(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 24 409 T2** 2006.07.27

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 151 108 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 24 409.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB00/00159**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 902 825.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/047745**
(86) PCT-Anmeldetag: **15.02.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **17.08.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.11.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **30.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.07.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/48*** (2006.01)
C07K 14/15 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
99420041 **15.02.1999** **EP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Bio Merieux, Marcy l'Etoile, FR

(74) Vertreter:
BEETZ & PARTNER Patentanwälte, 80538 München

(72) Erfinder:
PARANHOS-BACCALA, Glaucia, F-69003 Lyon, FR; PERRON, Herve, F-69005 Lyon, FR; KOMURIAN-PRADEL, Florence, F-69250 Poleymieux au Mont d'Or, FR

(54) Bezeichnung: **Die LTR-Region von MSRV-1 und die durch sie kodierten Proteine, und Sonden und Methoden für die Detektion des MSRV-1-Retrovirus**

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

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

Beschreibung

[0001] Bei der multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine demyelinisierende Krankheit des Zentralnervensystems (ZNS), deren vollständige Ursache noch immer unbekannt ist.

[0002] In zahlreichen Arbeiten wurde die Hypothese einer viralen Ätiologie der Krankheit vorgebracht, es hat sich aber keines der bekannten Viren, die geprüft wurden, als das gesuchte verursachende Agens erwiesen: eine Übersicht über die Viren, die im Lauf der Jahre bei MS untersucht wurden, wurde von E. Norrby und R. T. Johnson erstellt.

[0003] In jüngster Zeit wurde bei MS-Patienten ein Retrovirus, das sich von den bekannten menschlichen Retroviren unterscheidet, isoliert. Die Autoren konnten auch zeigen, daß dieses Retrovirus in vitro übertragen werden konnte, daß MS-Patienten Antikörper produzierten, die Proteine, die mit der Infektion von leptomeningealen Zellen mit diesem Retrovirus assoziiert sind, erkennen können, und daß die Expression dieses Retrovirus massiv durch die unmittelbar-frühen Gene von gewissen Herpesviren stimuliert werden kann.

[0004] Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, daß mindestens ein unbekanntes Retrovirus oder ein Virus mit einer nach dem von H. Perron publizierten Verfahren nachweisbaren reverse Transkriptase (RT)-Aktivität, die mit der Bezeichnung "LM7-Typ-RT-Aktivität" bezeichnet wird, bei MS ein Rolle spielen.

[0005] Die Arbeiten der Anmelderin haben es ermöglicht, mit einem Kulturverfahren wie in dem Dokument WO-A-93/20188 beschrieben, auf das hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, zwei kontinuierliche Zellinien, die mit natürlichen Isolaten von zwei verschiedenen MS-Patienten infiziert waren, zu erhalten. Diese zwei Linien, die von menschlichen Plexus-choroideus-Zellen stammten und LM7PC und PLI-2 genannt wurden, wurden am 22. Juli 1992 bzw. am 8. Januar 1993 unter den Nummern 92072201 und 93010817 in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapester Vertrags bei ECACC hinterlegt. Weiterhin wurden auch die Virusisolate mit LM7-Typ-RT-Aktivität bei ECACC unter der allgemeinen Bezeichnung "Stämme" hinterlegt. Der "Stamm" bzw. das Isolat, das von der Linie PLI-2 geborgen wird und die Bezeichnung POL-2 trägt, wurde bei ECACC am 22. Juli 1992 unter der Nr. V92072202 hinterlegt. Der "Stamm" bzw. das Isolat, das von der Linie LM7PC geborgen wird und die Bezeichnung MS7PG trägt, wurde bei ECACC am 8. Januar 1993 unter der Nr. V93010816 hinterlegt.

[0006] Ausgehend von den oben genannten Kulturen und Isolaten, die aufgrund von biologischen und morphologischen Kriterien charakterisiert wurden, hat man sich anschließend bemüht, das mit den in diesen Kulturen produzierten Viruspartikeln assoziierte Nukleinsäurematerial zu charakterisieren.

[0007] Die bereits charakterisierten Teile des Genoms wurden für die Durchführung von molekularen Nachweistests des Virusgenoms und von immunserologischen Tests verwendet, wobei die von den Nukleotidsequenzen des Virusgenoms kodierten Aminosäuresequenzen dazu verwendet wurden, um die gegen die mit der Infektion eingehenden Epitope und/oder die Virusexpression gerichtete Immunreaktion nachzuweisen.

[0008] Das von der Anmelderin entdeckte Virussystem weist jedoch Ähnlichkeit mit einem komplexen Retrovirussystem auf. Die gefundenen Sequenzen, die in den von den verschiedenen Zellkulturen von MS-Patienten produzierten extrazellulären Viruspartikeln verkapselt sind, zeigen deutlich, daß eine gemeinsame Verkapselung von Retrovirusgenomen, die verwandt sind, sich jedoch von dem "wilden" Retrovirusgenom, das die infizierenden Viruspartikel produziert, unterscheiden, stattfindet.

[0009] Dieses Phänomen wurde bei replizierenden Retroviren und bei endogenen Retroviren, die zu der gleichen Familie gehören, ja so sogar heterolog sind, beobachtet. Der Begriff des endogenen Retrovirus ist sehr wichtig. Bei MSRV-1 wurde beobachtet, daß endogene Retrovirussequenzen, die Sequenzen umfassen, welche zu dem MSRV-1-Genom homolog sind, in normaler menschlicher DNA existieren. Die Existenz von endogenen Retroviruselementen (ERV), die in bezug auf die Gesamtheit oder einen Teil ihres Genoms eine Ähnlichkeit mit MSRV-1 aufweisen, erklärt die Tatsache, daß die Expression des Retrovirus MSRV-1 in den menschlichen Zellen mit nahe verwandten endogenen Sequenzen wechselwirken kann.

