

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] （参考）
C 0 7 K 16/28		C 0 7 K 16/28	4 B 0 2 4
14/705		14/705	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求（全 27数）

(21)出願番号	特願2001－538520(P2001－538520)	(71)出願人	カイロン コーポレイション アメリカ合衆国,カリフォルニア 94608,エ ミリービル,ホートン ストリート 4560
(86)(22)出願日	平成12年11月1日(2000.11.1)	(72)発明者	マッキチャン, メアリー リー アメリカ合衆国 カリフォルニア 94110, サン フランシスコ, 21エスティー ス トリート 3361
(85)翻訳文提出日	平成14年5月2日(2002.5.2)	(74)代理人	弁理士 山本 秀策 （外2名）
(86)国際出願番号	PCT/US00/41726		
(87)国際公開番号	W001/036641		
(87)国際公開日	平成13年5月25日(2001.5.25)		
(31)優先権主張番号	60/163,157		
(32)優先日	平成11年11月2日(1999.11.2)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	60/167,389		
(32)優先日	平成11年11月24日(1999.11.24)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 二本鎖RNAレセプター（dsRNA-R）およびそれに関連する方法

(57)【要約】

本発明は、dsRNAレセプター（dsRNA-R）をコードする核酸分子およびdsRNAレセプター（dsRNA-R）ポリペプチドに関する。dsRNA-Rは、Toll相同性ドメイン（THD）を含み、MyD88アダプタータンパク質と相互作用し、そしてdsRNAに結合し得る。本発明はまた、dsRNA-Rに対する抗体、および免疫応答を調節する方法、ならびにdsRNA-Rに結合する化合物および／またはdsRNA-Rを調節する化合物を同定する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 dsRNAレセプターとしてのポリペプチドの使用であって、該ポリペプチドは、Toll相同性ドメインを含みかつdsRNAに結合する、使用。

【請求項2】 前記ポリペプチドが、MyD88タンパク質と相互作用し得る、請求項1に記載の使用。

【請求項3】 前記ポリペプチドが、Toll様レセプター（TLR）である、請求項1または請求項2に記載の使用。

【請求項4】 Toll相同性ドメインを含みかつdsRNAに結合するポリペプチド上のエピトープに結合する、医薬としての使用のための、抗体。

【請求項5】 前記ポリペプチドが、MyD88タンパク質と相互作用し得る、請求項4に記載の抗体。

【請求項6】 前記ポリペプチドが、Toll様レセプター（TLR）である、請求項4または請求項5に記載の抗体。

【請求項7】 Toll相同性ドメインを含みかつdsRNAに結合するポリペプチド上のエピトープに結合する抗体の使用であって、該抗体は、dsRNAの該ポリペプチドへの結合をブロックする、使用。

【請求項8】 前記ポリペプチドが、MyD88タンパク質と相互作用し得る、請求項7に記載の使用。

【請求項9】 前記ポリペプチドが、Toll様レセプター（TLR）である、請求項7または請求項8に記載の使用。

【請求項10】 Toll相同性ドメインを含みかつdsRNAに結合するdsRNAレセプターに結合するかまたは該レセプターの活性を調節する化合物を同定する方法であって、該方法は、以下の工程：該レセプター、または該レセプターを発現する細胞を化合物と接触させる工程；および、該化合物は、dsRNAに結合する該レセプターに結合するか否か、または該レセプター的能力を調節するか否かを決定する工程、を包含する、方法。

【請求項11】 前記ポリペプチドが、MyD88タンパク質と相互作用し得る、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記ポリペプチドが、Toll様レセプター（TLR）である、請求項10または請求項11に記載の方法。

【請求項13】 レセプター／リガンド複合体であって、該レセプターがToll相同性ドメインを含むポリペプチドであり、そして該リガンドがdsRNAに結合する、複合体。

【請求項14】 前記ポリペプチドが、MyD88タンパク質と相互作用し得る、請求項13に記載の複合体。

【請求項15】 前記ポリペプチドが、Toll様レセプター（TLR）である、請求項13または請求項14に記載の複合体。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願への相互参照)

本出願は、1999年11月2日に出願された出願番号第60/163,157号に対し、および1999年11月24日に出願された出願番号第60/167,389号に対し（その各々はその全体が参考として本明細書に援用される）、米国特許法第119条（e）による優先権の利益を主張している。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、一般に、免疫応答、およびタンパク質の同定ならびに免疫応答をシグナル伝達する経路に関し、そして詳細には二本鎖RNAレセプター（dsRNA-R）に関する。

【0003】

(発明の背景)

哺乳動物の本質的な免疫系は、病原性生物に特徴的な分子特徴を認識かつそれに応答する。表面タンパク質、特定の細胞壁成分および特定のヌクレオチド配列のような病原体の種々の部分が認識され、そして種々の免疫応答の引き金となり得る。細胞は、これらの外来エレメントを認識し、そして免疫応答として知られるカスケードの引き金となる、種々のレセプターおよび膜結合タンパク質を保持していることは永年知られている。応答の2つの広い分類またはタイプが周知である：体液性、または抗体媒介免疫；および細胞媒介免疫である。主に抗体媒介反応により効率的に制御され得る病原体または症状もあれば、宿主防御を媒介する活発な細胞応答を必要とする症状または病原体もある。

【0004】

アジュバントは、上記の本質的な応答を増強し得る化合物である。アジュバントは、体液性免疫および細胞性免疫の両方を増強し得る。例えば、ヒト免疫不全ウイルスまたはC型肝炎ウイルスにより引き起こされる症状または疾患のようないくつかの症状または疾患は、アジュバントの投与によりこの本質的な免疫応答を増大するために特に所望され得る。

