

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : 2 774 377

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 98 01100

⑤1 Int Cl<sup>6</sup> : C 07 K 14/47, C 07 K 16/18, C 12 N 15/12, 15/85, 5/  
10, C 07 H 21/04, A 61 K 38/17, A 01 K 67/027

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 30.01.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 06.08.99 Bulletin 99/31.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE  
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM Etablis-  
sement public a caractere scientifique et technologique  
— FR.

⑦2 Inventeur(s) :

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

⑤4 PROTEINE HUMAINE BETA-TRCP DE CIBLAGE DES PROTEINES VERS LES VOIES DE DEGRADATION PAR  
LE PROTEASOME.

⑤7 La présente invention concerne la protéine humaine  
( $\beta$ -TrCP de ciblage des protéines vers les voies de dégra-  
dation par le protéasome qui est capable d'interagir avec la  
protéine Vpu du virus HIV-1 et avec la protéine cellulaire Sk-  
plp, ainsi que ses fragments peptidiques et les séquences  
d'acides nucléiques codant pour ladite protéine et ses frag-  
ments.

Elle concerne également l'utilisation de la protéine hu-  
maine  $\beta$ -TrCP ou de ses fragments peptidiques pour le cri-  
blage d'agents antiviraux anti-HIV-1 et d'agents  
antitumoraux, les agents antiviraux, les agents antitumo-  
raux et les anticorps dirigés contre ladite protéine et ses  
fragments peptidiques.

FR 2 774 377 - A1



La présente invention a pour objet une nouvelle protéine humaine, qui est une protéine qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome. Cette protéine, dénommée h- $\beta$ TrCP, est capable d'interagir notamment avec la protéine Vpu du virus HIV-1 ainsi qu'avec la

5 protéine cellulaire Skp1p.

Elle a également pour objet les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP qui ont conservé l'activité d'interaction avec la protéine Vpu du virus HIV-1 et/ou avec la protéine Skp1p.

Elle a également pour objet les séquences d'acides nucléiques codant pour ladite protéine ou ses fragments peptidiques.

10

Elle concerne également l'utilisation desdites séquences d'acides nucléiques ou des protéines et fragments peptidiques correspondants pour le criblage d'agents antitumoraux ou d'agents antiviraux anti-HIV-1.

Elle concerne également l'utilisation de l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP ou de ses fragments peptidiques dans le domaine de la thérapie génique anti-infectieuse HIV-1 ou antitumorale.

15

Elle a également pour objet les vecteurs d'expression contenant lesdites séquences d'acides nucléiques et les microorganismes procaryotes ou les cellules eucaryotes, transformés avec lesdits vecteurs.

Enfin, elle a également pour objet des procédés de criblages d'agents antitumoraux et d'agents antiviraux anti-HIV-1.

20

La protéine Vpu est une petite protéine membranaire de 81 acides aminés, exprimée par la plupart des isolats du virus HIV-1 mais ni par ceux du virus humain HIV-2 nettement moins pathogène, ni par ceux du virus simien SIV (COHEN et al., *Nature*, 334, 532-534, 1988; et STREBEL et al., *Science*, 2, 1221-1223, 1988).

25

La protéine Vpu possède un domaine hydrophobe N-terminal, qui permet l'ancrage aux membranes cellulaires, et un domaine C-terminal hydrophile dirigé vers le cytoplasme. Sa structure est très similaire à celle d'autres protéines membranaires de virus à ARN telles que la protéine M2 du virus *Inflenza* de la grippe (STREBEL et al., *J. Virol*, 63, 3784-379, 1989; HENKLEIN et al., *Peptide Research*, 6, 79-87, 1993). Une analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) a mis en évidence la présence de deux hélices alpha au niveau du domaine

30

cytoplasmique de la protéine Vpu, encadrant une région flexible contenant deux sérines, sites de phosphorylation par la caséine kinase II (SHUBERT et al., J. Mol. Biol., 236, 16–25, 1994 ; WRAY et al., Int. J. peptide Protein Res., 45, 35–43, 1995).

5 On connaît à ce jour deux fonctions biologiques associées à la protéine Vpu. La première fonction de la protéine Vpu est liée à sa capacité à augmenter la production de particules virales à partir des cellules infectées par HIV-1 (STREBEL et al., 1988, 1989; *supra*). En l'absence de la protéine Vpu, la production de virions est largement diminuée (de 5 à 10 fois) (STREBEL et al.,  
10 1988, *supra*) ; des agrégats de virus, des structures bourgeonnantes et des particules aberrantes apparaissent à la surface de la membrane plasmique tandis que se forment des particules intracytoplasmiques.

La deuxième fonction de la protéine Vpu est sa capacité à induire la dégradation de la protéine CD4, récepteur cellulaire du virus HIV-1, participant  
15 ainsi à la diminution de l'expression du récepteur CD4 à la surface des cellules (Willey et al., J. Virol. 68, 1207–1212, 1994).

De plus, il a été montré que les deux sérines de phosphorylation de la protéine Vpu, situées en position 52 et 56, étaient indispensables pour la dégradation de CD4 induite par Vpu (MARGOTTIN et al., Virology, 223, 381–  
20 386, 1996). En outre, lors du processus d'infection par le virus HIV-1, en l'absence de la protéine Vpu, le précurseur d'enveloppe Gp160 et la protéine CD4 nouvellement synthétisée s'associent dans le réticulum endoplasmique, bloquant la maturation de la protéine Gp160 (BOUR et al., J. Virol., 65, 6387–6396, 1991). La dégradation du récepteur CD4 médiée par la protéine Vpu est essentielle pour  
25 libérer la protéine d'enveloppe virale qui est retenue dans le réticulum endoplasmique par sa liaison à CD4 grâce à l'interaction avec la sous-unité Gp120, et permettre la maturation normale de l'enveloppe vers la membrane plasmique et ultérieurement son intégration dans les particules virales, ce qui les rend infectieuses. Des études récentes ont mis en évidence le fait que la  
30 dégradation du récepteur CD4 médiée par la protéine Vpu est sensible aux inhibiteurs spécifiques du protéasome, organe présent dans la cellule, et est dépendante de la présence d'une "machinerie d'ubiquitination intacte" (FUJITA et al., J. Gen. Virol., 78, 619–625, 1997). En outre, il est connu que la dégradation de certaines protéines par le protéasome se fait par l'intermédiaire de médiateurs  
35 cellulaires tels que Skp1p. BAI et al. (Cell, 86, 263–274, 1996) ont montré que la protéine Skp1p était nécessaire pour la protéolyse médiée par l'ubiquitine et que

cette dégradation se faisait grâce à l'interaction de Skp1p avec des protéines contenant un motif dénommé boîte F.

Ainsi, la protéine Vpu participe à des fonctions absolument critiques pour assurer la production de particules virales infectieuses en grand nombre, 5 puisqu'elle intervient non seulement sur les produits du gène *gag*, c'est-à-dire sur les protéines de structure en augmentant le relâchement des particules virales mais aussi sur ceux du gène *env* en permettant la maturation de la protéine d'enveloppe suite à la dégradation du récepteur CD4. MARGOTTIN et al. 1996 (*supra*) ont montré que l'interaction entre Vpu et CD4 se faisait par l'intermédiaire de leur 10 domaine cytoplasmique et que cette interaction n'était pas suffisante pour déclencher la dégradation du récepteur CD4.

