Tyr Lys Lys Trp Val Glu Leu Pro Ile
 995 1000 1005

Thr Phe Pro Asn Leu Asp Tyr Ser Glu Cys Cys Leu Phe Ser Asp Glu
 1010 1015 1020

Asp
 025

<210> 3
 <211> 164
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 aagatgatag tgaatgagggt ggtgatgatg agtattgtga tggatgatgaa gatgaggatg 60
 atttaaagaa accttgaaac tggatgaaac agatagattt ctcatgactt tattttttga 120
 aaacaataaa atgttgaaaa ggctggctga aaaccagaa tatg 164

<210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 tgaatgagggt ggtgatgatg agtattgtg 29

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gcagtgagtt caaacccatg acacagaatg 30

<210> 6
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 cagcattctg aatagtcaag attgggaaat g 31

<210> 7
 <211> 1284
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 tgaatgagggt ggtgatgatg agtattgtga tggatgatgaa gatgaggatg atttaaagaa 60
 accttgaaa ctggatgaaa cagatagatt tctcatgact ttattttttg aaaacaataa 120
 aatgttgaaa aggctggctg aaaaccaga atatgaaat gaaaagctga ccaaattaag 180

```

aaataccata atggagcaat atactaggac tgaggaaatca gcacgaggaa taatcctttac 240
aaaaacacga cagagtgcac atgcgctttc ccagtggtt actgaaaaatg aaaaatttgc 300
tgaagtagga gtcaaagccc accatctgat tggagctgga cacagcagtg agttcaaac 360
catgacacag aatgaacaaa aagaagtcac tagtaaatct cgcactggaa aaataaatct 420
gcttatcgct accacagtg cagaagaagg tctggatatt aaagaatgta acattgttat 480
ccgttatggc ctogtcacca atgaaatagc catggtccag gcccggtgto gagccagagc 540
tgatgagagc acctacgtcc tggttgctca cagtggttca ggagttatcg aacgtgagac 600
agttaatgat ttccgagaga agatgatgta taaagctata cattgtgttc aaaatatgaa 660
accagaggag tatgctcata agattttggg attacagatg caaagtataa tggaaaagaa 720
aatgaaaacc aagagaaata ttgccaagca ttacaagaat aacctcac taataacttt 780
cctttgcaaa aactgcagtg tgctagcctg ttctgggaa gatatccatg taattgagaa 840
aatgcatcac gtcaatatga cccagaatt caaggaactt tacattgtaa gagaaaacaa 900
aacactgcaa aagaagtgtg ccgactatca aataaatggt gaaatcatct gcaaatgtgg 960
ccaggcttgg ggaacaatga tgggtcacia aggcttagat ttgccttgc tcaaaataag 1020
gaattttgta gtggttttca aaaataattc aacaaagaaa caatacaaaa agtgggtaga 1080
attacctatc acatttccca atcttgacta ttcagaatgc tgtttattta gtgatgagga 1140
ttagcacttg attgaagatt cttttaaact actatcagtt aaacatttaa tatgattatg 1200
attaatgtat tcattatgct acagaactga cataagaatc aataaatgta ttgttttacc 1260
ntcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1284

```

<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
cacaatactc atcatcacca cctcatca 29

<210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9
gtagggcctt attgtacttc ctcaaat 27

<210> 10
<211> 1443
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10
gaaagaaaac tggttctctg cttttctgaa tgttcttctg caaacaggaa acaatgaaact 60
tgtccaagag ttaacaggct ctgattgctc agaaagcaat gcagagattg agaatttato 120
acaagttgat ggctctcaag tggagaagca acttctttca accacagttc agccaaatct 180
ggagaaggag gtctggggca tggagaataa ctcatcagaa tcattctttg cagattcttc 240
tgtagtttca gaatcagaca caagtttggc agaaggaagt gtcagctgct tagatgaaag 300
tcttggacat aacagcaaca tgggcagtgat ttcaggcacc atgggaagtg attcagatga 360
agagaatgtg gcagcaagag catccccgga gccagaactc cagctcaggc cttaccaaat 420
ggaagttgcc cagccagcct tgggaaggaa gaatatcatc atctgcctcc ctacagggag 480
tggaaaacc agagtggctg tttacattgc caaggatcac ttagacaaga agaaaaagc 540
atctgagcct ggaaaagtta tagttcttgt caataagta ctgctagttg aacagctctt 600
ccgcaaggag ttccaacct ttttgaagaa atggtatcgt gttattggat taagtgggtga 660
tacccaactg aaaatatcat ttccagaagt tgtcaagtcc tgtgatatta ttatcagtac 720
agctcaaatc cttgaaaact cctctttaa cttggaaaat ggagaagatg ctggtgttca 780
attgtcagac ttttcttca ttatcattga tgaatgtcat cacaccaaca aagaagcagt 840
gtataataac atcatgagggc attatgtgat gcagaagtgt aaaaacaata gactcaagaa 900
agaaaacaaa ccagtgatcc ccttctntca gatctggga ctaacagctt cacctggtgt 960

```

tggaggggccc acgaagcaag ccaaagctga agaacacatt ttaaaactat gtgccaatct 1020
tgatgcattt actattaataa ctgttaaaga aaaccttgat cactgaaaa accaaataca 1080
ggagccatgc aagaagtttg ccattgcaga tgcaaccaga gaagatccat ttaaagagaa 1140
acttctagaa ataatgacaa ggattcaaac ttattgtcaa atgagtccaa tgtcagattt 1200
tggaaactcaa cctatgaac aatgggcat tcaaattgaa aaaaaagctg caaaagaagg 1260
aaatcgcaaa gaaagtgttt gtgcagaaca ttgagggaag tacaataagg cctacaaat 1320
taatgacaca attcgaatga tagatgcgta tactcatctt gaaactttct ataatgaaga 1380
gaaagataag aagtttgcag tcatagaaga tgatagtgat gaggggtgtg atgatgagta 1440
ttg                                     1443