【0005】

dsRNA-Rを特徴付け、かつ同定し、それを、類似の免疫応答に至り得るその他のタンパク質またはレセプターから鑑別し、dsRNA-Rを含むアジュバントを開発し、そしてより多くの所望の薬理学的性質を有しながら、dsRNAの免疫刺激性質を保持し得る新規dsRNA-Rリガンドの設計を可能にする有用な方法を開発することが本発明の狙いである。

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、一部において、dsRNAをコードする単離された核酸分子、またはそのフラグメント、dsRNA-Rをコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部分に相補的なヌクレオチド配列、およびdsRNA-Rをコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、またはそのフラグメントに関する。

【0007】

本発明はまた、上記の任意の核酸分子を含む組換え発現ベクター、およびそれで形質転換された宿主細胞に関する。

【0008】

本発明はまた、1つのポリペプチド、または複数のポリペプチド、またはdsRNA-Rをコードするポリペプチドの複合体、またはその相同体またはフラグメントに関する。このようなポリペプチドは、上記の核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターを適合する宿主細胞中に導入すること、この宿主細胞を上記ポリペプチドの発現を可能にする条件下で増殖させること、およびこの宿主細胞から上記ポリペプチドを単離することにより調製され得る。

【0009】

本発明はまた、上記の任意の核酸分子またはポリペプチドおよび受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む組成物に関する。

【0010】

本発明はまた、上記の任意の核酸分子によりコードされるポリペプチド上のエピトープに結合する単離された抗体に関する。

【0011】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかによりコードされるポリペプチドに結合する抗体、およびコントロール抗体を含むキットに関する。

【0012】

本発明はまた、哺乳動物において、この哺乳動物にdsRNA-Rに結合し、そしてこのdsRNA-RのdsRNA活性化を活性化または阻害する所定量の化合物を投与することにより免疫応答を調整する方法に関する。

【0013】

本発明はまた、dsRNA-Rに結合するか、またはその活性を調節する化合物を同定する方法に関し、この方法は、dsRNA-RまたはdsRNA-Rを発現する細胞を化合物と接触させること、およびこの化合物がdsRNA-Rに結合するか、またはその活性を調節するか否かを決定することによる。

【0014】

(好適な実施形態の記載)

本発明は、特有のdsRNA-レセプター(dsRNA-R)の同定のおどろくべき発見に基づく。それは、dsRNA-R、またはそれを含む複合体がToll相同性ドメイン(THD)を含むという発見にさらに基づく。レセプター内のTHDの存在の発見は、このdsRNA応答に対する既知のTollレセプターの必要性についての試験、およびこのdsRNA-Rのさらなる特徴付けを可能にした。本発明は、特に、単一のポリペプチド、または複数のポリペプチドの複合体であり得るdsRNA-Rに関し、そして必要に応じて、例えば、多糖、脂質などのようなさらなる成分を含み得る。このdsRNA-R、またはこれを含む複合体は、好ましくはTHDを含み、そしてMyD88アダプタータンパク質と相互作用する。さらにこのdsRNA-Rは、dsRNAに結合し得る。

【0015】

本発明の実施は、その他であることが示されなければ、当該分野の技術内のウイルス学、免疫学、分子生物学および組換えDNA技法の従来法を採用する。このような技法は、文献に詳細に説明されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、1989); DNA Cloning: A Practical

Approach、I&II巻(D. Glover編) ; Methods in Enzymology (S. ColowickおよびN. Kaplan編、Academic Press, Inc.) ; Fundamental Virology、第2版、I&II巻(B. N. FieldsおよびD. M. Knipe、編)、Remington's Pharmaceutical Science、第18版(Easton, Pennsylvania:Mack Publishing Company、1990) ; Handbook of Experimental Immunology、I~IV巻(D. M. WeirおよびC. C. Blackwell、編、1986、Blackwell Scientific Publications) ; Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi、K. S.、編、CRC Press、1997) およびSeymour/Carrahers Polymer Chemistry (第4版、Maecel Dekker Inc.、1996) を参照のこと。

【0016】

本明細書で用いられる用語「dsRNA-R」は、単一のポリペプチド、または複数のポリペプチドの複合体であり得、そして必要に応じて、例えば、多糖、脂質などのようなさらなる成分を含み得る、二本鎖RNAレセプターをいう。このdsRNA-Rは、dsRNAシグナル伝達カスケード中に含まれるタンパク質であり得るか、またはdsRNAを結合するためのレセプターであり得る。

【0017】

本明細書で用いられる用語「活性」は、dsRNA結合またはシグナル伝達にともなう任意の活性、または活性のカスケードをいう。

【0018】

本明細書で用いられる用語「約」は、それが修飾する値の±10%を意味する。

【0019】

本明細書で用いられる用語「抗体」は、限定されずに、完全なインタクトな抗体、そのFabフラグメントおよびF(ab)₂フラグメント、ならびにキメラ

抗体をいう。

【0020】

本明細書で用いられる用語「相同」は、dsRNA-Rをコードする完全長ヌクレオチドまたはアミノ酸配列と、少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%の配列同一性により特徴付けられるヌクレオチドまたはアミノ酸配列、または少なくともdsRNA-Rの一部をいう。相同アミノ酸配列は、保存的アミノ酸置換をコードするようなアミノ酸配列を含む。配列同一性は、例えば、SmithおよびWaterman (Adv. Appl. Math.、1981、2、482-489、これはその全体が参考として本明細書に援用される)を用いる、デフォルトのセッティングを用いて、Gapプログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package、Unix (登録商標)用バージョン8、Genetics Computer Group、University Research Park、Madison WI)により決定され得る。