[0010] An der Pathologie könnten defektive Klone, die lediglich Proteine exprimieren, beteiligt sein.

[0011] Die Anmelderin hat eine unerwartete Entdeckung gemacht, nach der die RU5-Region einer retroviraleb LTR, die in der vorliegenden Erfindung definiert ist, für die Expression wenigstens eines Proteins kodiert. Dies ist ungewöhnlich für LTRs, insbesondere in der RU5-Region.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft zunächst ein Nukleotidfragment einer LTR-RU5-Region, das eine Nukleotidsequenz enthält, die für die Expression eines Proteins kodiert, wobei das Protein wenigstens sechs, vorzugsweise wenigstens acht und besonders bevorzugt wenigstens zwölf Aminosäuren einer Peptidsequenz ausgewählt aus der aus SEQ ID NR: 2, SEQ ID NR: 3 und SEQ ID NR: 4 bestehenden Gruppe, und ein komplementäres Nukleotidfragment enthält.

[0013] Vorzugsweise enthält ein erfindungsgemäßes Nukleotid- bzw. das dazu komplementäre Nukleotidfragment eine Nukleotidsequenz, die für die Expression eines Proteins kodiert, wobei das Protein eine Peptidsequenz ausgewählt aus SEQ ID NR: 2, SEQ ID NR: 3 und SEQ ID NR: 4, und ein komplementäres Nukleotidfragment enthält.

[0014] Vorzugsweise besteht das Protein aus SEQ ID NR: 3 oder enthält oder besteht aus SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 4.

[0015] Die Erfindung betrifft weiterhin die folgenden Gegenstände:

– eine Nukleinsäuresonde zum Nachweis des MSRV-1-Retrovirus, wobei die Sonde 10 bis 1000 Monomere enthält und unter hochstringenten Bedingungen spezifisch mit dem erfindungsgemäßen Nukleotidfragment hybridisiert;

– einen Primer für die Amplifikation einer retroviralen Nukleinsäuresequenz des MSRV-1-Virus durch Polymerisation, wobei der Primer 10 bis 30 Monomere umfaßt und unter hochstringenten Bedingungen mit dem erfindungsgemäßen Nukleotidfragment hybridisiert;

– ein Protein, kodiert durch ein erfindungsgemäßes Nukleotidfragment; vorzugsweise enthält das Protein eine Peptidsequenz ausgewählt aus der aus SEQ ID NR: 2, SEQ ID NR: 3 und SEQ ID NR: 4 bestehenden Gruppe oder besteht aus einer Peptidsequenz ausgewählt aus der aus SEQ ID NR: 2, SEQ ID NR: 3 und SEQ ID NR: 4 bestehenden Gruppe;

– ein gegen ein erfindungsgemäßes Protein oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid gerichteter polyklonaler oder monoklonaler Antikörper;

– ein Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins des MSRV-1-Retrovirus in einer biologischen Probe, bei dem man:
eine erfindungsgemäße Sonde mit der biologischen Probe in Kontakt bringt,
bestimmt, ob die Sonde sich an eine Nukleinsäure in der biologischen Probe bindet, wobei eine Bindung das Vorhandensein des MSRV-1-Virus anzeigt; dieses Verfahren kann einen Amplifikationsschritt umfassen, bei dem die Nukleinsäure mit einem erfindungsgemäßen Primer amplifiziert wird;

– ein Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins des MSRV-1-Retrovirus in einer biologischen Probe, bei dem man:
einen erfindungsgemäßen Antikörper mit der biologischen Probe in Kontakt bringt,
bestimmt, ob der Antikörper sich an ein Protein in der biologischen Probe bindet, wobei eine Bindung das Vorhandensein des MSRV-1-Virus anzeigt;

– ein Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins des MSRV-1-Retrovirus in einer biologischen Probe, bei dem man die antigenen oder biologischen Eigenschaften eines erfindungsgemäßen Proteins oder eines Fragments davon nachweist; vorteilhafterweise handelt es sich bei dem Proteinfragment um ein erfindungsgemäßes Polypeptid.

[0016] Bevor die Erfindung genauer dargelegt wird, werden nun verschiedene Begriffe, die in der Beschreibung und in den Ansprüchen verwendet werden, definiert:

– der in der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff "MSRV" bezeichnet jegliches pathogene und/oder infizierende Agens, das mit MS assoziiert ist, insbesondere eine Virusart, die attenuierten Stämme dieser Virusart, oder die defizienten, interferierenden Partikel, die miteingekapselte Genome oder auch Genome, die mit einem Teil des MSRV-1-Genoms rekombiniert haben, die sich von dieser Art ableiten, umfassen. Es ist bekannt, daß Viren, vor allem Viren, die RNA enthalten, insbesondere infolge relativ hoher spontaner Mutationsraten eine Variabilität aufweisen;

– unter menschlichem Virus versteht man ein Virus, das den Menschen infizieren bzw. vom Menschen geborgen werden kann;