```

```

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 11
ctccaacacc aggtgaagct g                                     21

```

```

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 12
cagatgaaga gaatgtggca g                                     21

```

```

<210> 13
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 13
ggaagtacaa tgagggccta caaa                                     24

```

```

<210> 14
<211> 23
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 14
tcctcagtcct agtatattgc tcc                                     23

```

```

<210> 15
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 15
ctaagcagct gacacttcct tctgccaac ttgtgtctg                 39

```

```

<210> 16
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

<400> 16
gggccctgtg gacaacctcg tcattgt 27

<210> 17
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17
ccagagtggc tgtttacatt gccaaaggatc act 33

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 18
gcatctgcaa tggcaaactt cttgcatggc 30

<210> 19
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 19
gccatcaatg accccttcat tgac 24

<210> 20
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 20
tgacgaacat gggggcatca gcag 24

<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21
tgagaggatc cgatgtcgaa tgggtattcc 30

<210> 22
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 22
aatgtcgacc taatcctcat cactaaataa 30

<210> 23
<211> 36
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23
tgagagctcg agatgtcgaa tgggtattcc acagac 36

<210> 24
<211> 36
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 24
tgtttattta gtgatgagga tcgggatccg attgaa 36

<210> 25
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 25
ttcaatctcg agatcctcat cactaaataa aga 33

<210> 26
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 26
cgtgctgatt cctcagtcct agtatattgc 30

<210> 27
<211> 13
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<400> 27
tatcgactcc aag 13

<210> 28
<211> 13
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<400> 28
ttagctagca tgg 13

<210> 29
<211> 13

<212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 29
 tgctaagact agc 13

<210> 30
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 30
 ttgcagtgtg tga 13

<210> 31
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 31
 tgtgaccatt gca 13

<210> 32
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 32
 tgtctgctag gta 13

<210> 33
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 33
 tgcattgtag tct 13

<210> 34
 <211> 13
 <212> ADN

<213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 34
 tgtgttgac cat 13

<210> 35
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 35
 tagacgctag tgt 13

<210> 36
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 36
 ttagctagca gac 13

<210> 37
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 37
 tcatgatgct acc 13

<210> 38
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 38
 tactccatga ctc 13

<210> 39
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<400> 39
tattacaacg agg 13

<210> 40
<211> 13
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<400> 40
tattggattg gtc 13

<210> 41
<211> 13
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<400> 41
tatctttcta ccc 13

<210> 42
<211> 13
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<400> 42
tatttttggc tcc 13

<210> 43
<211> 13
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<400> 43
ttatctatac agg 13

<210> 44
<211> 13
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<400> 16 gggccctgtg gacaacctcg tcattgt	27
<210> 17 <211> 33 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 17 ccagagtggc tgtttacatt gccaaaggatc act	33
<210> 18 <211> 30 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 18 gcatctgcaa tggcaaactt cttgcatggc	30
<210> 19 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 19 gccatcaatg accccttcat tgac	24
<210> 20 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 20 tgacgaacat gggggcatca gcag	24
<210> 21 <211> 30 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 21 tgagaggatc cgatgtcgaa tgggtattcc	30