La protéine Skp1p est une protéine cellulaire impliquée dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome, lequel dépend de l'ubiquitinylation des protéines (PICKART C.M., *The FASEB Journal*, 11, 1055- 15 1066, 1997). La dégradation des protéines par le protéasome est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires essentiels comme le contrôle de la prolifération cellulaire, le renouvellement des protéines et l'élimination des protéines incorrectement repliées, en particulier au niveau du réticulum endoplasmique (CIECHANOVER, A., *Cell*, 79, 13-21, 1994). De nombreux virus, comme le virus 20 HIV-1 qui dégrade CD4 par l'intermédiaire d'une de ses protéines Vpu (TRONO D., *Cell*, 82, 189-1992, 1995), utilisent à leur profit ces voies cellulaires de dégradation des protéines.

La protéine Skp1p est un facteur essentiel de ciblage de protéines régulatrices du cycle cellulaire par le protéasome. Le ciblage de la dégradation de 25 ces régulateurs est en particulier nécessaire à l'entrée du cycle cellulaire en phase S de synthèse d'ADN (PAGANO, M., *The FASEB Journal*, 11, 1068-1075, 1997). Des études récentes montrent que la protéine Skp1p, avec des protéines à boîte F sont les éléments essentiels de complexes de haut poids moléculaires appelés SCF pour "Skp1p-Cullin-F-box-protein complexes". Ces complexes SCF jouent le rôle 30 d'enzyme E3 qui par leur activité ubiquitine-ligase permettent la dernière étape de l'ubiquitinylation de protéines substrats qui sont ainsi ciblées vers la dégradation par le protéasome (HOYT, A., *Cell*, 91, 149-151, 1997).

On a maintenant trouvé une nouvelle protéine humaine qui est une protéine qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation 35 par le protéasome.

En raison de l'homologie de cette nouvelle protéine avec la  $\beta$ TrCP de Xenope, protéine contenant des motifs  $\beta$ -transducine et connue en langue anglaise sous la dénomination " beta transducin repeats containing protein", la protéine de l'invention est dénommée h- $\beta$ TrCP (human- $\beta$ TrCP).

5 La protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention est capable d'interagir notamment avec la protéine Vpu et/ou la protéine Skp1p.

On a trouvé en effet que la protéine h- $\beta$ TrCP interagit avec la protéine Skp1p ; elle fait donc partie d'un nouveau complexe SCF qui normalement est utilisé par la cellule pour la dégradation de régulateurs du cycle cellulaire.

10 De plus, dans les cellules infectées par le virus HIV-1, on a trouvé que la protéine h- $\beta$ TrCP interagit également avec Vpu.

Par l'activité de ciblage vers les voies de dégradation par le protéasome, la protéine h- $\beta$ TrCP, selon l'invention, joue le rôle de médiateur cellulaire de la protéine Vpu dans les cellules infectées par le virus HIV-1.

15 Sans pour autant vouloir se limiter à une théorie quelconque, on pense que, dans les cellules infectées par le virus HIV-1, le virus utilise, par l'intermédiaire de la protéine Vpu, le complexe SCF, dont la protéine  $\beta$ TrCP fait partie pour induire la dégradation du récepteur CD4 qui va favoriser la réplication virale et le relâchement des virions infectieux.

20 La présente invention a donc pour objet une nouvelle protéine humaine, dénommée h- $\beta$ TrCP, qui présente la SEQ ID No.2 et qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome par interaction avec la protéine Skp1p et/ou la protéine Vpu du virus HIV-1.

25 La protéine h- $\beta$ TrCP possède 569 acides aminés et comporte une boîte F et sept motifs WD dont la position dans la séquence SEQ ID N° 2 est la suivante :

- boîte F : acides aminés 147-191,
- premier motif WD : acides aminés 259-292,
- deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
- 30 - troisième motif WD : acides aminés 343-372,
- quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
- cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
- sixième motif WD : acides aminés 467-492,
- septième motif WD : acides aminés 516-544.

35

Elle a aussi pour objet les fragments peptidiques de celle-ci résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, lesdits fragments peptidiques ayant conservé l'activité d'interaction avec la protéine Vpu du virus HIV-1 et/ou avec la protéine Skp1p.

5 L'invention concerne en particulier les fragments peptidiques qui comprennent l'une des séquences en acides aminés de h-βTrCP ci-après :

251-569,

292-569,

292-396,

10 292-545 et

1-291.

La présente invention a également pour objet les séquences d'acides nucléiques, à savoir les séquences d'ADN génomique, les séquences d'ADNc ou d'ARNm qui comprennent ou sont constituées par un enchaînement de nucléotides codant pour la protéine h-βTrCP ou pour l'un quelconque de ses fragments peptidiques tels que définis précédemment.

15 L'invention concerne notamment les séquences d'acides nucléiques codant pour la protéine h-βTrCP et ses fragments peptidiques décrits ci-dessus qui sont représentées par :

- 20 a) les séquences d'ADNc SEQ ID No.1 codant pour ladite protéine h-βTrCP et des fragments d'acides nucléiques codant pour lesdits fragments peptidiques ;
- b) les séquences d'ADN hybridant dans des conditions strictes avec les séquences ci-dessus ;
- c) les séquences d'ADN qui, en raison de la dégénérescence du code génétique,
- 25 résultent des séquences a) et b) ci-dessus et codent pour la protéine h-βTrCP ou ses fragments ; et
- d) les séquences d'ARNm et d'ADN correspondantes.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de la protéine h-βTrCP ou des séquences d'acides nucléiques codant pour cette protéine ou pour ses fragments peptidiques pour le criblage :

- 30 • d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h-βTrCP et la protéine Vpu et/ou d'inhiber l'interaction entre la protéine h-βTrCP et la protéine Skp1p
- d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou
- 35 des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines

tumorales par inhibition ou activation de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

En effet, en perturbant les interactions Vpu/h- $\beta$ TrCP et/ou Skp1p/h- $\beta$ TrCP, on peut :

- 5           - soit inhiber la réplication et la production du virus HIV-1 par des cellules infectées ;  
             - soit inhiber l'entrée en phase S du cycle cellulaire et avoir un effet antiprolifératif.

10           Par ailleurs, en modulant l'interaction Skp1p/h- $\beta$ TrCP, on peut augmenter la production de particules infectieuses produites par des vecteurs rétroviraux à base du génome de HIV-1 dans les lignées productrices de ces vecteurs et ainsi augmenter la production de ces vecteurs de thérapie génique.

15           On peut sélectionner les agents antiviraux soit à partir de banques aléatoires de peptides, à la surface de phages (SCOTT J. et al., *Science*, 249, 386-390, 1990), soit en utilisant des oligonucléotides de synthèse aléatoires selon la technique de type SELEX (TUERK et GOLD, *Science*, 249, 505-510, 1990). Cette technique permet d'isoler à partir d'un pool très large d'oligonucléotides, ceux qui ont une grande affinité pour la protéine d'intérêt, dans le cas présent la protéine h- $\beta$ TrCP. Ils sont dénommés aptamers. Parmi ces aptamers, on pourra  
20           sélectionner ceux qui inhibent les deux interactions Vpu/h- $\beta$ TrCP et Skp1p/h $\beta$ TrCP par le criblage ci-après.

25           Le criblage défini ci-dessus peut par exemple être réalisé en utilisant le système double-hybride en levure dans lequel des cellules de levure co-exprimant la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'invention et la protéine Vpu, ou la protéine Skp1p, sont cultivées sur des milieux dépourvus d'histidine en présence de la substance à tester.