【0021】

本明細書で用いられる用語「調整する」は、特定の活性またはタンパク質の量、または効果における増加または減少を意味する。

【0022】

本発明の1つの局面は、dsRNA-Rをコードする新規なヌクレオチド配列を含む核酸分子に関する。好ましくは、この核酸分子は、RNAまたはDNAのいずれかであるが、RNAおよびDNAモノマーの両方またはペプチド核酸モノマーを含み得る。この核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得る。この核酸分子のモノマーは、従来のホスホジエステル結合または改変された結合 (例えば、ホスホロチオエート結合など)により連結され得る。さらに、モノマーの糖成分は、例えば、ヌクレアーゼ耐性および/または細胞取り込みを付与する助けとなる2'置換の付加により改変され得る。この核酸分子はまた、dsRNA-Rをコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部分に相補的なヌクレオチド配列を含み得る。好ましくは、この核酸分子は、完全長配列に相補的なヌクレオチド配

列を含み得るが、完全長配列の一部分に相補的なヌクレオチド配列を含み得る。この核酸分子はまた、dsRNA-Rをコードするヌクレオチド配列に相同的なヌクレオチド配列を含み得、そしてdsRNA-Rをコードする完全長配列またはその任意の部分に対し、上記のように決定される、少なくとも約70%相同、より好ましくは少なくとも約80%相同、より好ましくは少なくとも約90%相同、そして最も好ましくは少なくとも約95%相同であり得る。

【0023】

広範な種類の代替のクローニングおよびインビトロ増幅方法が、当業者に周知である。これらの技法の例は、例えば、Bergerら、Guide to Molecular Cloning Technique, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger)に見出され、これらはそれらの全体が参考として本明細書に援用される。

【0024】

本発明の別の局面は、ベクター、または組換え発現ベクターに関し、これは上記の任意の核酸分子を含む。本明細書で用いられるベクターは、dsRNA-RをコードするDNAを発現するために、dsRNA-RをコードするDNAまたはRNAのいずれかを増幅する。好適なベクターは、制限されないで、プラスミド、ファージ、コスミド、エピソーム、ウイルス粒子またはウイルス、および組み込み可能なDNAフラグメントを含む。好適なウイルス粒子は、制限されないで、アデノウイルス、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス、セムリキ森林ウイルス、ワクチニアウイルス、およびレトロウイルスを含む。好適な発現ベクターは、制限されずに、pcDNA3 (Invitrogen) およびpSVL (Pharmacia Biotech)、pGEMベクター (Promega)、pPROEXベクター (LTI, Bethesda, MD)、Bluescriptベクター (Stratagene)、pQEベクター (Qiagen)、pSE420 (Invitrogen)、およびpYES2 (Invitrogen) を含む。

【0025】

好適な発現ベクターは、複製可能なDNA構築物であり、そこでは、dsRNA-RをコードするDNA配列が、適切な宿主細胞または生物中でdsRNA-Rの発現を行い得る適切な制御配列に作動可能に連結されている。DNA領域は、それらが互いに関して機能的に配置されるとき、作動可能の連結されている。制御配列は、限定されずに、プロモーター、オペレーター、リボソーム結合配列、および転写／翻訳停止配列を含む。

【0026】

好適なベクターは、好ましくは、宿主生物により認識されるプロモーターを含む。本発明のプロモーター配列は、原核生物、真核生物またはウイルスのいずれかのものであり得る。適切な原核生物配列の例は、細菌ファージλのP_RおよびP_Lプロモーター(The bacteriophage Lambda, Hershey, A. D.、編、Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1973)、およびLambda II, Hendrix, R. W.、編、Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1980)、各々はその全体が参考として本明細書に援用される)；E. coliのtrp、recA、ヒートショック、およびlacZプロモーターならびにSV40初期プロモーター(Benoistら、Nature、1981、290、304-310、これはその全体が参考として本明細書に援用される)。さらなるプロモーターは、制限されないで、マウス乳腺癌ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスの長末端反復、モロニーウイルス、サイトメガロウイルス即時初期プロモーター、エプスタインバーウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、およびヒトメタロチオネインを含む。さらに、適切な発現ベクターは、形質転換宿主細胞のスクリーニングを可能にするマーカーを含み得る。発現ベクターは標準的な方法により調製され得る。

【0027】

本発明の別の局面は、上記の任意の核酸分子を含む発現ベクターを有する形質転換宿主細胞に関する。本発明のポリペプチドの発現のための適切な宿主細胞は、制限されずに、原核生物、酵母、および真核生物を含む。適切な原核生物は、

制限されずに、Escherichia、Bacillus、Salmonella、Pseudomonas、Streptomyces、およびStaphylococcus属の細菌を含む。適切な真核生物細胞は、制限されずに、昆虫細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、アフリカミドリザル腎臓細胞（COS細胞）、およびマウス3T3線維芽細胞を含む。適切な酵母細胞は、制限されないで、Saccharomyces、PichiaおよびKluyveromyces属を含む。本発明のポリペプチドはまた、バキュロウイルス発現系（Luckowら、Bio/Technology、1988、6、47、Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual、O'Reillyら（編）、W. H. Freeman and Company、New York、1992、および米国特許第4,879,236号、各々はその全体が参考として本明細書に援用される）を用いて発現され得る。さらに、MAXBACJ完全バキュロウイルス発現系（Invitrogen）を、例えば、昆虫細胞における産生のために用いられ得る。細胞培養におけるこのような細胞の増殖は、例えば、その全体が参考として本明細書に援用される、Tissue Culture、Academic Press、KrunerおよびPatterson、編（1973）に記載のように慣用的な手順である。