<210> 22 <211> 30 <212> ADN <213> Homo sapiens	
<400> 22 aatgtcgacc taatcctcat cactaaataa	30
<210> 23 <211> 36 <212> ADN	

<213> Homo sapiens
 <400> 23
 tgagagctcg agatgtcgaa tgggtattcc acagac 36

 <210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 24
 tgtttattta gtgatgagga tcgggatccg attgaa 36

 <210> 25
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 25
 ttcaatctcg agatcctcat cactaaataa aga 33

 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 26
 cgtgctgatt cctcagtcct agtatattgc 30

 <210> 27
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 27
 tatcgactcc aag 13

 <210> 28
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 28
 ttagctagca tgg 13

 <210> 29
 <211> 13

<212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 29
 tgctaagact agc 13

<210> 30
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 30
 ttgcagtg tg tga 13

<210> 31
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 31
 tgtgaccatt gca 13

<210> 32
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 32
 tgtctgctag gta 13

<210> 33
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 33
 tgcattgtag tct 13

<210> 34
 <211> 13
 <212> ADN

<213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 34
 tgtgttgac cat 13

<210> 35
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 35
 tagacgctag tgt 13

<210> 36
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 36
 ttagctagca gac 13

<210> 37
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 37
 tcatgatgct acc 13

<210> 38
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce
 <400> 38
 tactccatga ctc 13

<210> 39
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 39
 tattacaacg agg 13

<210> 40
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 40
 tattggattg gtc 13

<210> 41
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 41
 tatctttcta ccc 13

<210> 42
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 42
 tatttttggc tcc 13

<210> 43
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 43
 ttatctatac agg 13

<210> 44
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 44
 ttatggtaaa ggg 13

 <210> 45
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 45
 ttatcggtag tag 13

 <210> 46
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce

 <400> 46
 ttaggtacta agg 13

 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 47
 gaaagagagg tgcgagaggc ctgt 24

 <210> 48
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 48
 tgataaggct gaggaaggga aatg 24

 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 49
 ctagaccctt ggaagcatcc a 21

 <210> 50
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Homo sapiens
 <400> 50
 tcgggcctgt cgggtcccct c 21

<210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 gggtcagaag gattcctatg 20

<210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 ggtctcaaac atgatctggg 20

<210> 53
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Virus immunodeficient humain type 1
 <220>
 <223> GAG06
 <220>
 <223> n en position 3, 6, 12 et 18 correspond à l'inosine
 <400> 53
 gcnttnagcc cngaagtnat acccatg 27

<210> 54
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Virus immunodeficient humain type 1
 <220>
 <223> GAG04
 <220>
 <223> n en position 4 et 15 correspond à l'inosine
 <400> 54
 catnctatatt gttcntgaag ggtactag 28

<210> 55
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Virus immunodeficient humain type 1
 <220>

<223> BSS

<220>

<223> n en position 11, 16 et 20 correspond à l'inosine

<220>

<223> n en position 13 correspond à a, g, c ou t/u

<400> 55

ggcttgctga ngngcncacn gcaagagg

28

<210> 56

<211> 28

<212> ADN

<213> Virus immunodeficient humain type 1

<220>

<223> KPNA

<220>

<223> n en position 6 correspond à l'inosine

<220>

<223> n en position 14 et 18 correspond à a, g, c ou t/u

<400> 56

agagtngtgg ttnttcntt ccacacag

28

【図 1】



FIGURE 1

【図 2 a】

FIGURE 2a



【図 2 b】

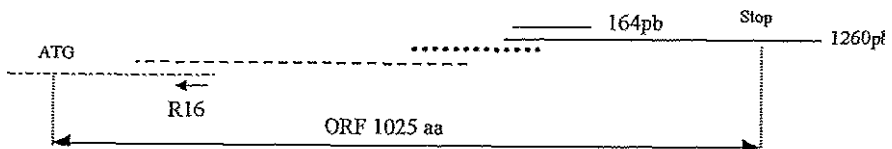


FIGURE 2b

【図 3 a】

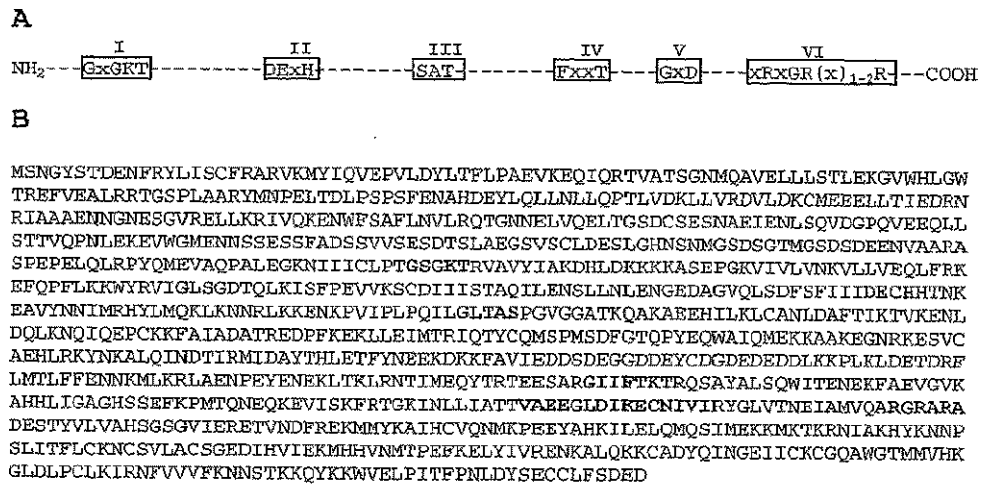


FIGURE 3a

【図 3 b】

C