30           On peut également utiliser des variantes du système double-hybride, telles que le système triple-hybride décrit par TIRODE et al. (*J. Biol. Chem.*, 272, 22995-22999, 1997), dans lequel un peptide inhibiteur de l'interaction peut être exprimé comme troisième partenaire pour inhiber l'interaction des deux autres. Une banque de peptides aléatoires peut aussi être utilisée de la sorte. On peut aussi utiliser le système reverse-hybride décrit par VIDAL et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 10315-10320), dans lequel on sélectionne non pas pour une interaction mais  
35           contre une interaction. On peut dans ce système, comme dans le système double-hybride classique, cribler des banques de petites molécules chimiques, y compris issues de la synthèse chimique, pour mettre les levures co-transformées avec les

vecteurs double-hybride ou réverse hybride porteurs des fusions avec la protéine Vpu, la protéine h- $\beta$ TRCP ou la protéine Skp1p, en présence de ces petites molécules à la recherche d'un inhibiteur des interactions Vpu-h- $\beta$ TrCP et Skp1p-h- $\beta$ TrCP.

5 Ce criblage peut aussi être effectué *in vitro* en utilisant la protéine Vpu, ou la protéine Skp1p, et la protéine h- $\beta$ TrCP, l'une des protéines étant immobilisée sur un support approprié et l'autre étant marquée par un moyen quelconque utilisé dans les moyens de détection de substances biologiques, ce moyen de marquage pouvant être par exemple un isotope radioactif, un agent luminescent, de la biotine  
10 ou un anticorps spécifique.

L'une des protéines sera de préférence immobilisée sous la forme d'une protéine de fusion avec la glutathion S-transférase (GST) sur des billes d'agarose-gluthation ou en plaques de microtitration, la GST servant d'agent de couplage de ladite protéine sur les billes ou sur les puits des plaques.

15 A cet effet, on peut utiliser notamment le test de scintillation à proximité (SPA) décrit par BOSWORTH et al. (Nature, 341, 167-168, 1989) et commercialisé par Amersham. Ce test consiste à marquer par un élément radioactif, par exemple le tritium, l'une des protéines et à immobiliser l'autre protéine sur des billes magnétiques ou sur des billes d'agarose-gluthation. L'effet  
20 inhibiteur des substances à tester sur l'interaction des deux protéines (Vpu/h- $\beta$ TrCP ou Skp1p/h- $\beta$ TrCP peut être facilement détecter sans séparation des espèces radioactives liées ou libres selon les protocoles décrits par BOSWORTH et al. (*supra*).

On peut également utiliser la technique "Surface Plasmon Resonances" décrite par KARLSSON et al. (J. Immunol. Methods, 145, 229-233, 1991) utilisant le Biacore commercialisé par Pharmacia, pour isoler les inhibiteurs de l'interaction entre la protéine Vpu et la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'invention ou les inhibiteurs de l'interaction entre la protéine Skp1p et la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'invention.

30 L'activité inhibitrice des agents antiviraux ainsi sélectionnés pourra être vérifiée par des tests sur des cellules T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> ou sur des chimpanzés infectés par les virus HIV-1 ou SIV Cpz.

On peut également préparer les agents antitumoraux, ligands de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention, par les techniques double-hybride ou  
35 apparentées ou par interaction *in vitro* avec des banques combinatoires de peptides ou autres, comme décrit précédemment. Ils peuvent également être choisis parmi

les agents antiviraux qui inhibent l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p décrits ci-après.

A titre d'agents antiviraux appropriés selon l'invention, on peut citer les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP qui ont conservé les propriétés  
5 d'interaction de la protéine h- $\beta$ TrCP soit avec la protéine Vpu, soit avec la protéine Skp1p.

La présente invention a donc également pour objet les agents antiviraux anti-HIV-1 qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention et qui sont dénués de la boîte F ou des motifs WD  
10 de sorte qu'ils ne peuvent plus interagir avec la protéine Skp1p ou la protéine Vpu, respectivement.

On peut encore citer, à titre d'agents antiviraux ou d'agents antitumoraux, des anticorps dirigés contre la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention et ses fragments peptidiques, ce qui constitue un autre objet de l'invention.

15 Ces anticorps peuvent être des anticorps monoclonaux obtenus par le procédé bien connu de KOHLER et MILSTEIN (Nature, 256, 495-497, 1975) ou des anticorps polyclonaux obtenus selon les procédés classiques d'immunisation d'animaux (Antibodies, a laboratory manual. E. Harlow & D. Lane. Cold Spring Harbor laboratory press, 1988).

20 On peut enfin citer comme agents antiviraux ou agents antitumoraux les oligonucléotides antisens bloquant la transcription ou la traduction de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention qui s'hybrident avec une séquence d'acides nucléiques telle que définie précédemment, ce qui constitue également un autre objet de la présente invention.

25 Ces oligonucléotides antisens sont préparés par des techniques bien connues de l'homme du métier, telles que celles décrites par AUSUBEL et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New-York, 1989, Mises à jour jusqu'en 1997).

30 Les fragments peptidiques de h- $\beta$ TrCP, qui possèdent la boîte F, peuvent être utilisés comme agents antitumoraux.

L'invention a également pour objet des animaux transgéniques exprimant un transgène de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention ou des animaux transgéniques dans lesquels le gène  $\beta$ TrCP a été invalidé.

35 Ces animaux transgéniques ou invalidés pour le gène de la protéine h- $\beta$ TrCP pourront servir de modèles d'étude *in vivo* de la perturbation du cycle cellulaire et de la prolifération par l'absence ou la surexpression du gène de la

protéine h- $\beta$ TrCP ou de formes tronquées ou mutées de cette protéine, de la protéine Skp1p ou de la protéine Vpu.

Ces animaux transgéniques sont obtenus par des techniques bien connues de l'homme du métier, telles que celles décrites dans Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. HOGAN, B., BEDDINGTON, R., COSTANTINI, F. & LACY, E. Cold Spring Harbor laboratory press, second edition, 1994.

L'invention a également pour objet les microorganismes procaryotes et les cellules eucaryotes transformés à l'aide d'un vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN selon l'invention. Ce vecteur d'expression, qui peut être par exemple sous la forme d'un plasmide, doit comporter, outre la séquence d'ADN de l'invention, les moyens nécessaires à son expression, tels que notamment un promoteur, un terminateur de transcription, une origine de réplication et de préférence un marqueur de sélection. La transformation des microorganismes et des cellules eucaryotes est une technique bien connue de l'homme du métier qui pourra aisément déterminer, en fonction du microorganisme à transformer, les moyens nécessaires à l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention.

Le microorganisme préféré aux fins de l'invention est *E. coli* alors qu'on utilise de préférence *Saccharomyces cerevisiae* comme levure.

A titre d'exemples de cellules eucaryotes qui conviennent aux fins de l'invention, on peut citer notamment les cellules COS, CHO, SF9, Jurkat, etc., toutes étant répertoriées à l'ATCC.

L'invention a également pour objet les cellules eucaryotes co-transformées avec des vecteurs d'expression contenant d'une part la séquence d'ADN codant pour la protéine Vpu, ou bien celle codant pour la protéine Skp1p, et d'autre part une séquence codant pour la protéine h- $\beta$ TrCP, lesdits vecteurs d'expression contenant de plus des moyens utiles à leur expression, y compris dans le système double hybride en levure.

Les protéines et fragments peptidiques selon l'invention peuvent être obtenus par la technique du génie génétique qui comprend les étapes de :

- culture d'un microorganisme transformé ou de cellules eucaryotes transformées à l'aide d'une séquence d'acides nucléiques selon l'invention et
- récupération de la protéine ou du fragment peptidique produit par ledit microorganisme ou lesdites cellules eucaryotes.

Cette technique est bien connue de l'homme du métier. Pour plus de détail la concernant, on pourra se référer à l'ouvrage ci-après : Recombinant DNA

Technology I, Editors Ales Prokop, Raskesh K Bajpai ; Annals of the New-York Academy of Sciences, volume 646, 1991.

Ils peuvent également être préparés par les synthèses peptidiques classiques bien connues de l'homme du métier.

5 Les acides nucléiques selon l'invention peuvent être préparés par synthèse chimique et génie génétique en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier et décrites par exemple dans SAMBROOK et al. (*supra*).