【0028】

本発明の別の局面は、上記の核酸分子によりコードされる単離されたポリペプチドに関する。本発明の好適な実施形態では、この単離されたポリペプチドは、dsRNA-Rをコードするアミノ酸配列を含む。あるいは、このポリペプチドは、dsRNA-RPをコードするポリペプチドのフラグメントである。あるいは、このポリペプチドは、dsRNA-Rに相同なアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。dsRNA-Rに対して、上記のように決定される、少なくとも約70%の配列同一性または相同性、少なくとも約80%の配列同一性または相同性、好ましくは約90%の配列同一性または相同性、より好ましくは約95%の配列同一性または相同性および最も好ましくは約98%の配列同一性または相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドが、本発明に含まれるとして

企図される。好適な相同ポリペプチドは、ネイティブのdsRNA-Rと比較して少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を含む。その他の好適な相同ポリペプチドは、dsRNA-Rと比較して、2、3、4、5、6、7、8、9、または10までの保存的アミノ酸置換を含む。このポリペプチドは、宿主細胞において、異種タンパク質からの領域を含み得る融合タンパク質として発現され得る。本発明のポリペプチドはまた、同じタンパク質からではあるが、配列において天然に存在するポリペプチドとは異なる領域を含み得る。さらに、相同的dsRNA-Rポリペプチドは、dsRNA-Rに対し、それぞれ、少なくとも約70%機能的相同性、少なくとも約80%機能的相同性、好ましくは約90%機能的相同性、より好ましくは約95%機能的相同性および最も好ましくは約98%機能的相同性を有するようなポリペプチドを含む。従って、本発明は、dsRNA-Rに相同的であり、そしてdsRNA-Rの生物学的性質と実質的に類似している少なくとも1つの生物学的性質（機能的相同性）を本質的に有するタンパク質を含むことが理解されるべきである。

【0029】

dsRNA-Rをコードする本発明のポリペプチドは、例えば、dsRNAに結合する能力のために、THAドメインを含むために、およびMyD88アダプタータンパク質と相互作用する能力のために、組換え発現ライブラリーまたは配列データベースをスクリーニングすることにより単離され得る。MyD88アダプタータンパク質は、リポポリ多糖およびリポタンパク質、ならびにインターロイキン1のような産物のためのレセプターからのシグナル伝達に必要である。本発明のポリペプチドは、好ましくは単離された形態で提供され、そして好ましくは実質的に精製されており、そして最も好ましくは均一にまで精製されている。宿主細胞は、好ましくは溶解され、そしてポリペプチドは、この宿主細胞の溶解液から回収される。あるいは、ポリペプチドは、宿主細胞を溶解することなく、宿主細胞からの細胞培養培地を精製することにより回収される。このポリペプチドは、周知の方法により、組換え細胞培養から回収または精製され得る。これには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、アニオン交換クロマトグラフィーまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフ

ィーおよびレクチンクロマトグラフィーが含まれる。

【0030】

本発明の別の局面は、上記の核酸分子またはポリペプチドのいずれか、および受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を含む組成物に関する。好ましくは、このキャリアまたは希釈剤は、薬学的に受容可能である。このキャリアまたは希釈剤は、単独またはワックスと混合したモノステアリン酸グリセリンまたはジステアリン酸グリセリンのような当該分野で公知の持続放出材料のいずれかを含み得る。この処方物はまた、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、保存剤、甘味剤、濃厚剤または香味料を含み得る。本発明の処方物は、当該分野で周知の手順を採用することにより、患者への投与後、活性成分の急速、持続または遅延放出を提供するように処方され得る。薬学的組成物は滅菌され、そして、所望であれば、活性化合物と有害に反応しない、補助剤、乳化剤、浸透圧に影響するための塩、緩衝液および／または着色物質などと混合され得る。濃厚剤、香味料、希釈剤、乳化剤、分散補助剤またはバインダーもまた添加され得る。

【0031】

本発明のポリペプチドを用いて、dsRNA-RまたはdsRNAに対する抗体を生成し、そしてdsRNA-RまたはdsRNAの活性を調整する化合物をするために用い得る。好ましくは、この抗体は、dsRNA-R内のエピトープに結合する。この抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するハイブリドーマ、および抗体それ自身は、このポリペプチドの単離および精製に有用である。さらに、抗体は、dsRNA-Rの特異的インヒビターであり得る。本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を用い、周知の技法および容易に入手可能な出発材料を用い、天然供給源から、または組換え技術によるタンパク質を精製し得る。抗体を作製する方法は、当業者に公知である。モノクローナル抗体を調製する技法については、例えば、本明細書にその全体が参考として援用される、Stitesら（編）、Basic and Clinical Immunology（第4版）、Lange Medical Publications、Los Altos、CAを参照のこと。抗体、FabフラグメントおよびF(ab)₂フラグメ

ントの産生は、例えば、本明細書に参考として援用される、Harlow、E. およびD. Lane (1988) ANTIBODIES: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY. に記載されている。

【0032】

本発明はまた、薬学的キットを含むキットに関する。このキットは、上記の核酸分子、ポリペプチド、または抗体のいずれか、および適切なコントロールを含み得る。好ましくは、このキットは、例えば、指示書、固体支持体、定量の助けとなる試薬などのさらなる成分を含む。