```

MSNGYSTDENFRYLISCFRFRVIMYIQVEPVLDTLT-FLPAEVKEQIQRTVATSGNMQAVELLSTLEKG 69
M T E R + F+ ++ + +L Y+ + E + IQ G M+A L L L +
M-----TTEQ-RRSLQAFQDYIRKTLDPYIILSYMAPWFRREBEVQYIQAEKNNKCPMEATLFLKPLE- 63
VWHLGWTRFVFEALRRRTGSPILARYMNPETDLFSPSFENAHDEYLQLLNLLQPTLVDKLVRDV-LDKC 138
+ GW R F++AL G + Y E D +EY LL LQP +++ D+ D
LQEEGWFRGFLDALDHAG--YSGLYEAIBSWDFPKIE--KLEEYRLLKRLQPEFKTRIIPTDIISDLS 128
MEBELLTIEDRNRIAAEENN--GNESGVRELLKRIVQKENWFSAFINVLROTGNNELVQELTGSDCSES 206
E I + G E VE LL R. KENW L N EL
ECLINQECBEILQICSTKGMMAEAKLVECLL-RSD-KENWPKTLKLALEKERNKFS--ELWIVEKGIKD 194
AEIENLSQVDGPQVEEQLLSTTVQFNLEKEVWGMENSSSESSFADSSVSESDTSLAEGSVSCLDESIGH 276
E E L Q Q Q NL SE S S VS DT
VETEDLEDKMDIQIFYQEDPEC-Q-NL-----SENSCPP-SEVS---DTNLYSPFK----- 242
NSNMGSDSGTMSGSDSDEENVAARASPBPELQLRPYQMEVAQPALEGKNIICLPTGSGKTRVAVYIAKDH 346
R YQ+E+A PA++GKN IIC PTG GKT V++ I+ H
-----RNYQLELALPAMKGNITICAPTECGKTFVSLICEHH 281
LDKPKKASEPFGKIVLVNKKVLLVEQ---LFRKEFPFLKWKYRVIGLSGDTQLKISFPEVVKSCDIIISTA 414
L KK + GKV M EQ +F K F+ + YRV G+SG T + ++V++ DIII T
L-KKFPQOGKGVVFFANQIPVYEQQKSVFSKYFE---RHGYRVTGISGATAENVVPEQIVENNDIILTP 348
QILENSLLNLENGEDAGVQLSDFSFIIIDECHITNKEAVYNNIMRHYLMQKLNKNNRILKKNKPVIPLPQI 484
QIL N L LS F+ +I DECH+T+K+ YN IM +YL QKL PLPQ+
QILVNNLKKGTIPS-----LSIFTLMIIDECHNTSKQHPYNMIMFNLYDQKLGSSG-----PLPQV 405
LGI TAS PGVGGATKQAKABEHILKLCANLDAFTIKTVKENLDQLKNQIQEPCCKFAIADATREDFPEKELL 555
+GI TAS GVG A +A ++I KICA+LDA I TVK NL++L+ + +P K F ++ D FK +
IGI TAS /GVGDAKNTDEALDYICKLCASLDASVIATVKHNLEELEQVYKPKQKFFRKVESRISDKFKYIIA 475
EIMTRIQTQCQ-----MSFMS-----DFGTQPYEQWAIQMEKKA----AKEGNRKSVC-----AEHLRK 606
++M ++ + + +S +FGTQ YEQW + ++K + + + +C HLRK
QLMRDTESLAKRICKDLENLSQIQNREFGTQKYBQWIVIVQKACMVFQMPDKDEESRIKALFLYTSHLRK 547
YNKALQINDTIRMIDAYTHLETFFYNEEKDKKFAVIEDDSDEGGDDEYCDGDEDEDLKKPLKLBETDRFLM 677
YN AL I++ RM DA +L+ F++ + F IE D
YNDALTI SEHARMKDALDYLDKFFSNVRAAGFEEIEQDLTQ----- 588