– erfindungsgemäß ist ein Nukleotidfragment oder ein Oligonukleotid oder ein Polynukleotid eine Aneinanderreihung von Monomeren, oder ein Biopolymer, die bzw. das durch die informationstragende Sequenz der natürlichen Nukleinsäuren charakterisiert sind bzw. ist und fähig sind bzw. ist, mit einem beliebigen anderen Nukleotidfragment unter vorbestimmten Bedingungen zu hybridisieren, wobei die Aneinanderreihung Monomere mit unterschiedlichen chemischen Strukturen enthalten kann und ausgehend von einem natürlichen Nukleinsäuremolekül und/oder durch genetische Rekombination und/oder durch chemische Synthese erhalten werden kann; ein Nukleotidfragment kann mit einem Genomfragment des MSRV-1-Virus, mit

dem sich die vorliegende Erfindung befaßt, identisch sein;
– somit kann ein Monomer ein natürliches Nukleinsäurenukleotid sein, dessen Bausteine ein Zucker, eine Phosphatgruppe und eine Stickstoffbase sind; bei der RNA handelt es sich bei dem Zucker um Ribose, bei der DNA handelt es sich bei dem Zucker um Desoxy-2-ribose; je nachdem, ob es sich um DNA oder RNA handelt, stammt die Stickstoffbase aus der Gruppe Adenin, Guanin, Uracil, Cytosin, Thymin; das Nukleotid kann jedoch auch in mindestens einem der drei Bausteine modifiziert sein; so kann die Modifikation zum Beispiel bei den Basenansätzen auftreten, wodurch modifizierte Basen wie Inosin, Methyl-5-desoxycytidin, Desoxyuridin, Dimethylamino-5-desoxyuridin, Diamino-2,6-purin, Brom-5-desoxyuridin und jegliche sonstige modifizierte Basen, die die Hybridisierung begünstigen, geschaffen werden; beim Zucker kann die Modifikation darin bestehen, daß man mindestens eine Desoxyribose durch ein Polyamid ersetzt, und bei der Phosphatgruppe kann die Modifikation darin bestehen, daß man sie durch Ester, insbesondere Ester aus der Gruppe Diphosphatester, Alkyl- und Arylphosphonat sowie Phosphorthioat, ersetzt;
– unter "informationstragende Sequenz" versteht man jegliche geordnete Anreihung von Monomeren, deren chemische Natur und Ordnung in einer Bezugsrichtung gegebenenfalls eine funktionsfähige Information von der gleichen Qualität wie der der natürlichen Nukleinsäuren darstellt;
– unter Hybridisierung versteht man den Vorgang, bei dem unter entsprechenden Arbeitsbedingungen zwei Nukleotidfragmente mit ausreichend komplementären Sequenzen zu einer komplexen Struktur, insbesondere einer Doppel- oder Dreifachstruktur, vorzugsweise in Form einer Helix, unter hochstringenten Bedingungen paaren (siehe Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982); im allgemeinen sind diese Bedingungen je nach Länge der verwendeten Sonden die folgenden: die Temperatur für die Hybridisierungsreaktion liegt zwischen ungefähr 20°C und 65°C und insbesondere zwischen 35°C und 65°C, in einer Kochsalzlösung bei einer Konzentration von ungefähr 0,8 bis 1 M;
– eine Sonde umfaßt ein chemisch synthetisiertes oder mittels Verdauung oder enzymatischer Restriktion eines längeren Nukleotidfragments erhaltenes Nukleotidfragment, das mindestens sechs Monomere, vorteilhafterweise 10 bis 100 Monomere, vorzugsweise 10 bis 30 Monomere umfaßt und eine Hybridisierungsspezifität unter hochstringenten Bedingungen aufweist; vorzugsweise wird eine Sonde, die weniger als 10 Monomere besitzt, nicht allein verwendet, sondern in Gegenwart von anderen Sonden, die genauso kurz sind oder nicht; unter gewissen spezifischen Bedingungen kann es nützlich sein, Sonden mit einer Größe von über 100 Monomeren zu verwenden; eine Sonde kann insbesondere für diagnostische Zwecke verwendet werden, wobei es sich zum Beispiel um Fang- und/oder Nachweissonden handeln wird;
– die Fangsonde kann auf jede beliebige Art und Weise, also direkt oder indirekt, zum Beispiel kovalent oder durch passive Adsorption, auf einem festen Träger immobilisiert sein;
– die Nachweissonde kann mit einem Marker, insbesondere aus der Gruppe der radioaktiven Isotope, mit Enzymen, insbesondere aus der Gruppe Peroxidase und alkalische Phosphatase und denjenigen, die ein chromogenes, fluorogenes oder lumineszierendes Substrat zu hydrolysieren vermögen, mit chemischen chromophoren Verbindungen, mit chromogenen, fluorigenen oder lumieszierenden Verbindungen, mit Nukleotidbasenanalogen und mit Biotin markiert sein;
– die Sonden, die erfindungsgemäß für diagnostische Zwecke verwendet werden können, können bei allen bekannten Hybridisierungstechniken verwendet werden, insbesondere bei den Techniken, die unter den Bezeichnungen "DOT-BLOT", "SOUTHERN-BLOT", "NORTHERN-BLOT", wobei es sich um eine Technik handelt, die mit der "SOUTHERN-BLOT"-Technik identisch ist, bei der jedoch RNA als Angriffspunkt verwendet wird, und SANDWICH-Technik bekannt sind; vorteilhafterweise verwendet man bei der vorliegenden Erfindung die SANDWICH-Technik, die eine spezifische Fangsonde und/oder spezifische Nachweissonde umfaßt, wobei gilt, daß die Fangsonde und die Nachweissonde eine zumindest teilweise unterschiedliche Nukleotidsequenz aufweisen müssen;
– ein Primer ist eine Sonde, die mindestens sechs Monomere, vorteilhafterweise 10 bis 30 Monomere, umfaßt, die eine Hybridisierungsspezifität unter hochstringenten Bedingungen aufweisen, mit dem Zweck, eine enzymatische Polymerisation zu initiieren, zum Beispiel bei einer Amplifikationstechnik wie der PCR (Polymerase Chain Reaction), bei einem Elongationsvorgang wie der Sequenzierung, bei einer reversen Transkriptionsmethode oder ähnlichem.