【0033】

本発明の別の局面は、哺乳動物に、所定量のdsRNA-R、dsRNA-Rに対する抗体、またはdsRNA-Rに結合する化合物を投与することによる、哺乳動物における免疫応答を調整する方法に関する。この量は、動物種、動物のサイズなどに依存するが、当業者によって決定され得る。投与の経路は、経口、鼻、直腸、肺、経皮または非経口、皮下、静脈内、尿道内、筋肉内、鼻内、眼科溶液、または軟膏のような活性成分を作用の適切または所望の部位に効率的に輸送する任意の経路であり得、非経口または経口経路が好適である。

【0034】

本発明の別の局面は、dsRNA-Rをコードする核酸分子またはポリペプチドのいずれかに結合する化合物を同定する方法に関し、この方法は、dsRNA-Rまたはこれをコードする核酸分子を、化合物と接触させる工程、およびこの化合物がdsRNA-R、またはこれをコードする核酸分子を結合するか否かを決定する工程を包含する。結合は、当業者に周知である結合アッセイにより決定することができ、これには、制限されないで、ゲルシフトアッセイ、ウェスタンブロット、放射線標識競合アッセイ、クロマトグラフィーによる共分画、共沈殿、ELISAなどが含まれ、これらは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology、1999、John Wiley & Sons、NYに記載され、これはその全体が参考として本明細書に援用される。このような試験で用いられるdsRNA-Rポリペプチドまたは核

酸分子は、溶液中で遊離しているか、固体支持体に付着しているか、細胞表面に付着しているか、または細胞内に位置しているかのいずれかであり得る。

【0035】

本発明の別の局面は、dsRNA-Rのシグナル伝達活性を調整する化合物を同定する方法に関し、この方法は、dsRNA-Rを化合物と接触させる工程、およびこの化合物がdsRNA-Rの活性を改変するか否かを決定する工程を包含する。試験化合物の存在下の活性が測定され、そして試験化合物の不在下の活性と比較される。試験化合物を含む試料の活性が、試験化合物を欠く試料中の活性より高い場合、この化合物は、増加した活性を有する。試験化合物を含む試料の活性が、試験化合物を欠く試料中の活性より低い場合、この化合物は、阻害された活性を有する。このような試験で用いられるdsRNA-Rは、溶液中で遊離しているか、固体支持体に付着しているか、細胞表面に付着しているか、または細胞内に位置しているかのいずれかであり得る。

【0036】

dsRNA-Rに結合するか、および／または調整する化合物は、例えば、細胞媒介免疫応答を促進するワクチンアジュバント、抗細菌剤（例えば、Listeria感染からの保護）、腫瘍免疫療法、アレルギー処置（例えば、ヒトPBMCにおいてIgEを抑制すること、Th2からTh1にシフトすること）において、および抗炎症剤として（例えば、嚢胞性線維症、敗血症、心臓疾患、クラミジア、炎症性大腸疾患、関節炎、および多発性硬化症）としての有用性を有する。

【0037】

本発明を、本発明を説明することが意図される以下の実施例によりさらに説明する。以下の実施例は、本発明を例示することを意図し、そしていかなる方式においても本発明を制限すると解釈されるべきではない。当業者は、本発明の思想および範囲内にある改変を認識する。本明細書で言及する特許、出願、および印刷刊行物を含むすべての参照物は、それらの全体が参考として本明細書に援用されることが意図される。

【0038】

(実施例)

(実施例1：一般的方法)

(動物および細胞株)

骨髄は、種々の遺伝子型 (C57B1/6、Balb/c; Charles River、またはC3H/HeJ、Jackson Labs) の6~12週齢の雌マウスから収穫した。骨髄細胞を、新鮮に用いるか、または10%ジメチメスルホキシドを含むウシ胎児血清 (FCS; Surnmit) 中で凍結し、そして-80℃で貯蔵した。骨髄マクロファージ (BMMO) を、Current Protocols in Immunology、前述中に記載のように調製した。簡単に述べれば、新鮮または凍結骨髄細胞を、RPMI、10%熱不活性化 (30分、56℃) ウシ胎児血清 (FCS)、2mM L-グルタミン、100 μg/ml ストレプトマイシン、100単位/ml ペニシリン、50 μM β-メルカプトエタノールおよび100U/ml 組換えマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF; R&D Systems) 中で培養した。24時間後、非粘着細胞を新たなディッシュに取出し、そして培養を7日まで継続し、マクロファージ単層を生成した。非粘着BMDDCを、M-CSFよりむしろGM-CSF (200U/ml; Preprotech) で補填した同培地中の培養により生成した。RAW 264.7マウスマクロファージ細胞株 (もとはBalb/cマウス由来) は、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) から得た。RAW264.7細胞を、10%不活性化FCS、L-グルタミン、ストレプトマイシン、ペニシリン、および1 μMピルビン酸ナトリウムを含むDMEM中で培養する。

(試薬)

細胞培養物を、以下の試薬で処理した：K235E E. coli LPS (ゲル濾過精製 (Sigma))、S. minnesota R595由来のモノホスホリルリピドA (MPL; RIBI Immunochem Research, Inc.,) (添加前に10分間超音波処理した)。ホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチドを、Oligos Etc (Wilsonville, OR) によって合成した。dsRNAを、当業者に公知の現在の技術に

従って合成し得る。組換えマウスインターロイキン1- β (IL-1) (Endogen) およびインターロイキン-18 (IL-18) (Biosource) をまた使用して、いくつかの実験においてRAW264.7細胞を刺激した。

【0039】

(イムノブロットイング)