TLFFENN-KMLKRLAENPEYENEKLTPLRNTIMEQYTRTESARGIIFTKTRQSAYALSQWITENEKFAEV 747
FE + L+ ++ +P EN KL L I E+Y E+ I+F KTR AL WI N K+
--RFEELQBELESVSRDPSNENKLEDLCFILQREYHLNPETITILFVKTRALVDALKNWIEGNPKLS--- 655
GVKAHHLIGAGHSSEFKPMTQNEQKEVISKFR-TGKINLLIATTVAEGLDIKECNIVIRYGLVTNEIAMV 817
+K L G G +++ MT QK ++ F+ +G N+LIAT+VA+EG+DI +CN+VI Y V N M+
FLKPGILTGRGKTNTGMLTFAQKCILDAFKASGDHNILIIATSVADEGIDIAQCNLVILYEYVGNVIKMI 725
QIRGRARADESTYVLVAHSGSGVIERETVNDFREKMMYKAIHCVQNMKPEBYAHKILBLQMSIMBKKMK 887
Q RGR RA S L+ S +GVIE+E +N ++EKMM +I +Q + KIL +Q + +
QIRGRGRARGSKCFLLT-SNAGVIEKEQINMYKEMMNSILRLQTWDEAVFREKILHIIQTHEKFIIRDSQ 794
TKRNIKHYKNPNSLITFLCKNCSVLACSGEDIHVIEKMHVNMTPPEFKELYIVRENKALQKKCADYQIN 957
K +N LC+ C LAC D+ VIE+ H+ + FKE ++ R K ++
EKPKVPDKENK----KLLCRCKALACYTADRVVIEECHYTVLGDFAKCECFVSR-PHPKPKQFSSFEKR 859
GBIIC---KCGQAWGTMMVHKGLDLPLCKIRNFVVVFRKNNSTKKQYKQWVLPITFFNLDYSECCLESDE 1024
+I C C WG + +K ++P +KI+ FVV + Y KW + D +E
AKIFCARQNC SHDWGIHVYKTFEIPVIKIESFVVEDIATGVQTLYSKWKDFHFEKIPFDPAEMSK---- 925
Dstop 1025
-Stop

```

FIGURE 3b

【図4】

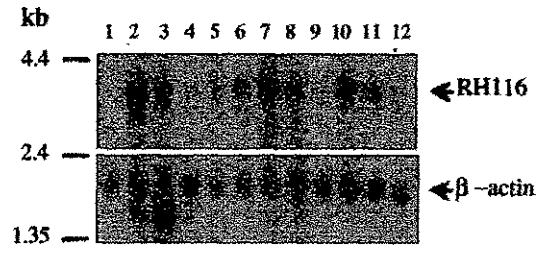


FIGURE 4

【図 5 a】

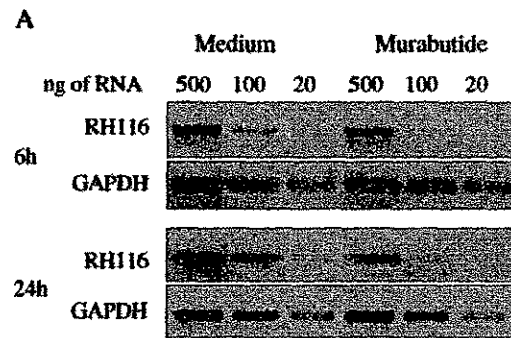
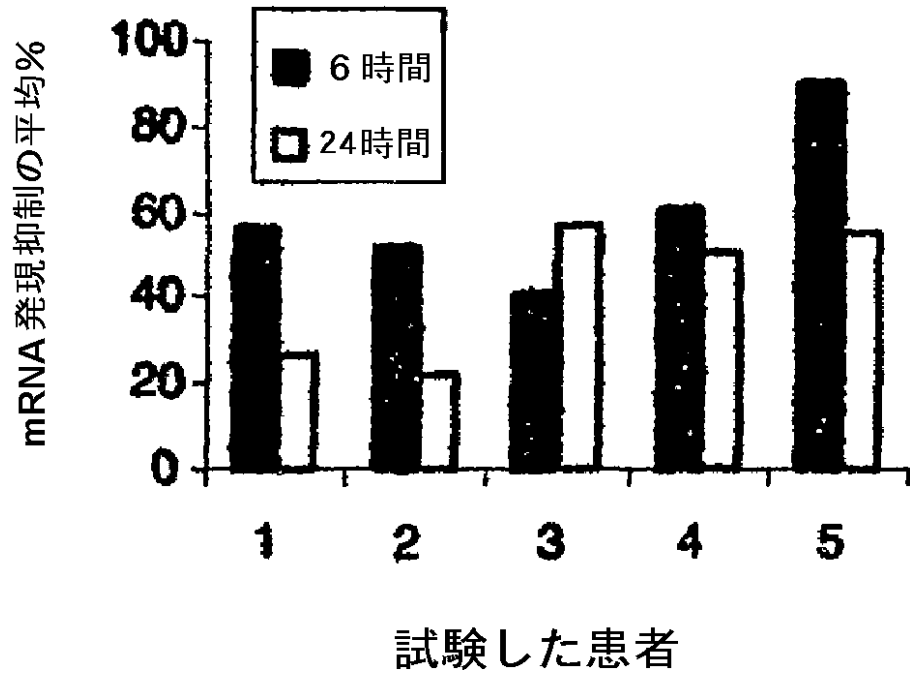


FIGURE 5

【図5b】

B



【图6】

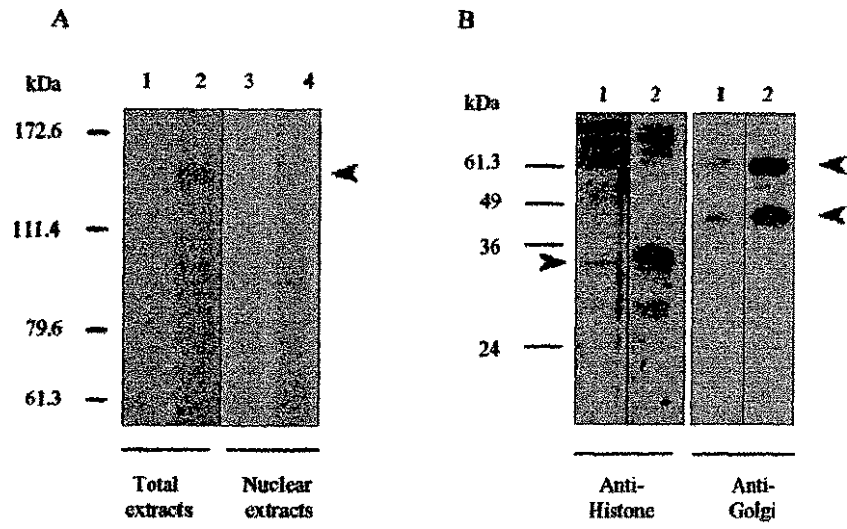


FIGURE 6

【図 7】

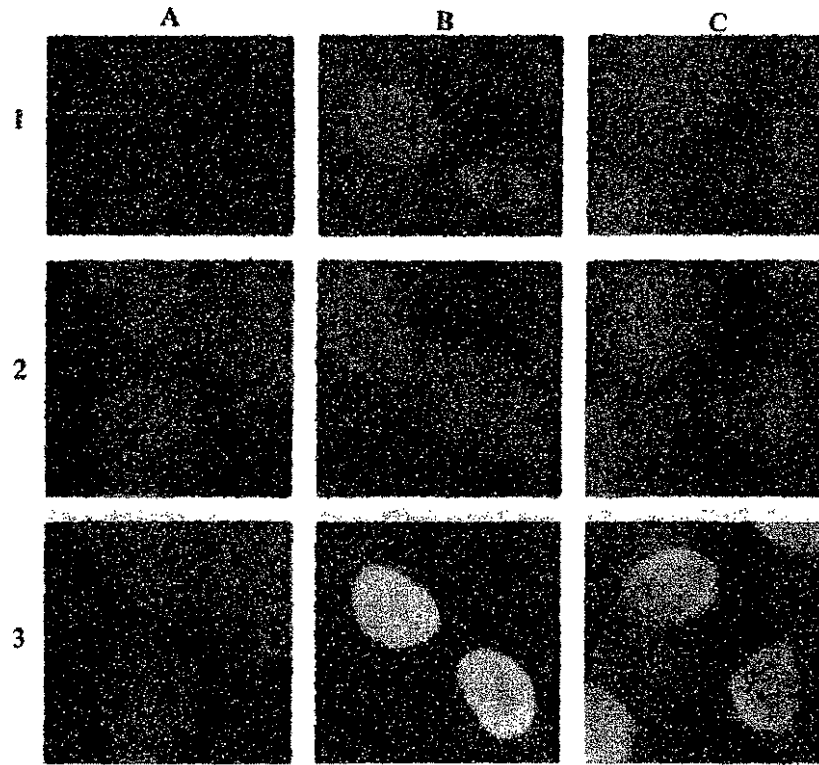
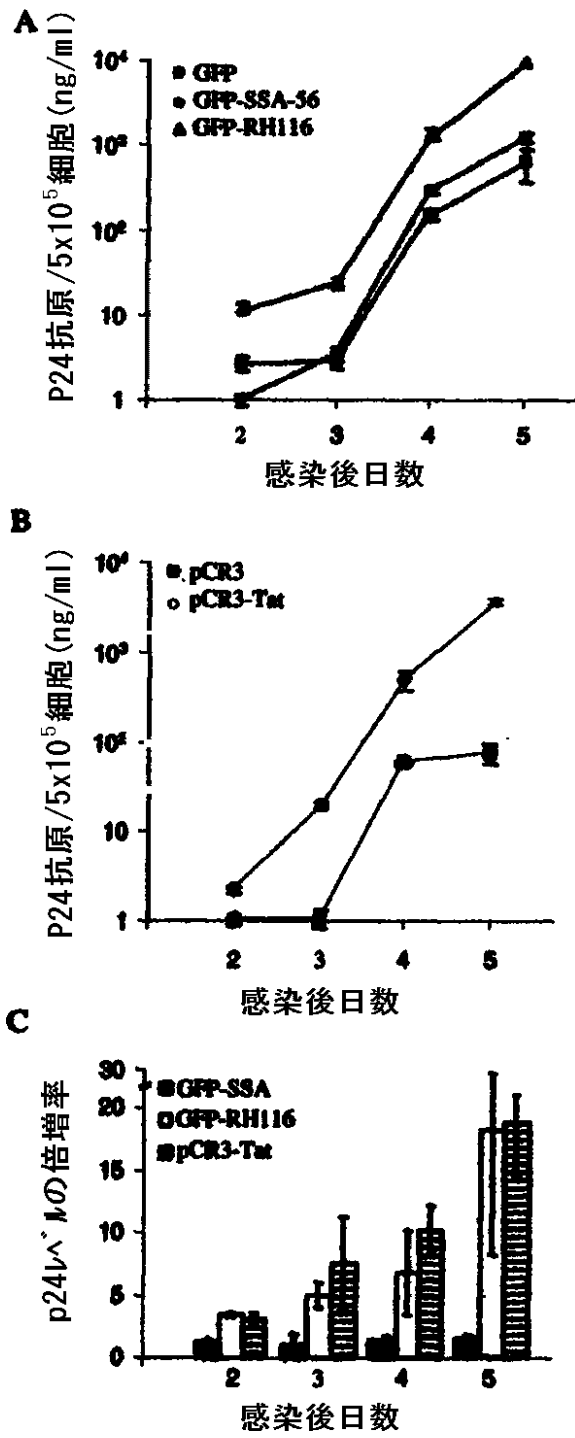


FIGURE 7.

【図8】



【図9】

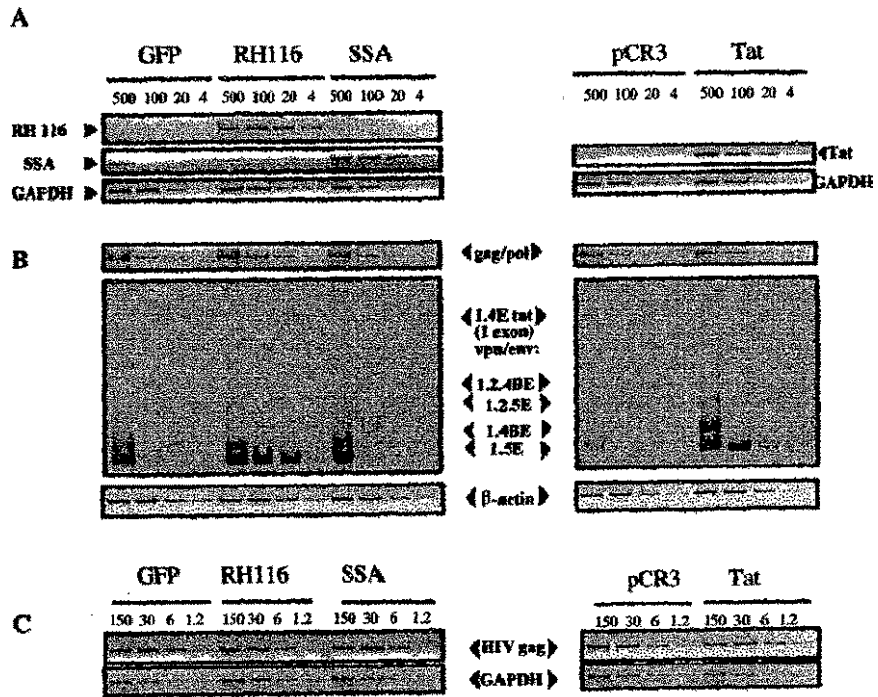
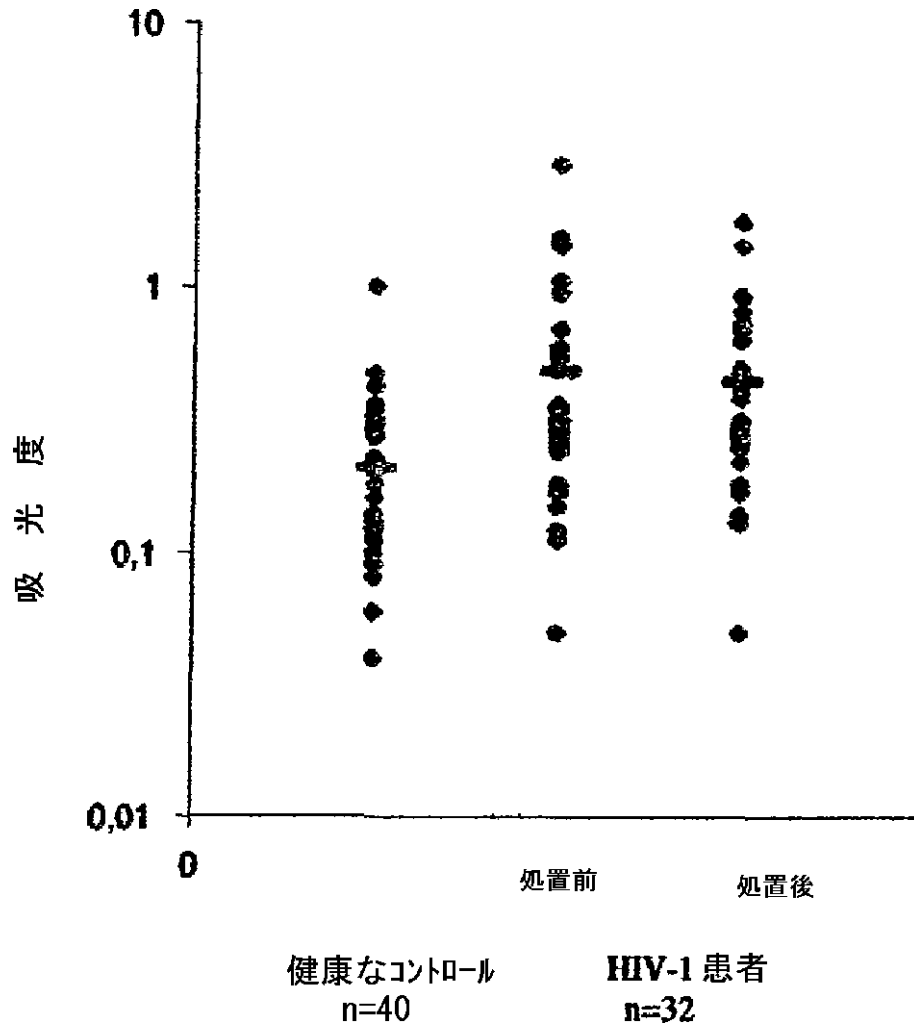


FIGURE 9.

【図10】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/55 C12N9/14 C12N15/63 C12N15/85 C07K16/40 C12Q1/68 C12Q1/34 G01N33/53 A61K48/00 A61K38/46 A61K38/14 C12N9/90	
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		
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, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUN, Y.W.: "RNA Helicase" EMBL SEQUENCE DATABASE, 1 May 1999 (1999-05-01), XP002158927 HEIDELBERG DE Ac 095786 the whole document	2-4