Par exemple, la synthèse des séquences d'ADNc selon l'invention peut être effectuée par amplification des ARNm de cellules humaines à l'aide de la  
10 méthode PCR (Polymerase Chain Reaction), comme décrit par exemple par GOBLET et al. (Nucleic Acid Research, 17, 2144, 1989) en utilisant des oligonucléotides synthétiques comme amorces, définis à partir de la séquence d'ADN SEQ ID No.1.

Le fragment d'acides nucléiques amplifié peut ensuite être cloné selon  
15 les techniques décrites dans AUSUBEL et al. (Current Protocols in Molecular Biology, chapter 3, *supra*).

L'invention va maintenant être décrite en détail à l'aide de l'exposé expérimental ci-après.

Une grande partie des techniques décrites dans ces exemples, bien  
20 connues de l'homme du métier, est exposée en détail dans l'ouvrage de SAMBROOK et al. (*supra*) ou dans l'ouvrage de AUSUBEL et al. (*supra*).

La description ci-après sera mieux comprise à l'aide des figures 1 à 5 sur lesquelles :

- la figure 1A est la photographie d'une boîte de Petri montrant la  
25 croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant Vpu<sub>C</sub> + VBP1 ; Vpu<sub>C</sub> + h-βTrCP ; Vpu<sub>C-2/6</sub> + h-βTrCP ; Vpu<sub>C</sub> ; h-βTrCP + Vpu<sub>C</sub> et h-βTrCP + CD4<sub>C</sub> sur milieu en présence d'histidine (His+), sur milieu en l'absence d'histidine (His-) et sur milieu en présence du substrat de la β-galactosidase X-Gal (β-Gal) ;

30 - la figure 1B est la photographie d'un gel (Northern blot) montrant 3 ARNm de la protéine h-βTrCP de l'invention ;

- la figure 1C est la photographie d'une immunoempreinte (Western blot) montrant l'expression de la protéine h-βTrCP de l'invention ;

- la figure 2 donne les séquences de 4 protéines, h-βTrCP de  
35 l'invention et βTrCP1 de *Xenopus*, Met30p de *Saccharomyces cerevisiae* et Scon2p de *Neurospora crassa* ;

- la figure 3 est la photographie d'ungel SDS-PAGE 15% montrant l'interaction entre Vpu<sub>C</sub> et la protéine h-βTrCP de l'invention produite *in vitro* ;
- la figure 4 est la photographie d'une boîte de Petri montrant la croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant Skp1p + h-βTrCP ; Skp1p + h-βTrCP-Δ7W ; Skp1p + VBP1 et Skp1p + CD4<sub>C</sub> sur milieu en présence d'histidine (His+), sur milieu en l'absence d'histidine (His-) et sur milieu en présence du substrat de la β-galactosidase X-Gal (β-Gal) ;
- la figure 5 est une représentation schématique de la dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu présentant le réseau d'interactions décrit précédemment.

### **Exemple 1 : Criblage double-hybride en levure / mise en évidence de la séquence d'ADNc de la protéine h-βTrCP et de la protéine h-βTrCP**

Pour identifier les protéines cellulaires susceptibles d'interagir directement avec la protéine Vpu, on a utilisé le système double-hybride en levure décrit par FIELD et SONG dans *Nature*, 340, 245-246, 1989. Ce système double-hybride est basé sur la détection des interactions protéine-protéine par activation du gène rapporteur, His3 ou LacZ sous le contrôle de domaines de l'activateur transcriptionnel Gal4 dans la levure. Dans ce système, l'interaction entre les deux protéines hybrides testées permet l'activation du gène His3 et la croissance des levures sans histidine d'une part, ainsi que l'activation du gène LacZ qui est révélée par une réaction colorimétrique spécifique de la β-galactosidase.

On a choisi comme cible le domaine cytoplasmique de la protéine Vpu. On a procédé à la fusion des résidus d'acides aminés 28 à 81 de la protéine Vpu de l'isolat LAI de HIV-1 avec le domaine de fixation de l'ADN de Gal4 (Gal4BD). La banque d'ADNc criblée était celle des cellules Jurkat (lignée lymphocytaire T humaine, ATCC n°TIB 152) et elle a été fusionnée au domaine d'activation de Gal4 (Gal4AD) dans le vecteur pGAD1318 (BENICHOU et al. *J. Biol. Chem.*, 269, 30073-30076, 1994).

Le clone de 1,3 kb qui a été isolé initialement par le système double-hybride (dénommé VBP1) code pour un ADN complémentaire partiel. Cet ADNc partiel code pour un fragment de 319 acides aminés correspondant au domaine C-terminal de la protéine h-βTrCP. Il contient sept motifs répétitifs suivis d'une queue C-terminale de 24 acides aminés. Ces motifs répétitifs, qui sont connus, sont dénommés motifs WD parce que leur extrémité se termine habituellement par la séquence Trp-Asp (WD) (NEER et al., *Nature*, 371, 297-300, 1994). On notera

que les motifs WD, qui sont impliqués dans des interactions protéine-protéine, sont généralement présents dans des protéines requises pour la dégradation protéique médiée par l'ubiquitine (GHISLAIN et al., *Embo*, 15, 18, 4884-4899, 1996).

5 Le clone ainsi isolé a été caractérisé par séquençage d'ADN sur séquenceur automatisé Applied Biosystem connu sous la dénomination ABI 373A. La technique de séquençage d'ADN est bien connue de l'homme du métier et est décrite notamment dans l'ouvrage SAMBROOK et al., "Molecular Cloning : a Laboratory Manual" Ed. Cold Spring Houbor Press, NY, 1989.

10 Une recherche dans les banques d'ADNc a montré que ce clone est l'homologue d'une séquence codant pour la protéine  $\beta$ TrCP de Xenope identifiée préalablement par SPEVAK et al. (*Mol. Cell. Biol.*, 13, 4953-4966, 1993).

L'ADNc complet (2,1 kb) de la protéine h- $\beta$ TrCP, qui a la SEQ ID No. 1, a été obtenu par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) sur une préparation de plasmide correspondant à la banque d'ADN complémentaires de cellules Jurkat, 15 telles que définies précédemment, dans le vecteur pGAD1318.

En plus des sept motifs WD identifiés dans le fragment C-terminal, la protéine h- $\beta$ TrCP entière selon l'invention possède un domaine N-terminal d'environ 250 acides aminés. Le fragment N-terminal contient un motif pour lequel un consensus 20 a été récemment défini sous le terme de boîte F et dont le rôle serait de cibler des protéines vers la machinerie de dégradation des protéines médiée par l'ubiquitine grâce à l'interaction de protéines contenant cette boîte F avec la protéine Skp1p (BAI et al., 1996, *supra*).

Ainsi la protéine h- $\beta$ TrCP, par ses motifs WD, est d'une part capable d'interagir 25 avec la protéine Vpu, et d'autre part possède un motif boîte F qui interagit avec la protéine Skp1p et est donc capable de cibler les protéines vers les voies de dégradation par le protéasome.

La protéine h- $\beta$ TrCP possède 569 acides aminés et comprend une boîte F et sept motifs WD dont la position dans la séquence SEQ ID N° 2 est la suivante :

- 30 - boîte F : acides aminés 147-191,  
 - premier motif WD : acides aminés 259-292,  
 - deuxième motif WD : acides aminés 304-332,  
 - troisième motif WD : acides aminés 343-372,  
 - quatrième motif WD : acides aminés 387-415,  
 35 - cinquième motif WD : acides aminés 427-455,  
 - sixième motif WD : acides aminés 467-492,

- septième motif WD : acides aminés 516–544.