刺激に続いて、BMMO細胞またはRAW264.7細胞を、Complete protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim) を含む1% TritonX-100、50mM Tris、62.5mM EDTA (pH8.0) (Triton溶解緩衝液) に溶解した。溶解物を、還元サンプル緩衝液にて煮沸し、NuPAGE Bis-Tris電気泳動システム (Novex) を使用する10% ポリアクリルアミドゲル上で分離した。ニトロセルロース膜を、製造業者の指導書に従って、I κ B- α 、リン酸化I κ B- α に対する抗体 (New England Biolabs)、または抗IL-18 (Santa Cruz Biotechnology) でプローブし、そしてenhanced chemiluminescence (Amersham) で可視化した。

【0040】

(κ B-Lucアッセイ)

RAW264.7細胞を、6ウェルプレート (Corning) にウェルあたり 3×10^5 細胞の密度で、トランスフェクションの24時間前に播いた。トランスフェクションに使用したプラスミドは、pNF- κ B-Luc (Clontech) およびpCR3. V64-Met-Flag-MyD88lpr (Jurgen Tschoppによって親切にも提供された; Burnsら、J. Biol. Chem., 1998, 273, 12203-9に記載される) であった。総プラスミドDNA濃度を、空ベクター (pCMVKm2, Chiron) の添加によって全てのウェルにわたって正規化した。細胞を、ウェルあたり10mlのLipofectAMINE (Gibco BRL) を含むOpti-MEM I (Gibco BRL) 中にて、製造業者の指導書に従って、定めた濃度のDNAでトランスフェクトした。細胞を、37°Cでトランスフェクション混

合物と3時間インキュベートし、次いで、培養培地を置換し、そして細胞を一晩回復し得た。次の日に、トランスフェクトした細胞を、37℃、5%CO₂での培養培地にて、示された濃度および時間でホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、MPL、LPS、またはサイトカインを用いて処理した。細胞を、冷リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で1回洗浄し、そしてReporter Lysis Buffer J (Promega)で溶解した。溶解物上清におけるルシフェラーゼ活性を、Microlite 2プレート(Dynex)およびML 3000 Luminometer (Dynatech)を使用して、全て製造業者の指導書に従って、決定した。Flag-MyD88lpr発現の検出について、トランスフェクトしたRAW264.7細胞からの不溶性ペレットを、Triton溶解緩衝液に再懸濁し、そしてサンプル緩衝液の添加および煮沸の前に10分間超音波処理した。分離およびニトロセルロース膜への転写の後に、膜を、FLAG M2抗体(Sigma)を使用してイムノブロットした。

【0041】

(フローサイトメトリー)

BMDDCを、示されたようにアジュバントで一晩処理し、洗浄し、Fe Block (0.25 µg/10⁶細胞; Pharmingen)を含有する冷PBS/2% FBSに再懸濁し、そしてFITC結合体化抗体およびPE結合体化抗体(1 µg/10⁶細胞)を、5分後に添加した。細胞を、氷上にて抗体で30分間インキュベートし、洗浄し、そしてFACScan (Becton-Dickson)でのフローサイトメトリーによって分析した。CD11cについてポジティブに染色しかつ生存細胞の前方向分散特性および横方向分散特性を有するBMDDC培養物由来の細胞のみが、分析に含まれた。CD86発現における変化を、未処理BMDDC培養物の幾何平均CD86-FITC蛍光を正規化するアジュバントで処理したCD11c生存細胞のCD86-FITC染色の幾何平均の蛍光に基づいて評価する。

【0042】

(実施例2：優勢劣勢MyD88の発現は、κB依存的レポーター遺伝子のdsRNA誘導をブロックする)

RAW264.7細胞を、 κ B-ルシフェラーゼプラスミドと優勢劣勢型のMyD88 (Toll/IL-1レセプターファミリーのメンバーによるシグナル伝達に必要なとされるアダプタータンパク質) をコードする発現ベクターとを同時トランスフェクトした。これらの実験において使用した優勢劣勢MyD88であるMyD88lprは、インタクトなTHDを有するが、デス(death)ドメイン(DD)に点変異を含む。lprマウスにおけるFasのデスドメインにでの同様の変異は、おそらくデスドメインのコンフォメーションを変更することによってFasシグナル伝達を排除し、従って、下流のシグナル伝達分子との結合をブロックする。RAW264.7細胞におけるMyD88lprの過剰発現は、Toll相同性ドメインを含むタンパク質との結合について内因性MyD88を競争することによって、MyD88依存性シグナル伝達を妨害することが予想される。デスドメインでの変異がNF- κ Bの他の活性化因子を共有し得る下流のシグナル伝達成分との結合を阻止すべきであるように、このMyD88lprの効果は、Toll関連タンパク質に特異的である。

【0043】

FLAGタグ化MyD88lprをコードするプラスミドでのRAW264.7細胞のトランスフェクションは、抗FLAG抗体でのイムノブロットによって決定されるように、期待されたサイズのタンパク質の発現を生じた(データは示さず)。次いで、RAW264.7細胞を、 κ B-Luc (1 μ g) 単独でか、またはMyD88lprをコードするプラスミドと異なる2つの比(10:1または1:1)でトランスフェクトした。総プラスミドDNA濃度を、空ベクターを添加することによって全てのウェルにわたって正規化した。トランスフェクション24時間後に、細胞を、dsRNA (25 μ g/ml; ポリ(dI:dC))、モノホスホリルリピドA (MPL) (1 μ g/ml) またはLPS (1 μ g/ml) で処理した。優勢劣勢MyD88lprを発現するRAW264.7細胞において、MPLまたはLPSによって誘導される κ B依存性ルシフェラーゼ活性は阻害された。同様の様式で、 κ B-ルシフェラーゼプラスミドとMyD88lprをコードする発現ベクターとが同時トランスフェクトされた細胞は、dsRNA処理によって誘導される κ B依存性ルシフェラーゼ活性は阻害された。