[0017] In Anbetracht der Tatsache, daß ein Virus mit der enzymatischen Aktivität einer reversen Transkriptase genetisch sowohl in RNA-Form als auch in DNA-Form charakterisiert werden kann, wird sowohl auf virale DNA als auch auf virale RNA für die Charakterisierung der Sequenzen, die sich auf ein Virus beziehen, das eine solche reverse Transkriptase-Aktivität aufweist, erfindungsgemäß MSRV-1 genannt, Bezug genommen werden.

[0018] Unter Nachweis einer Substanz oder eines Agens versteht man im folgenden Text nicht nur eine Identifikation, sondern auch eine quantitative Bestimmung oder eine Abtrennung oder Isolation von dieser Substanz oder diesem Agens.

[0019] Die Erfindung wird beim Durchlesen der folgenden detaillierten Beschreibung, die auf die beigelegten Abbildungen Bezug nimmt, besser verstanden werden, wobei die Abbildungen folgendes darstellen:

[0020] Abb. 1 zeigt eine 5'-Nukleotidsequenz, die Regionen entspricht, die von den Klonen LB15 (wiedergegeben in nt 1 bis 623) in der RU5-Region und den Klonen CL2 (wiedergegeben in nt 624 bis 1680) und CL17 (wiedergegeben in nt 1681 bis 2052) in gag umfaßt werden. Die Aminosäure-(AA-)Translation ist bei den gag-Nukleotidsequenzen gezeigt. Die Polyadenylierungsstelle in R ist von einem Kästchen umrahmt und das Polyadenylierungssignal stromabwärts in U5 ist unterstrichen. (//) bedeutet eine Leserasterverschiebung und (.) ein Stop-Codon. AA in Fettdruck entspricht einer Major Homology Region (MHR) im Kapsid. Unterstrichene AA entsprechen den konservierten Positionen im Nukleocapsid.

[0021] Abb. 2 zeigt die 5'-env-Region von Klon C15 (nt 1 bis 1479) und die 3'-env- und LTR-Sequenzen von Klon CL6 (nt 1480 bis 2030). Die env-Region und die U3R-Substrukturen sind durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet. In der env-Region sind das Peptidsignal und das putative immunosuppressive Peptid unterstrichen, die N-gebundenen Glycosylierungsstellen sind mit einem Kästchen eingerahmt und die beiden putativen Schnittstellen sind durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet. Bei der U3R-Region sind auch das CAAT-regulatorische Element und die TATA-Box unterstrichen; die Cap-Stelle und das PolyA-Signal sind ebenfalls gekennzeichnet.

[0022] Abb. 3 zeigt die Promotoraktivität von aus MS-Plasma-RNA (CL6), normaler Plazenta-RNA (PH74, Zugangsnummer AF072506) und der DNA humaner Zellen (5M6) erhaltenen U3R-Klone. Die U3R-Sequenzen wurden in einen pCAT3-Enhancer-Reportervektor kloniert. Nach einer 48stündigen Inkubation wurde die CAT-Aktivität, die die Promotoreffizienz der entsprechenden Sequenzen wiedergibt, bewertet. Der Wert entspricht dem Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten.

Beispiel 1: Bestimmung von MSRV-LTR-Regionen

[0023] Mit in der gag-Region befindlichen antisense-3'-Primern und mit einem 5'-sense-Primer definiert aus der im 3'-Terminus erhaltenen R-Sequenz (Klon 6, unten beschrieben) wurde eine RT-PCR-Amplifikation durchgeführt. Der R- (87 bp), U5- (456 bp), PBS- und 5'-gag-Regionen umfassende Klon LB15 (SEQ ID NR: 1) wurde so aus konzentrierten Kulturpartikeln erhalten. Eine Polyadenylierungsstelle ist kompatibel mit dem an der Verbindung der R- und U5-Regionen befindlichen "CA"-Dinukleotidmotiv, und ein putatives Poly(A)-Signal befindet sich stromabwärts in einer Entfernung von 24 Nukleotiden vom Poly(A)-Signal, mit der Konsenssussequenz "YGTGTTYY". Die putative Primer-Bindungsstelle (PBS), die stromabwärts von der U5-Region identifiziert wurde, hat sich als verwandt mit dem 3'-Terminus der $tRNA^{TrP}$-komplementären Sequenz von Vögeln erwiesen.

[0024] Anmerkenswert ist weiterhin, daß in der RU5-Region 2 relativ kurze in-frame orfs (SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 3) gefunden wurden.

[0025] Die 3'-LTR-U3R-Region wurde im durch Amplifikation von aus MS-Plasma extrahierter RNA, die mit DNAse behandelt worden war, erhaltenen CL6-Klon (Abb. 2) identifiziert. Durch Vergleich mit den durch 5'-Verlängerung an MSRV-RNA erhaltenen 5'-LTR-Sequenzen wurde eine 299 bp-lange U3-Region und eine 84 bp-lange R-Region in der CL6-LTR-Region, die sich stromabwärts vom env orf befindet und mit dem PolyA-Schwanz endet, identifiziert. Das typische regulatorische Element CAAT-Box wurde an zwei Stellen in der putativen U3-Region gefunden, mit der Transcription-Factor-Datei (Heinemeyer, T, Wingender, E, Reuter, I, Hermjakob, H, Kel, AE, Kel, OV, Ignatieva, EV, Ananko, EA, Podkolodnaya, OA, Kolpakov, FA, Podkolodny, NL und Kolchanov, NA (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. Nucleic Acids Res. 26, 364–370) wurden jedoch auch andere putative Bindungsstellen für mehrere Transkriptionsfaktoren entdeckt.