X	NCI-CGAP: "xo12b12.x1 NCI-CGAP-Ut3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2703743 3' similar to TR:095786 095786 RNA HELICASE" EMBL SEQUENCE DATABASE, 23 March 2000 (2000-03-23), XP002158928 HEIDELBERG DE Ac AW589567 the whole document	7
<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 3 September 2001		Date of mailing of the international search report 12/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5018 Patentlaer 2 NL - 2280 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ceder, O

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01441

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCI-CGAP: "xf76b02.x1 NCI_CGAP_gas4 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2623947 3' similar to TR:095786 095786 RNA HELICASE" EMBL SEQUENCE DATABASE, 4 November 1999 (1999-11-04), XP002158929 HEIDELBERG DE Ac AW152541 the whole document	7
X	NCI-CGAP: "x108h12.x1 NCI_CGAP_Ut4 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2675687 3' similar to TR:095786 095786 RNA HELICASE" EMBL SEQUENCE DATABASE, 23 November 1999 (1999-11-23), XP002158930 HEIDELBERG DE Ac AW189584 the whole document	7
A	US 5 888 792 A (CORLEY NEIL C ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) column 1, line 20 -column 2, line 59 column 8, line 60 -column 29, line 28	1-41
A	US 5 942 429 A (BARTLETT ROBERT ET AL) 24 August 1999 (1999-08-24) column 5, line 25 -column 7, line 34	1-41
A	LUEKING A ET AL: "THE PROTEIN FAMILY OF RNA HELICASES" CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, CRC PRESS, BOCA RATON, FL, US, vol. 33, no. 4, 1998, pages 259-296, XP000925222 ISSN: 1040-9238 cited in the application	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 01/01441

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5888792 A	30-03-1999	US 6139837 A	31-10-2000
US 5942429 A	24-08-1999	DE 19545126 A	05-06-1997
		AU 719576 B	11-05-2000