これらの結果は、MyD88機能がdsRNAによるNF- κ Bの完全な活性を必要とすることを示す。MyD88を必要とする公知のレセプター全てが共通の構造特性（THD）を共有するので、この知見はまた、推定のdsRNAレセプターの成分がTHDを有することを意味した。THDを有するレセプターの存在およびdsRNAによって誘導されるシグナル伝達におけるToll経路成分の関与は、新規である。

【0044】

（実施例3：dsRNAシグナル伝達におけるTLR4に対する要求性）

dsRNA-Rのポリペプチド配列を決定する好ましい方法は、既知のTLRが候補でありそうか否かを試験することである。マウスにおけるLPSに対する応答についてTLR4に対する要求は、TLR4における点変異を有するエンドトキシン非応答性株C3H/HeJマウス、ならびにTLR4を発現しないC57B1/10ScCrマウスおよびC57B1/10ScNCrマウスを使用して例示されてきた（Vogelら、J. Immunol. 1999, 162, 5666-70、Qureshiら、J. Exp. Med. 1999, 189, 615-25、Chowら、J. Biol. Chem., 1999, 274, 10689-92、Hoshinoら、J. Immunol. 1999, 162, 3749-52、およびPolitorakら、Science, 1998, 282, 2085-8）。

【0045】

インビトロでのdsRNAおよびMPLに対するAPCの応答におけるTLR4の役割を評価するために、LPS応答性マウス（Balb/c）およびC3H/HeJマウス由来のBMDDCを、これらのアジュバントと一晩培養し、そしてDC活性化／成熟のマーカのアップレギュレーションを評価する。細胞表面CD86発現を、フローサイトメトリーによって定量する。CD86は、活性化樹状細胞およびマクロファージにおいてアップレギュレートされるNF- κ B標的遺伝子であり、これは、抗原特異的T細胞を活性化するそれらの能力を増強する。野生型マウス（Balb/c）およびTLR4変異マウス（C3H/HeJ）由来のBMDDCを、GM-CSFで6日間増殖し、次いで、dsRNA（5

μM)、ネガティブコントロールオリゴヌクレオチド ($5\mu\text{M}$)、またはLPS ($1\mu\text{g}/\text{ml}$)、で一晩処理するか、あるいは処理しないままである。生存CD11cポジティブ細胞上のCD86の細胞表面発現を、フローサイトメトリーによってアッセイし得る。結果を、同一の培養物由来の未処理BMDDCの幾何平均蛍光(MF)に対して正規化したアジュバント処理BMDDCのMFとして示し得る。dsRNAで処理した野生型BMDDCおよびTLR4変異BMDDCが細胞表面CD86発現増加を示す場合、TLR4は、dsRNAによるインビトロでのAPC活性化について必要とされ得ない。

【0046】

上記の実験と同様のさらなる実験を実施して、dsRNA-Rの正確な特徴をよりよく特徴付けるために、他の既知のToll様レセプターを試験し得る。これは、既知のインタクトなTLR、およびこれらのレセプターを非機能的にする変異を有する任意の比較し得る細胞株において実施し得る。インタクトな場合はdsRNAによって活性化されるレセプターを有するが、レセプターが欠損する場合は活性化しない細胞の同定は、どのTLRおよびどの特定のTHDが存在するのかを正確に特定する。

【0047】

本明細書中に開示された結果はまた、アダプタータンパク質MyD88をそのシグナル伝達経路に必要とするレセプターによって媒介される細胞性シグナル伝達のアゴニストおよびアンタゴニストとして働き得る化合物の開発について有用な手段を提供することを当業者によって認識される。化合物を、細胞とインキュベートし得、そしてdsRNA活性化に続くことが公知の事象のカスケードがもたらされるか否かを知るためにアッセイし得る。次いで、細胞を、MyD881pr遺伝子でトランスフェクトし得る。MyD881pr遺伝子なしのコントロールにおいて効果を生成するが、MyD881pr遺伝子が発現する場合は効果を生成し損なう化合物は、MyD88アダプタータンパク質を必要とする経路を介する細胞内シグナル伝達を活性化することを示されてきた。

【0048】

(実施例4：dsRNA-Rの単離)

多くの異なる手順を利用して、T o l l 関連のd s R N A - R 成分を同定し得る。最初に、当業者は、既知のT o l l 様レセプターおよび新規のT o l l 様レセプターの能力を試験して、非応答性の細胞におけるd s R N A に対する応答性を確認し得る。第二に、当業者は、M y D 8 8 を使用してd s R N A によって特異的に活性化されかつ他のT o l l 様レセプターリガンド（例えば、L P S ）ではない相互作用タンパク質を精製し得るか、または酵母2ハイブリッド系を使用して対応するc D N A を単離し得る。

【0049】

マウスT o l l 様レセプター1～6（T L R 1～6）は、ヒトホモログに密接に関連する。公的データベースにおいて、マウス遺伝子について完全な配列または部分配列が利用可能である。T L R をコードする発現ベクターを、d s R N A によって活性化されるレポーター遺伝子（例えば、κ B - レポーター）とともに、d s R N A 非応答性の細胞株（例えば、N I H 3 T 3）にトランスフェクトし得る。同時トランスフェクトしたT L R のいずれかがd s R N A に対する応答性を与える場合、これはd s R N A での処理におけるレポーター遺伝子の発現によって反映される。同様の手段を使用して、d s R N A シグナル伝達における任意の候補d s R N A - R 成分（新規のT L R を含む）の関与を試験し得る。新規のT o l l 関連レセプターを同定およびクローニングする手段としては、ゲノムスクリーニング配列データベース、変性P C R、酵母2ハイブリッド系、およびハイブリダイゼーションによるライブラリースクリーニングが挙げられる。