On a recherché si la protéine ainsi isolée avait une quelconque homologie avec des protéines déjà connues en utilisant la technique, bien connue de l'homme du métier, d'alignement des séquences selon le programme de MACAW (SCHULER et al., Proteins : structure, function and genetics, 9, 180–190, 1991).

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2 qui montre que la protéine h- $\beta$ TrCP a une homologie :

- de 88% avec la protéine x- $\beta$ TrCP1 de *Xenopus*,
- de 33% avec la protéine Met30p de *Saccharomyces cerevisiae*, inhibiteur de transcription impliqué dans la biosynthèse,
- de 31% avec la protéine Scon2p de *Neurospora crassa*.

La figure 2 montre également l'emplacement de la boîte F et des motifs WD.

### **Exemple 2 : Clonage de l'ADNc de la protéine h- $\beta$ TrCP**

L'ADNc de la protéine h- $\beta$ TrCP ayant la SEQ ID N° 1 a été amplifié par PCR à partir de 2  $\mu$ g d'ADN du plasmide de la banque d'ADNc pGAD en utilisant deux tours d'amplification, le couple externe d'amorces pour le premier tour étant constitué de l'amorce sens A ayant la SEQ ID N° 3 (dans pGAD1318) et de l'amorce antisens B ayant la SEQ ID N° 4 (dans VPB1) et le couple interne d'amorces pour le deuxième tour étant constitué de l'amorce sens C ayant la SEQ ID N° 5 (dans pGAD1318) et de l'amorce antisens D ayant la SEQ ID N° 6 (dans VPB1).

A la suite de cette procédure, on a isolé un fragment de 1,4 kb, souscloné dans le plasmide pGAD-VBP1 sous la forme d'un fragment 5'Spe1–3'BglII, pour reconstituer le clone pGAD-h- $\beta$ TrCP.

Les séquences codant pour VBP1 (résidus d'acides aminés 251 à 569 de la protéine h- $\beta$ TrCP) ou codant pour la protéine h- $\beta$ TrCP entière ont été sousclonées dans les vecteurs pGBT9, pGEX4T2 (Pharmacia) ou pCDNA3 (uniquement pour la protéine h- $\beta$ TrCP) (Invitrogen) en utilisant des procédures standards.

### **Exemple 3 : Interaction spécifique de la protéine Vpu avec la protéine h- $\beta$ TrCP**

Les résultats expérimentaux qui démontrent l'interaction spécifique de la nouvelle protéine humaine h- $\beta$ TrCP avec la protéine Vpu sont illustrés sur la figure 1.

3a- Interaction entre la protéine Vpu et la protéine h-βTrCP par le crible double-hybride décrit précédemment.

La figure 1A démontre l'interaction, par la technique double-hybride, de la région C-terminale de la protéine h-βTrCP (VBP1) issue de la banque d'ADNc de cellules Jurkat (ligne 1) ou de la protéine h-βTrCP entière (ligne 2) fusionnée au domaine d'activation de Gal4, avec le domaine cytoplasmique de Vpu fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ou vice-versa (ligne 5). L'interaction se manifeste par l'activation des deux gènes rapporteurs His3 et LacZ ; le gène His3 permet la pousse des levures en l'absence d'histidine (panneau -His), et le gène LacZ induit la production de β-galactosidase manifestée par la coloration bleue en présence du substrat X-Gal (panneau β-Gal). Cette interaction est spécifique puisqu'elle n'est pas retrouvée entre la protéine Vpu et le vecteur seul (ligne 4), ou entre la protéine h-βTrCP et une autre protéine telle la région cytoplasmique de CD4 (ligne 6). Le panneau + His est un panneau contrôle qui montre que toutes les combinaisons, y compris lorsqu'il n'y a pas d'interaction, poussent en présence d'histidine.

Il faut noter que la protéine h-βTrCP n'interagit pas avec un mutant de la protéine Vpu inactif, Vpuc-2/6 (ligne 3), clone muté sur les deux résidus sérine Ser 52 et Ser 56, qui sont essentiels pour l'activité de Vpu (MARGOTTIN et al, 1996, *supra*). Ce résultat démontre qu'il y a corrélation entre la capacité de Vpu à interagir avec la h-βTrCP et son activité.

3b- Mise en évidence de l'interaction par analyse "Northern Blot".

Par analyse "Northern Blot" d'ARNm de différentes lignées cellulaires humaines en utilisant une sonde 5', on a trouvé que plusieurs ARN messagers (ARNm) hybrident avec une sonde correspondant à h-βTrCP (Fig. 1B). Ces ARNm de tailles respectives 2,4 kb, 3,5 kb et 7 kb, sont retrouvés dans tous les tissus humains testés. Cette multiplicité d'ARNm est réminiscente de la situation décrite par HUDSON et al. (Dev. Genet., 19, 190-198, 1996) pour les ARNm de la βTrCP de *Xenopus*, pour laquelle 3 ARNm différents de tailles respectives voisines de celles trouvées ici pour les ARNm de la h-βTrCP ont été rapportés.

3c- Mise en évidence de l'interaction par analyse "Western Blot".

Des anticorps anti-peptidiques anti-h-βTrCP (Abs) ont été produits chez des lapins par immunisation avec le peptide de synthèse 275-293 correspondant au premier motif WD de la protéine h-βTrCP. Ces anticorps Abs ont été purifiés selon l'affinité par adsorption sur 30 μg de la protéine de fusion GST-VBP1,

exprimée chez *E. Coli* à partir du vecteur pGEX-VBP1 et immobilisée après électrobuvarpage sur une membrane de nitrocellulose. Les anticorps Abs purifiés ont ensuite été élués par l'éluant glycine.HCl, pH 3,0, neutralisés avec du tampon 1M TRIS, pH 8,0, et utilisés pour une analyse, par la technique de Western blot, de l'expression de la protéine h-βTrCP dans les cellules humaines Sup T1 (T1), dans les réticulocytes de lapins (RRL) et dans les lysats de membrane microsomique canine (CMM).

La Figure 1C montre l'expression de la protéine h-βTrCP détectée dans un lysat de cellules T humaines de la lignée Sup T1 (ligne 1), de réticulocytes de lapin de Promega (ligne 3), par la technique "Western blot" en utilisant les anticorps anti-h-βTrCP dirigés contre le peptide 275-293 obtenus précédemment. En revanche aucune protéine correspondant à la h-βTrCP n'a pu être détectée dans des membranes de microsomes de pancréas de chien de Promega (ligne 2). La taille de la protéine h-βTrCP détectée (60 kD) indique que le clone d'ADNc de h-βTrCP que nous avons caractérisé et qui est représenté sur la figure 2 est bien capable de coder pour la protéine h-βTrCP entière.

#### **Exemple 4 : Cartographie des sites d'interaction entre Vpuc et la protéine h-βTrCP**

Les sites d'interaction entre le domaine cytoplasmique de la protéine Vpu (Vpuc) et la protéine h-βTrCP de l'invention ont été déterminés de la façon suivante.

Au niveau de Vpuc, il a été montré que la mutation des sérines aux positions 52 et 56 (clone Vpuc-2/6) abolissait intégralement l'interaction entre Vpu et h-βTrCP.

Au niveau de h-βTrCP, les résultats d'interaction double-hybride avec le domaine cytoplasmique de Vpu et les différents mutants décrits ci-après montrent que l'ensemble des motifs WD et la queue C-terminale sont requis pour une interaction optimale, comme indiqué dans le tableau ci-après.