[0026] In der U3-Region wurde eine TATA-Box (TATAAA) gefunden, wie dies für zahlreiche Retroviren beschrieben ist. Schließlich wurde 83 bp stromabwärts von der TATA-Box ein Poly(A)-Signal (AATAAA) gefunden.

[0027] Zur Bewertung der Promotoraktivität von LTR-Klonen verschiedenen Ursprungs wurden CAT-Assays mit subklonierten U3R-Regionen von aus MS-Plasma-RNA (CL6) und aus verwandten HERV-W-Kopien in Nicht-MS-DNA (5M6) und in Nicht-MS-Plazenta-RNA (PH74) erhaltenen LTR-Klonen durchgeführt. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, war mit der LTR-Sequenz im CL6-Klon aus MS-Plasma eine starke Aktivität assoziiert, während bei den 5M6- und PH74-Klonen eine schwache bzw. mäßige Promotoraktivität festgestellt wurde. Mit anderen Zelltypen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

Beispiel 2: In Beispiel 1 eingesetzte Materialien und Methoden

[0028] Gesamt-RNA wurde aus MS-Plasma oder aufgereinigten Partikeln durch die Standard-Vorschrift mit angesäuertem Guanidiumthiocyanat oder mit dem "viral RNA extraction kit" (Boehringer Mannheim) extrahiert. Nach einer Behandlung mit DNase I wurde die RNA einer reversen Transkription (Expand™ RT, Boehringer Mannheim) entweder mit zufällig ausgewählten Hexanukleotid-Primern, mit einem spezifischen MSRV-Primer oder mit einem verankerten Oligo-dT-Primer unterzogen und durch nested oder semi-nested PCR (Long Expand PCR kit – Boehringer Mannheim) amplifiziert. Bei jedem Assay wurde eine no-RT-Kontrolle durchgeführt. 5'- und 3'-Verlängerungen aus der MSRV-pol-Region wurden durchgeführt, so daß man Klone mit den unten angegebenen Primern erhielt.

LB15:

Sense-Primer

5' GCAACAGCAACCCCCTTTGGGT 3'

Antisense-Primer

5' CTTGGAGGGTGCATAACCAGGGAAT 3'

5'CTATGTCCTTTTGGACTGCTGTTTGGGT 3'

CL6:

Sense-Primer

5' GCCATCAAGCCACCCAAGAACTCTTAACTT 3'

5' CCAATAGCCAGACCATTATATACACTAATT 3'

Antisense-Primer

5' GACTCGCTGCAGATCGATTTTTTTTTTTTTTTTT 3'

[0029] PCR-Fragmente wurden in ein pCR2.1 des TA cloning™-Kit (Invitrogen) kloniert und mit dem 'Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit' (Applied Biosystems) mit den automatischen DNA-Sequenziergeräten Applied Biosystem 377 und 373A in beide Richtungen sequenziert.

[0030] U3R-Regionen aus CL6- (wie in WO-99/02666 im Namen der Anmelderin gezeigt), PH74- (wie in WO-99/02696 im Namen der Anmelderin gezeigt) und 5M6- (wie in WO-99/02666 im Namen der Anmelderin gezeigt) Klonen (die aus MS-Plasma-RNA, Plazenta-RNA beziehungsweise humaner DNA erhalten worden waren) wurden für CAT-Assays in pCAT3 (Promega-Biotech, Madison, WI, USA) geklont. An Hela-, PG4-, Be-Wo- oder Jurkat-Zellen wurden unter Verwendung des Superfect-Transfektionskits (Qiagen GmbH, Deutschland) mit 2 µg aufgereinigtem rekombinantem Plasmid Transfektionsexperimente durchgeführt. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet, um die CAT-Aktivität unter Anwendung des CAT Enzyme Assay Systems (Promega-Biotech) zu bewerten. Hierfür wurde das Liquid Scintillation Counting (LSC)-Protokoll nach den Empfehlungen des Herstellers befolgt. Die positive Kontrolle bestand aus mit 2 µg pCAT3 Contol' (Promega-Biotech) transfizierten Zellen.

SEQUENZLISTE

<110> BIO MERIEUX

<120> Nukleotidfragment, Protein, Sonde, Primer und Verfahren zum Nachweis des MSRV-1-Retrovirus

<130> b05b3320-SEP20-MSRV1-LTR

<140>
<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1003
<212> DNA
<213> MSRV-1 retrovirus

<400> 1
cagcaacccc ctttgggtcc cctcccattg tatgggagct ctgttttcac tctatttcac 60
tctattaaat catgcaactg cactcttctg gtccgtgttt tttatggctc aagctgagct 120
tttgttcgcc atccaccact gctgtttgcc accgtcacag acccgctgct gacttccatc 180
cctttggatc cagcagagtg tccgctgtgc tcctgatcca gcacaggcgc ccattgcctc 240
tcccaattgg gctaaaggct tgccattgtt cctgcacagc taagtgcctg ggttcatcct 300
aatcgagctg aacactagtc actgggttcc acggttctct tccatgaccc atggcttcta 360
atagagctat aacactcact gcatggtcca agattccatt ccttggaatc cgtgagacca 420
agaacccccag gtcagagaac acaaggcttg ccaccatgtt ggaagcagcc caccaccatt 480
ttggaagcag cccgccacta tcttgggagc tctgggagca aggaccccag gtaacaattt 540
ggtgaccacg aagggacctg aatccgcaac catgaaggga tctccaaagc aatgggaaac 600
gttcccccccg aggcaaaaat gcccctagaa cgtattctgg agaattggga ccaatgtgac 660
actcagacgc taagaaagaa acgatttata ttctttctgca gtaccgcctg gccacaatat 720
cctcttcaag ggagagaaac ctggcttcct gagggaagta taaattataa catcatctta 780
cagctagacc tcttctgtag aaaggagggc aaatggagtg aagtgccata tgtgcaaact 840
ttctttttcat taagagacaa ctcacaatta tgtaaaaagt gtggtttatg ccctacagga 900
agccctcaga gtccacctcc ctaccccagc gtcccctccc cgactccttc ctcaactaat 960
aaggaccccc ctttaaccca aacaccagtc caaaaggaca tag 1003