【0050】

インタクトなT o l l 相同性ドメイン、およびデスドメインにおける単一の不活性化点変異を含むM y D 8 8 l p r を、細菌または真核生物細胞のいずれかに組換えタンパク質として発現し得る。この組換えタンパク質を親和性試薬として使用して、d s R N A 処理細胞（例えば、R A W 2 6 4 . 7）から相互作用タンパク質を単離および精製し得る。T L R シグナル伝達経路における下流のエフェクター分子（例えば、I R A K、T R A F 6）の結合は、デスドメインにおける「l p r」変異によって最小化されるかまたは除去されるべきである。従って、

MyD88lprに特異的に結合するタンパク質は、THD、および／またはTHDをデスドメインに連結する領域と相互作用するものである。Toll相同性ドメインがホモタイプな相互作用を介して結合する場合、THDを含むdsRNA-R成分はMyD88を結合することが期待される。一旦、推定のdsRNA-RがMyD88に対してアフィニティ精製されると、対応するcDNAを、例えば、ペプチド合成およびPCRのような標準方法によって単離し得る。同様に、MyD88lprを餌(bait)として酵母2ハイブリッド系において使用して、相互作用するタンパク質をコードするcDNAを単離し得る。次いで、dsRNAオリゴヌクレオチド誘導シグナル伝達に対するこれらのcDNAの関連を、上記のように試験し得る。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Application No PCT/US 00/41726
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YOSHIDA I ET AL: "IDENTIFICATION OF A CELL MEMBRANE RECEPTOR FOR INTERFERON INDUCTION BY POLY RI:RC" ACTA VIROLOGICA, ACADEMIA PRAGUE, PRAGUE, CS, vol. 36, August 1992 (1992-08), pages 347-358, XP000982806 ISSN: 0001-723X the whole document	1-6, 9-12
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ 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 29 May 2001		Date of mailing of the international search report 07/06/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Nat. Application No.

PCT/US 00/41726

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARDIMAN G ET AL: "MOLECULAR CHARACTERIZATION AND MODULAR ANALYSIS OF HUMAN MYD88" ONCOGENE, GB, BASINGSTOKE, HANTS, vol. 13, no. 11, 5 December 1996 (1996-12-05), pages 2467-2475, XP002073838 ISSN: 0950-9232 the whole document ---	
A	QURESHI S T ET AL: "ENDOTOXIN-TOLERANT MICE HAVE MUTATIONS IN TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4)" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 189, no. 4, 15 February 1999 (1999-02-15), pages 615-625, XP000900609 ISSN: 0022-1007 cited in the application the whole document -----	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 14

Claim 14 refer to a method of modulating an immune response in a mammal comprising administering to said mammal an amount of a compound which binds to the dsRNA receptor, wherein said compound modulates said dsRNA receptor without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of the said claim is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art.5 and 6 PCT). No search can be carried out for such speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CA, J
P, US

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA11 GA18 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ20 QR48 QR80
QS15 QS20 QX01 QX07
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA40
CA40 DA50 DA76 DA86 EA50
FA72 FA74

专利名称(译)	双链RNA受体 (dsRNA-R) 和相关方法		
公开(公告)号	JP2003514791A	公开(公告)日	2003-04-22
申请号	JP2001538520	申请日	2000-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	Chiron公司		
[标]发明人	マツキチャンメアリーー		
发明人	マツキチャン, メアリーー リー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N15/12 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P1/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K14/705		
FI分类号	C07K16/28 C07K14/705 C12Q1/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/GA18 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QR48 4B063/QR80 4B063/QS15 4B063/QS20 4B063/QX01 4B063/QX07 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/163157 1999-11-02 US 60/167389 1999-11-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及编码dsRNA受体 (dsRNA-R) 和dsRNA受体 (dsRNA-R) 多肽的核酸分子。dsRNA-R包含一个Toll同源域 (THD) , 可以与MyD88衔接蛋白相互作用并结合dsRNA。 本发明还涉及针对dsRNA-R的抗体 , 调节免疫应答的方法 , 以及鉴定结合dsRNA-R的化合物和/或调节dsRNA-R的化合物的方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		INTERN. No. of Application No. PCT/US 00/41726
1. CLASSIFICATION OF THE INVENTION IPC 7 2 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
2. FIELD SEARCHED Documents searched: national classification systems followed by classification symbols		
IPC 7 2 C12N C07K C12Q G01N		
Documentation searched other than national documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search phase of data base and, where practical, search terms used: WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Criterion of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	YOSHIDA I ET AL: "IDENTIFICATION OF A CELL MEMBRANE RECEPTOR FOR INTERFERON INDUCTION BY POLY (I:RC) ACTA VIROLOGICA ACADEMIA PRAGUE, PRAGUE (CS), 347-350, August 1992 (1992-08), pages 347-350, XP000982806 ISSN: 0001-725X the whole document	1-6, 9-12
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ Patent family members are listed in annex.		
A document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *B* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *C* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *D* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *E* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *F* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *G* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *H* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *I* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *J* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *K* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *L* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *M* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *N* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *O* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *P* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *Q* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *R* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *S* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *T* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *U* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *V* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *W* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *X* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *Y* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons *Z* document defining the generic state of the art which is not considered for patentability reasons		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 May 2001		07/06/2001
Name and mailing address of the ISA American Patent Center, P.O. Box 10810, Arlington, VA 22202-8110, USA Tel: (703) 592-1000, Fax: (703) 592-1001		Authorized officer Hornig, H