		AU 7407696 A	12-06-1997
		CA 2191827 A	05-06-1997
		EP 0778347 A	11-06-1997
		JP 9173087 A	08-07-1997
		US 6251645 B	26-06-2001

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 K 45/00		A 6 1 P 9/10	4 B 0 6 4
48/00		19/02	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/10		19/10	4 C 0 8 4
9/10		29/00	1 0 1 4 C 0 8 5
19/02		31/04	4 H 0 4 5
19/10		31/12	
29/00	1 0 1	31/18	
31/04		35/00	
31/12		37/00	
31/18		37/06	
35/00		C 0 7 K 16/40	
37/00		C 1 2 M 1/00	A
37/06		C 1 2 N 1/15	
C 0 7 K 16/40		1/19	
C 1 2 M 1/00		1/21	
C 1 2 N 1/15		9/00	
1/19		C 1 2 Q 1/25	
1/21		1/68	A
5/10		G 0 1 N 33/15	Z
9/00		33/50	Z
C 1 2 Q 1/25		33/53	D
1/68			M
G 0 1 N 33/15		33/577	B
33/50		37/00	1 0 2
33/53		C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/577		5/00	A
37/00	1 0 2	15/00	F
// C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 バール, ジョルジュ

フランス共和国, エフ - 59800 リール,
リュ ナショナル, 266

(72)発明者 コキユドゥ, セシル

フランス共和国, エフ - 59112 アヌラン,
リュ シャルル ギューノ, 2

(72)発明者 キャプロン, アンドレ

フランス共和国, エフ - 59133 ファラン
パン, リュ デュ キャピテン ジャスマ
ン, 8

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB14 BB20 BB24
BB41 BB51 CB01 DA13 DA36
FA20 FB02 FB03 FB05 FB08
GC10
4B024 AA12 AA13 AA14 BA07 CA04
CA09 DA02 EA04 GA11 HA12
4B029 AA21 AA23 BB20 CC03
4B050 CC03 DD11 LL03
4B063 QA18 QQ20 QQ44 QR01 QR48
QR55 QR59 QR62 QR77 QR80
QR82 QS24 QS25 QS28 QS34
QS36 QX04
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14
BA02 BB19 CA27 CA45 CA46
4C084 AA02 AA13 AA17 DC50 NA14
ZA451 ZA961 ZA971 ZB011
ZB081 ZB151 ZB261 ZB351
ZC351 ZC551
4C085 AA13 BB31 CC02 CC04 CC21
DD33 DD86
4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA76
DA89 EA22 EA28 EA50 EA51
EA52 FA72 FA74

专利名称(译)	RH116多肽及其片段，和编码所述多肽和治疗用途的多核苷酸		
公开(公告)号	JP2003532424A	公开(公告)日	2003-11-05
申请号	JP2001582544	申请日	2001-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	ISTAC 安妮研究所巴斯德菊法国里尔 裏爾巴斯德研究所		
申请(专利权)人(译)	Isutakku Ansutichu巴斯德里尔		