Les mutants utilisés sont les suivants :

- VPB1-ΔW<sub>1</sub> (clone VPB1 dont le premier domaine WD a été délété ; résidus 292 à 569), qui correspondent à un fragment BglII-Xho1 de VBP1,
- VPB1-ΔW<sub>4-7</sub> (clone VPB1 dont les domaines WD 4 à 7 ont été délétés ; résidus 292 à 396), et
- VPB1-ΔC-ter (clone VPB1 dont la queue C-terminale après le 7<sup>ème</sup> domaine WD a été délétée ; résidus 292 à 545)

par PCR en utilisant respectivement l'amorce sens C, décrite précédemment, et les amorces antisens E et F suivantes dans VBP1.

Amorce E : SEQ ID N° 7

Amorce F : SEQ IND N° 8.

5 Le mutant h-βTrCP-Δ7W (clone h-βTrCP dont les sept domaines WD ont été délétés ; résidus 1 à 291) a été construit en insérant un fragment SpeI-BglII à partir de la protéine h-βTrCP dans le vecteur pGAD1318 et le mutant βTrCPΔF (résidus 32 à 179) a été obtenu par délétion du fragment AvrII-Asp718 de la protéine h-βTrCP avec conservation du cadre de lecture.

10 On a vérifié que l'interaction entre les protéines Vpu et h-βTrCP pouvait avoir lieu *in vitro* par le procédé suivant : les deux protéines ont été introduites dans du lysat de réticulocytes de lapins (RRL). Les complexes Vpu/βTrCP formés *in vitro* ont été identifiés par co-immunoprécipitation en utilisant des anticorps anti-h-βTrCP dirigés contre le peptide 553-569, préparés par le même procédé  
15 que celui utilisé pour obtenir les anticorps anti-h-βTrCP dirigés contre le peptide 275-293.

La figure 3 illustre l'interaction *in vitro* entre les protéines Vpu et h-βTrCP. La ligne 1 montre que la protéine Vpu n'est pas reconnue par l'antisérum anti-h-βTrCP, tandis que la ligne 5 montre qu'elle précipite en présence d'un  
20 antisérum anti-Vpu. La ligne 2 montre que les anticorps anti-h-βTrCP sont capables de coprécipiter la protéine Vpu co-traduite *in vitro* avec la protéine h-βTrCP. La ligne 4 montre que le double mutant de Vpu muté sur les positions Ser52 et Ser56, incapable d'induire la dégradation de CD4, n'interagit pas avec la protéine h-βTrCP, et n'est donc pas coprécipité par des anticorps anti-h-βTrCP,  
25 tandis que les lignes 6 et 7 montrent que ce mutant Vpu<sub>C-2/6</sub> est traduit avec la même efficacité que la protéine Vpu.

TABLEAU

Mutants à délétion de h-βTrCP	Interaction avec Vpuc
h-βTrCP: — [F] — ①②③④⑤⑥⑦ —	+++
VBPI: — ①②③④⑤⑥⑦ —	+++
VBPI-ΔW1: ②③④⑤⑥⑦ —	-
VBPI-ΔC-ter: — ①②③④⑤⑥⑦ —	+
VBPI-ΔW4-7: — ①②③ —	+
h-βTrCP-Δ7W: — [F] —	-

### **Exemple 5 : Interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p**

5 Afin de démontrer que le motif boîte F était bien fonctionnel et pouvait donc effectivement servir au ciblage vers le protéasome par l'intermédiaire de la protéine Skp1p, on a réalisé un crible double-hybride entre le domaine N-terminal de la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p, ce qui a permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

10 La protéine humaine Skp1p décrite dans BAI et al. (1996, *supra*) a été sousclonée dans le vecteur pLex10 pour une analyse d'interaction avec la protéine h- $\beta$ TrCP dans la souche de levure L40 (VOJTEK et al. Cell, 74, 205-214, 1993).

15 La figure 4 illustre les résultats obtenus. La ligne 1 de la figure 4 montre tout d'abord que la protéine h- $\beta$ TrCP interagit avec la protéine Skp1p. La ligne 2 montre que le domaine N-terminal suffit à obtenir l'interaction, alors que la ligne 3 montre que l'absence du domaine N-terminal de la protéine h- $\beta$ TrCP dans VBP1 fait perdre toute interaction avec la protéine Skp1p. Ces résultats sont des arguments supplémentaires importants en faveur d'un rôle de la protéine h- $\beta$ TrCP dans la dégradation médiée par la protéine Vpu du récepteur CD4, et également corroborent les résultats de FUJITA et al. (1997, *supra*) et de SCHUBERT et al. (1997, *supra*) montrant que la dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu devrait avoir lieu dans le protéasome. Il est à noter que le domaine cytoplasmique de CD4 est incapable de se lier directement à la protéine Skp1 (ligne 4).

### **25 Exemple 6 : Modèle du réseau d'interactions impliqué dans la dégradation du récepteur CD4**

La dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu est effectuée par le réseau d'interactions entre la protéine Vpu et le récepteur CD4, entre la protéine Vpu et les motifs WD de la protéine h- $\beta$ TrCP et entre la boîte F de la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p, cette dernière interaction permettant le ciblage du complexe Vpu/CD4 vers le protéasome.

Ce réseau d'interactions est illustré schématiquement sur la figure 5.

C'est par l'intermédiaire d'un tel réseau d'interactions que la dégradation du récepteur CD4 par le protéasome via la protéine Vpu est provoquée.

35 La dégradation du récepteur CD4 permet la libération de la protéine d'enveloppe Gp160 et donc la libération du virus HIV-1 infectieux.

Un des moyens pour empêcher le développement du virus HIV-1 chez le patient atteint consiste donc à empêcher la dégradation du récepteur CD4. Un des moyens pour empêcher cette dégradation au vu du procédé de dégradation ci-dessus consiste à rechercher des inhibiteurs, ou agents antiviraux anti-HIV, 5 inhibant l'interaction soit entre la protéine Vpu et la protéine h- $\beta$ TrCP, soit entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p par les procédés décrits précédemment.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSERM
- (B) RUE: 101, Rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654 Cédex13

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Protéine humaine  $\beta$ TrCP de ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2151 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 70..1776

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TGCGTTGGCT GCGGCCTGGC ACCAAAGGGG CGGCCCGGC GGAGAGCGGA CCCAGTGGCC	60
TCGGCGATT ATG GAC CCG GCC GAG GCG GTG CTG CAA GAG AAG GCA CTC	108
Met Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu	
1 5 10	
AAG TTT ATG AAT TCC TCA GAG AGA GAA GAC TGT AAT AAT GGC GAA CCC	156
Lys Phe Met Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro	
15 20 25	
CCT AGG AAG ATA ATA CCA GAG AAG AAT TCA CTT AGA CAG ACA TAC AAC	204
Pro Arg Lys Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn	
30 35 40 45	
AGC TGT GCC AGA CTC TGC TTA AAC CAA GAA ACA GTA TGT TTA GCA AGC	252
Ser Cys Ala Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser	
50 55 60	
ACT GCT ATG AAG ACT GAG AAT TGT GTG GCC AAA ACA AAA CTT GCC AAT	300
Thr Ala Met Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys Leu Ala Asn	
65 70 75	