<210> 2
<211> 76
<212> PRT
<213> MSRV-1 retrovirus

<400> 2
Met Gln Leu His Ser Ser Gly Pro Cys Phe Leu Trp Leu Lys Leu Ser
1 5 10 15

Phe Cys Ser Pro Ser Thr Thr Ala Val Cys His Arg His Arg Pro Ala
20 25 30

Ala Asp Phe His Pro Phe Gly Ser Ser Arg Val Ser Ala Val Leu Leu
35 40 45

Ile Gln His Arg Arg Pro Leu Pro Leu Pro Ile Gly Leu Lys Ala Cys
50 55 60

```
His Cys Ser Cys Thr Ala Lys Cys Leu Gly Ser Ser
 65                  70                  75


<210> 3
<211> 64
<212> PRT
<213> MSRV-1 retrovirus

<400> 3
Met Ala Ser Asn Arg Ala Ile Thr Leu Thr Ala Trp Ser Lys Ile Pro
  1               5                  10                  15

Phe Leu Gly Ile Arg Glu Thr Lys Asn Pro Arg Ser Glu Asn Thr Arg
            20                  25                  30

Leu Ala Thr Met Leu Glu Ala Ala His His His Phe Gly Ser Ser Pro
         35                  40                  45

Pro Leu Ser Trp Glu Leu Trp Glu Gln Gly Pro Gln Val Thr Ile Trp
     50                  55                  60


<210> 4
<211> 140
<212> PRT
<213> MSRV-1 retrovirus

<400> 4
Met Gln Leu His Ser Ser Gly Pro Cys Phe Leu Trp Leu Lys Leu Ser
  1               5                  10                  15

Phe Cys Ser Pro Ser Thr Thr Ala Val Cys His Arg His Arg Pro Ala
            20                  25                  30

Ala Asp Phe His Pro Phe Gly Ser Ser Arg Val Ser Ala Val Leu Leu
         35                  40                  45

Ile Gln His Arg Arg Pro Leu Pro Leu Pro Ile Gly Leu Lys Ala Cys
     50                  55                  60

His Cys Ser Cys Thr Ala Lys Cys Leu Gly Ser Ser Met Ala Ser Asn
 65                  70                  75                  80

Arg Ala Ile Thr Leu Thr Ala Trp Ser Lys Ile Pro Phe Leu Gly Ile
                85                  90                  95

Arg Glu Thr Lys Asn Pro Arg Ser Glu Asn Thr Arg Leu Ala Thr Met
            100                 105                 110

Leu Glu Ala Ala His His His Phe Gly Ser Ser Pro Pro Leu Ser Trp
        115                 120                 125

Glu Leu Trp Glu Gln Gly Pro Gln Val Thr Ile Trp
    130                 135                 140
```

Patentansprüche

1. Nukleotidfragment einer LTR-RUS-Region ausgewählt aus:
Fragmenten, die eine Nukleotidsequenz enthalten, die für die Expression eines Proteins kodiert, wobei das Protein eine Peptidsequenz ausgewählt aus SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 4 und dazu komplementären Fragmenten enthält und
einer Nukleotidsequenz, die für die Expression eines Proteins kodiert, das aus SEQ ID NR: 3 und dazu komplementären Nukleotidsequenzen besteht.

2. Nukleotidfragment nach Anspruch 1, wobei das Protein SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 4 enthält.

3. Nukleotidfragment nach Anspruch 1, wobei das Protein aus SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 4 besteht.

4. Nukleinsäuresonde zum Nachweis einer LTR-RU5-Region des MSRV-1-Retrovirus, wobei die Sonde 10 bis 1000 Monomere enthält und unter hochstringenten Bedingungen spezifisch mit einer Nukleotidsequenz hybridisiert, die für die Expression eines Proteins kodiert, wobei das Protein aus SEQ ID NR: 2 besteht.

5. Primer für die Amplifikation einer retroviralen Nukleinsäuresequenz einer LTR-RU5-Region des MSRV-1-Virus durch Polymerisation, wobei der Primer 10 bis 30 Monomere umfaßt und unter hochstringenten Bedingungen mit einer Nukleotidsequenz hybridisiert, die für die Expression eines Proteins kodiert, wobei das Protein aus SEQ ID NR: 2 besteht.

6. Protein, kodiert durch ein Nukleotidfragment nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

7. Protein nach Anspruch 6, enthaltend eine aus der aus SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 4 bestehenden Gruppe ausgewählte Peptidsequenz.

8. Protein nach Anspruch 6, bestehend aus der Peptidsequenz SEQ ID NR: 3.

9. Protein nach Anspruch 6, enthaltend eine aus der aus SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 4 bestehenden Gruppe ausgewählte Peptidsequenz.