[标]发明人	パールジョルジュ コキユドウセシル キャプロンアンドレ		
发明人	パール,ジョルジュ コキユドウ,セシル キャプロン,アンドレ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P19/02 A61P19/10 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 C07K16/40 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N9/90 C12N15/09 C12N15/55 C12P21/08 C12Q1/25 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/577 G01N37/00		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P19/02 A61P19/10 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 C12N9/90		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P19/02 A61P19/10 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 C07K16/40 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12Q1/25 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/577.B G01N37/00.102 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.F A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB41 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA20 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/GC10 4B024/AA12 4B024/AA13 4B024/AA14 4B024/BA07 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ44 4B063/QR01 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX04 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB19 4B065/CA27 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA451 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB011 4C084/ZB081 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C084/ZB351 4C084/ZC351 4C084/ZC551 4C085/AA13 4C085/BB31 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/CC21 4C085/DD33 4C085/DD86 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	太田圭一		
优先权	2000006030 2000-05-11 FR		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明命名为RH116，一种新颖的116 kDa多肽，显示与RNA解旋酶 (DEXH box) 及其片段的序列同源性，cDNA的克隆，以及编码该多肽的多核苷酸，本发明涉及含有核苷酸的克隆载体和/或表达载体，用该载体转化的细胞和对该多肽特异的抗体。本发明还涉及检测和/或分析上述多肽和多核苷酸的方法，相应的诊断试剂盒以及筛选可用作预防和/或治疗药物的配体或化合物的方法。这也与之有关。

FIGURE 2a