10. Protein nach Anspruch 6, bestehend aus einer Peptidsequenz ausgewählt aus SEQ ID NR: 2 und SEQ ID NR: 4.

11. Polyklonaler oder monoklonaler Antikörper, der gegen ein Protein nach einem der Ansprüche 6 bis 10 gerichtet ist.

12. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins des MSRV-1-Retrovirus in einer biologischen Probe, bei dem man:
eine Sonde nach Anspruch 4 mit der biologischen Probe in Kontakt bringt,
bestimmt, ob die Sonde sich an eine Nukleinsäure in der biologischen Probe bindet, wobei eine Bindung das Vorhandensein des MSRV-1-Virus anzeigt.

13. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins des MSRV-1-Retrovirus in einer biologischen Probe, bei dem man:
Antikörper nach Anspruch 11 mit der biologischen Probe in Kontakt bringt,
bestimmt, ob der Antikörper sich an eine Nukleinsäure in der biologischen Probe bindet, wobei eine Bindung das Vorhandensein des MSRV-1-Virus anzeigt.

14. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins des MSRV-1-Retrovirus in einer biologischen Probe, bei dem man die antigenen bzw. biologischen Eigenschaften eines Proteins nach einem der Ansprüche 6 bis 10 nachweist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

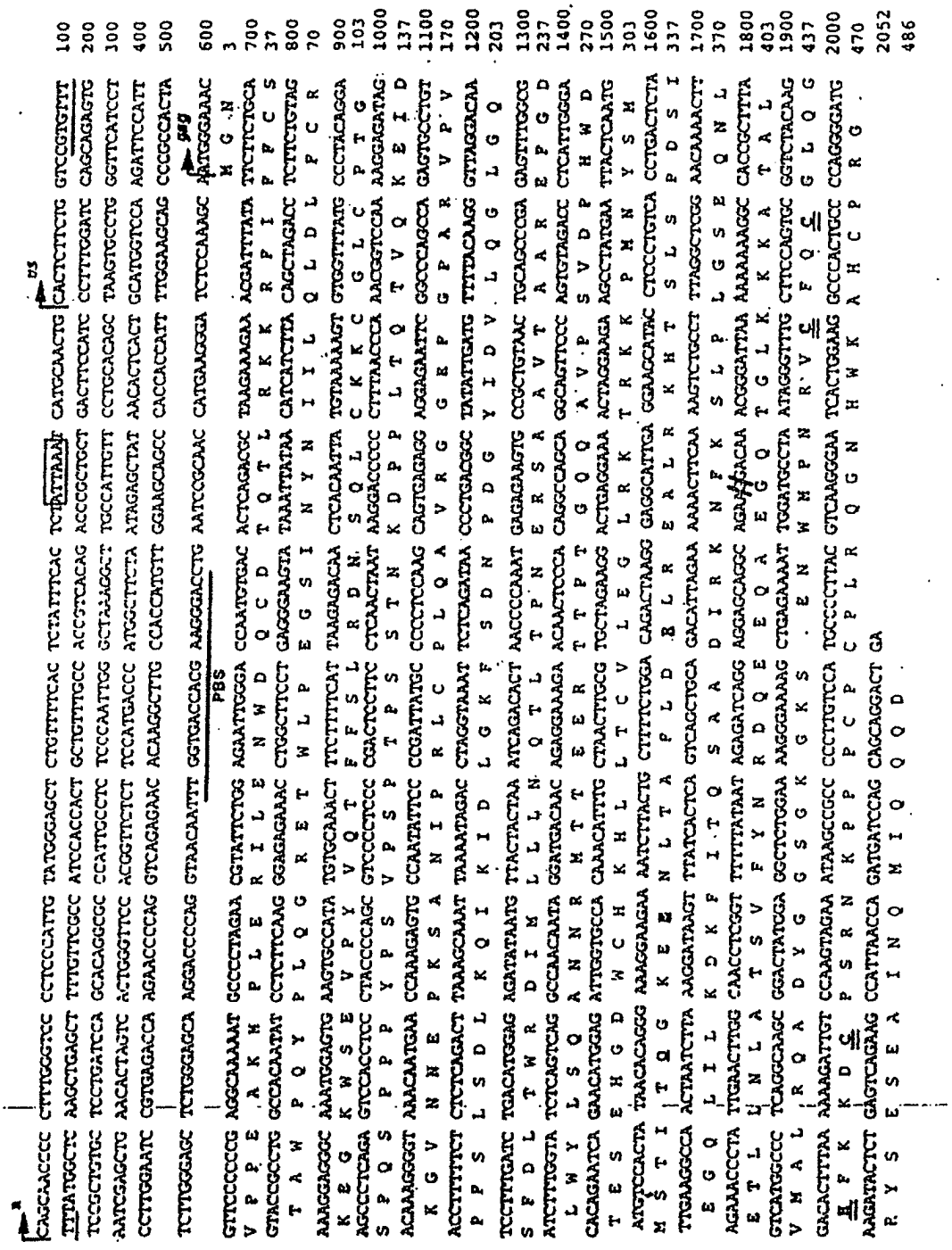


FIG. 2

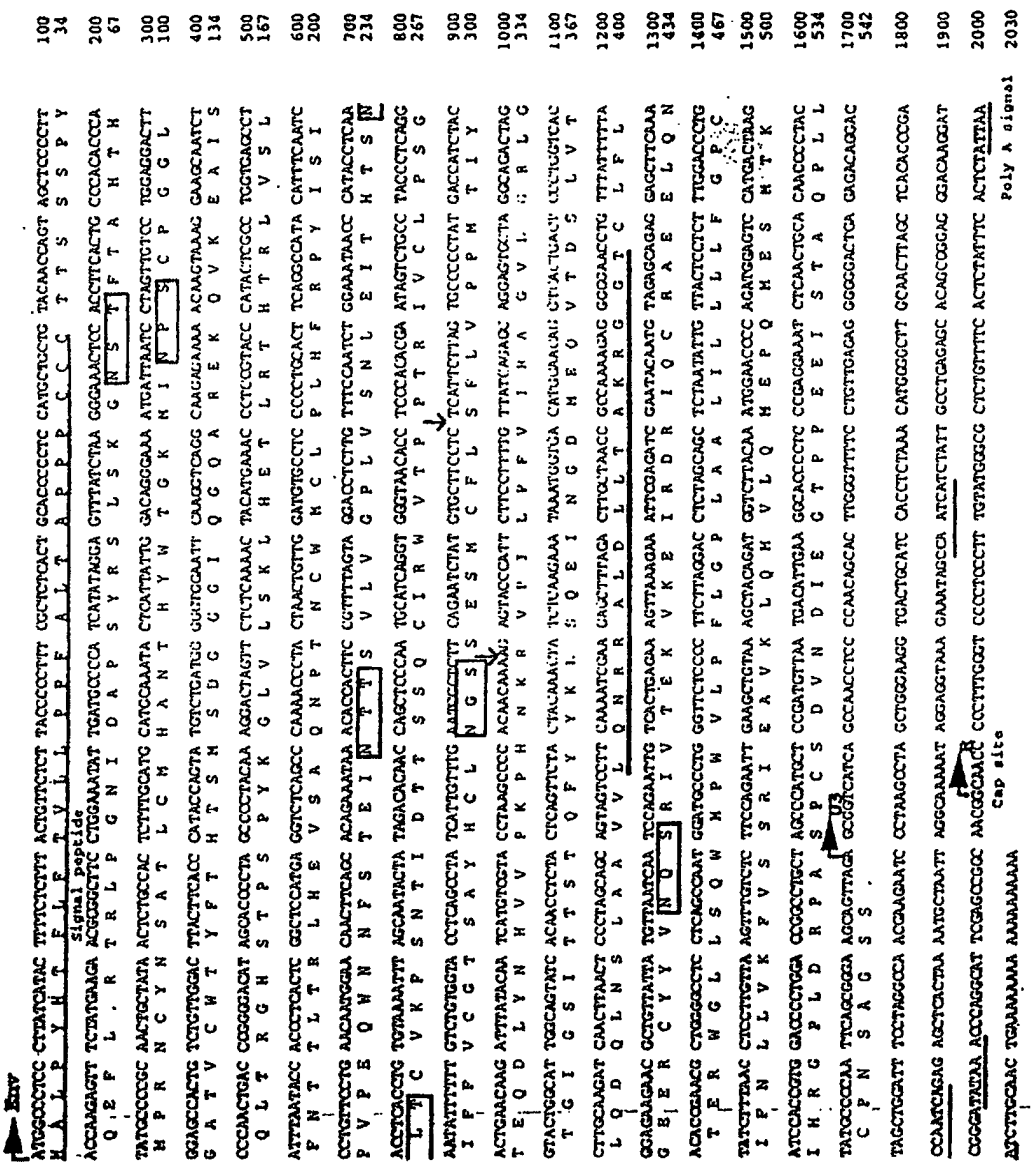
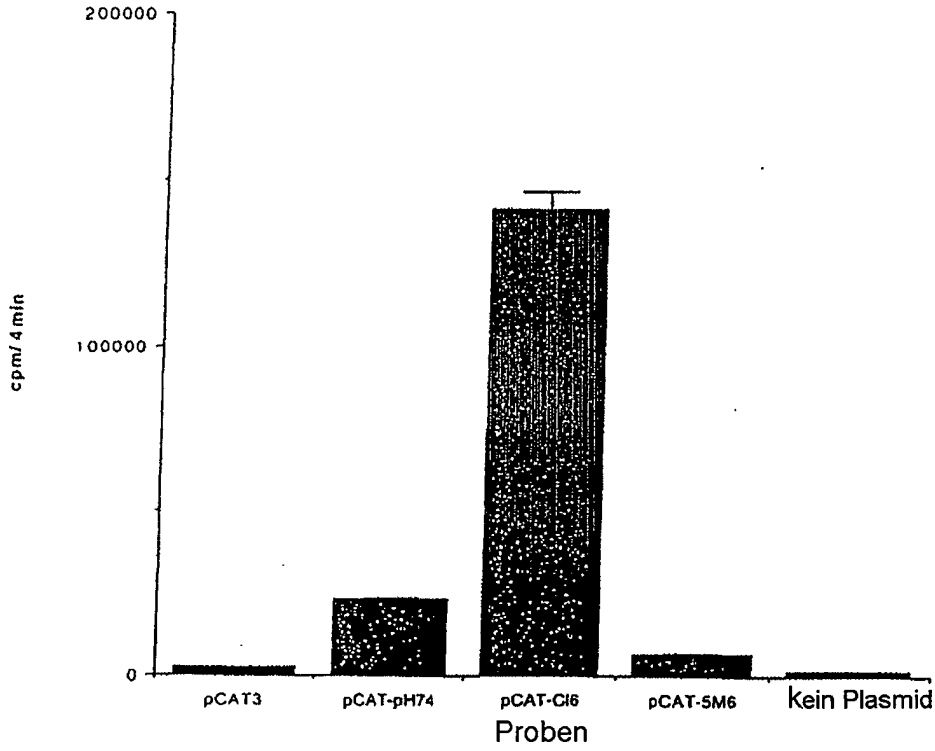


FIG. 3


200000
100000
0
cpm/ 4 min
pCAT3
pCAT-pH74
pCAT-Cl6
pCAT-5M6
Kein Plasmid
Proben