GGC ACT TCC AGT ATG ATT GTG CCC AAG CAA CGG AAA CTC TCA GCA AGC	348
Gly Thr Ser Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser	
80 85 90	
TAT GAA AAG GAA AAG GAA CTG TGT GTC AAA TAC TTT GAG CAG TGG TCA	396
Tyr Glu Lys Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser	
95 100 105	
GAG TCA GAT CAA GTG GAA TTT GTG GAA CAT CTT ATA TCC CAA ATG TGT	444
Glu Ser Asp Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys	
110 115 120 125	
CAT TAC CAA CAT GGG CAC ATA AAC TCG TAT CTT AAA CCT ATG TTG CAG	492
His Tyr Gln His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln	
130 135 140	
AGA GAT TTC ATA ACT GCT CTG CCA GCT CGG GGA TTG GAT CAT ATC GCT	540
Arg Asp Phe Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala	
145 150 155	
GAG AAC ATT CTG TCA TAC CTG GAT GCC AAA TCA CTA TGT GCT GCT GAA	588
Glu Asn Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu	
160 165 170	
CTT GTG TGC AAG GAA TGG TAC CGA GTG ACC TCT GAT GGC ATG CTG TGG	636
Leu Val Cys Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp	
175 180 185	
AAG AAG CTT ATC GAG AGA ATG GTC AGG ACA GAT TCT CTG TGG AGA GGC	684
Lys Lys Leu Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly	
190 195 200 205	
CTG GCA GAA CGA AGA GGA TGG GGA CAG TAT TTA TTC AAA AAC AAA CCT	732
Leu Ala Glu Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro	
210 215 220	
CCT GAC GGG AAT GCT CCT CCC AAC TCT TTT TAT AGA GCA CTT TAT CCT	780
Pro Asp Gly Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro	
225 230 235	
AAA ATT ATA CAA GAC ATT GAG ACA ATA GAA TCT AAT TGG AGA TGT GGA	828
Lys Ile Ile Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly	
240 245 250	
AGA CAT AGT TTA CAG AGA ATT CAC TGC CGA AGT GAA ACA AGC AAA GGA	876
Arg His Ser Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly	
255 260 265	
GTT TAC TGT TTA CAG TAT GAT GAT CAG AAA ATA GTA AGC GGC CTT CGA	924
Val Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg	
270 275 280 285	
GAC AAC ACA ATC AAG ATC TGG GAT AAA AAC ACA TTG GAA TGC AAG CGA	972
Asp Asn Thr Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg	
290 295 300	
ATT CTC ACA GGC CAT ACA GGT TCA GTC CTC TGT CTC CAG TAT GAT GAG	1020
Ile Leu Thr Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu	
305 310 315	
AGA GTG ATC ATA ACA GGA TCA TCG GAT TCC ACG GTC AGA GTG TGG GAT	1068
Arg Val Ile Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp	
320 325 330	

GTA AAT ACA GGT GAA ATG CTA AAC ACG TTG ATT CAC CAT TGT GAA GCA	1116
Val Asn Thr Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala	
335 340 345	
GTT CTG CAC TTG CGT TTC AAT AAT GGC ATG ATG GTG ACC TGC TCC AAA	1164
Val Leu His Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys	
350 355 360 365	
GAT CGT TCC ATT GCT GTA TGG GAT ATG GCC TCC CCA ACT GAC ATT ACC	1212
Asp Arg Ser Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr	
370 375 380	
CTC CGG AGG GTG CTG GTC GGA CAC CGA GCT GCT GTC AAT GTT GTA GAC	1260
Leu Arg Arg Val Leu Val Gly His Arg Ala Val Asn Val Val Asp	
385 390 395	
TTT GAT GAC AAG TAC ATT GTT TCT GCA TCT GGG GAT AGA ACT ATA AAG	1308
Phe Asp Asp Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys	
400 405 410	
GTA TGG AAC ACA AGT ACT TGT GAA TTT GTA AGG ACC TTA AAT GGA CAC	1356
Val Trp Asn Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His	
415 420 425	
AAA CGA GGC ATT GCC TGT TTG CAG TAC AGG GAC AGG CTG GTA GTG AGT	1404
Lys Arg Gly Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser	
430 435 440 445	
GGC TCA TCT GAC AAC ACT ATC AGA TTA TGG GAC ATA GAA TGT GGT GCA	1452
Gly Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala	
450 455 460	
TGT TTA CGA GTG TTA GAA GGC CAT GAG GAA TTG GTG CGT TGT ATT CGA	1500
Cys Leu Arg Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg	
465 470 475	
TTT GAT AAC AAG AGG ATA GTC AGT GGG GCC TAT GAT GGA AAA ATT AAA	1548
Phe Asp Asn Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys	
480 485 490	
GTG TGG GAT CTT GTG GCT GCT TTG GAC CCC CGT GCT CCT GCA GGG ACA	1596
Val Trp Asp Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr	
495 500 505	
CTC TGT CTA CGG ACC CTT GTG GAG CAT TCC GGA AGA GTT TTT CGA CTA	1644
Leu Cys Leu Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu	
510 515 520 525	
CAG TTT GAT GAA TTC CAG ATT GTC AGT AGT TCA CAT GAT GAC ACA ATC	1692
Gln Phe Asp Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser Ser His Asp Asp Thr Ile	
530 535 540	
CTC ATC TGG GAC TTC CTA AAT GAT CCA GCT GCC CAA GCT GAA CCC CCC	1740
Leu Ile Trp Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro	
545 550 555	
CGT TCC CCT TCT CGA ACA TAC ACC TAC ATC TCC AGA TAAATAACCA	1786
Arg Ser Pro Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg	
560 565	
TACACTGACC TCATACTTGC CCAGGACCCA TTAAAGTTGC GGTATTTAAC GTATCTGCCA	1846
ATACCAGGAT GAGCAACAAC AGTAACAATC AACTACTGC CCAGTTTCCC TGGACTAGCC	1906

GAGGAGCAGG GCTTTGAGAC TCCTGTTGGG ACACAGTTGG TCTGCAGTCG GCCCAGGACG 1966  
 GTCTACTCAG CACAACCTGAC TGCTTCAGTG CTGCTATCAG AAGATGTCTT CTATCAATTG 2026  
 TGAATGATTG GAACTTTTAA ACCTCCCCTC CTCTCCTCCT TTCACCTCTG CACCTAGTTT 2086  
 TTTCCCATTTG GTTCCAGACA AAGGTGACTT ATAAATATAT TTAGTGTTTT GCCAGAAAAA 2146  
 AAAAA 2151

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 569 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu Lys Phe Met  
 1 5 10 15  
 Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro Pro Arg Lys  
 20 25 30  
 Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn Ser Cys Ala  
 35 40 45  
 Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser Thr Ala Met  
 50 55 60  
 Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys Leu Ala Asn Gly Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser Tyr Glu Lys  
 85 90 95  
 Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser Glu Ser Asp  
 100 105 110  
 Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys His Tyr Gln  
 115 120 125  
 His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln Arg Asp Phe  
 130 135 140  
 Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala Glu Asn Ile  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu Leu Val Cys  
 165 170 175  
 Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp Lys Lys Leu  
 180 185 190  
 Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly Leu Ala Glu  
 195 200 205  
 Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro Pro Asp Gly  
 210 215 220

Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro Lys Ile Ile  
 225 230 235 240  
 Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly Arg His Ser  
 245 250 255  
 Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly Val Tyr Cys  
 260 265 270  
 Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg Asp Asn Thr  
 275 280 285  
 Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg Ile Leu Thr  
 290 295 300  
 Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Arg Val Ile  
 305 310 315 320  
 Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp Val Asn Thr  
 325 330 335  
 Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala Val Leu His  
 340 345 350  
 Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys Asp Arg Ser  
 355 360 365  
 Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr Leu Arg Arg  
 370 375 380  
 Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp Phe Asp Asp  
 385 390 395 400  
 Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys Val Trp Asn  
 405 410 415  
 Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His Lys Arg Gly  
 420 425 430  
 Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser Gly Ser Ser  
 435 440 445  
 Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala Cys Leu Arg  
 450 455 460  
 Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg Phe Asp Asn  
 465 470 475 480  
 Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys Val Trp Asp  
 485 490 495  
 Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr Leu Cys Leu  
 500 505 510  
 Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu Gln Phe Asp  
 515 520 525  
 Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser Ser His Asp Asp Thr Ile Leu Ile Trp  
 530 535 540  
 Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro Arg Ser Pro  
 545 550 555 560

Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg  
565

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 19 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCAAACTGCG TATAACGCG

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGTGAATCAA CGTGTTTAGC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGATGATGTA TATAACTATC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 25 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

TTTATCCCAG ATCTTGATTG TGTTG

25

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CCAGGATCCT TATACAACAT TGACAGCAGC

30

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CCAGGATCCT TAGTCCCAGA TGAGGATTG

29

## REVENDICATIONS

1. Protéine humaine  $\beta$ TrCP (h- $\beta$ TrCP) de ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome, caractérisée en ce qu'elle a la SEQ ID No.2.

2. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est capable d'interagir avec la protéine Vpu du virus HIV-1 et avec la protéine cellulaire Skp1p.

3. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comporte les motifs ci-après :

- boîte F : acides aminés 147-191,
- premier motif WD : acides aminés 259-292,
- deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
- troisième motif WD : acides aminés 343-372,
- 15 - quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
- cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
- sixième motif WD : acides aminés 467-492,
- septième motif WD : acides aminés 516-544.

4. Fragments peptidiques de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, lesdits fragments peptidiques ayant conservé l'activité d'interaction avec la protéine Vpu du virus HIV-1 et/ou avec la protéine Skp1p.

5. Séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine humaine h- $\beta$ Trcp et les fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est constituée par :

- a) la séquence d'ADN SEQ ID No.1 et des fragments d'acides nucléiques codant pour lesdits fragments peptidiques ;
- b) les séquences d'ADN hybridant dans des conditions strictes avec les séquences ci-dessus ou un de ses fragments ;
- 30 c) les séquences d'ADN qui, en raison de la dégénérescence du code génétique, résultent des séquences a) et b) ci-dessus et codent pour la protéine humaine h- $\beta$ Trcp ou les fragments de celle-ci ; et
- d) les séquences d'ARNm et d'ADN correspondantes.

35 6. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour le criblage d'agents antiviraux

anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Vpu.

7. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

8. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 5 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Vpu.

9. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 5 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

10. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour le criblage d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par inhibition ou activation de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

11. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 5, pour le criblage d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par inhibition ou activation de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

12. Agents antiviraux anti-HIV qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 4 dénués de la boîte F.

13. Agents antiviraux anti-HIV qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 4 dénués des motifs WD.

14. Anticorps dirigés contre la protéine h- $\beta$ TrCP ou les fragments peptidiques tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 4.

15. Oligonucléotides antisens bloquant la transcription ou la traduction de la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 qui s'hybrident avec une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 5.

16. Agents antitumoraux qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 4, qui possèdent la boîte F.

17. Animaux transgéniques exprimant un transgène de la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

18. Animaux transgéniques dans lesquels le gène  $\beta$ TrCP a été invalidé.

19. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 5 et les moyens nécessaires à son expression.

5        20. Microorganismes ou cellules hôtes transformés par un vecteur d'expression selon la revendication 19.

21. Microorganismes ou cellules hôtes co-transformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine Vpu et un vecteur d'expression selon la revendication 19.

10       22. Microorganismes ou cellules hôtes co-transformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine Skp1p et un vecteur d'expression selon la revendication 19.

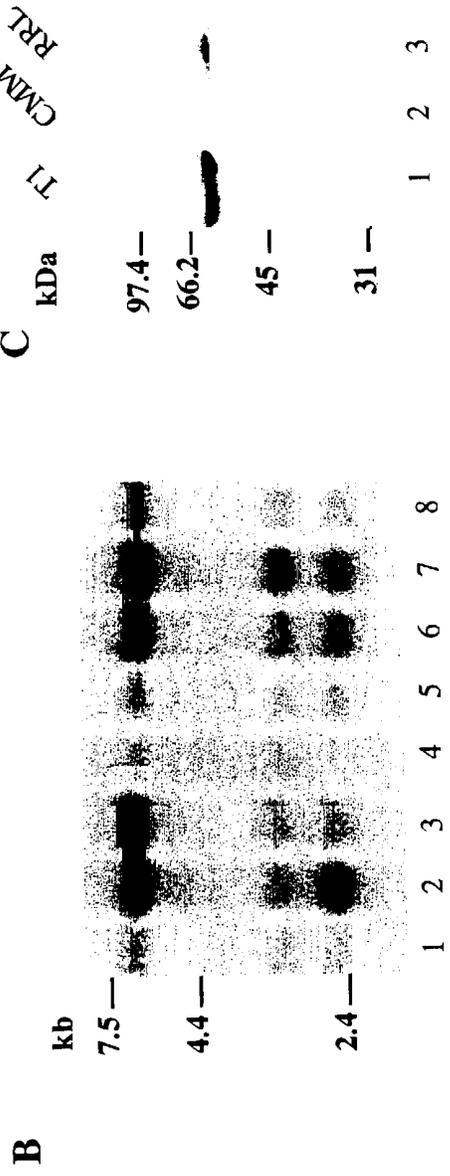
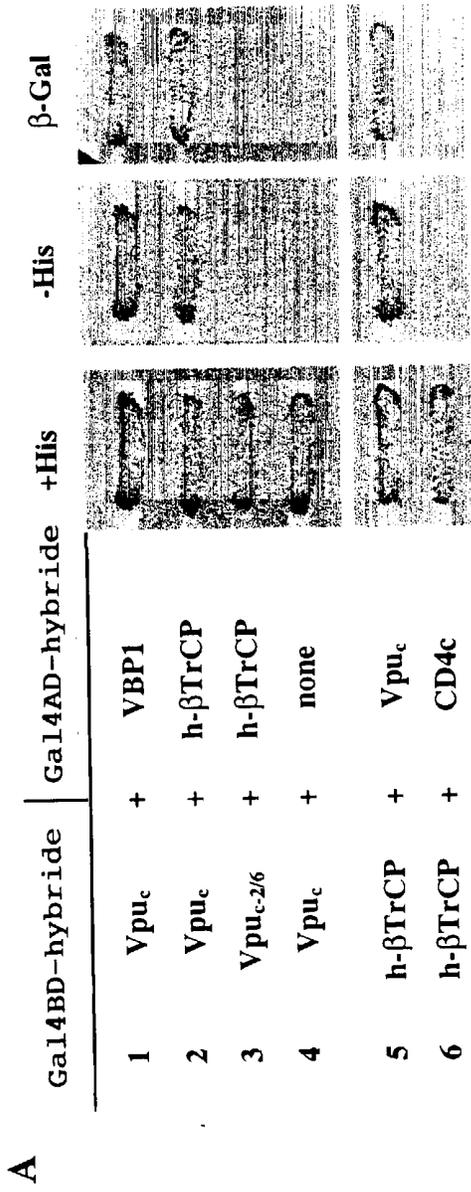


Figure 1

MOPAEAVLQEKALKFMN-----SSEREDCNNGEPPRKI	33	
MEGFSCSLQPPT-----ASEREDCNRDEPPRKI	28	
MRRERQRMSFEDKDKDDLNSNSNSNSEMTDTAMMPPLKRLLITGSSDILAQGSQGGKKK	60	
MSSVLMSKTVTPFLREHIPSIIYAPIGKPGNQETARAENPN-----	40	
* ***** *		
TPKNSLRQTYNSCARLCLNQETVCLASTAMKTENCVAKTKLANGTSSMIVPKQR----	88	
ITE-----KNTLRQTKLANGTSSMIVPKQR----	53	
ITMATRSPSSSPDLATNDSGTRVQPLPEYNFTKFCYRHNPDIQFSPTHACYKQDLKRTQ	120	
-----SKYCYRHHPD-----SKCRRADKAKMV	63	
* * * * *		
-----KLSASYEKEKELCVKYFEQWSESDQVEFVEHLISQMCH	126	
-----KLSANYEKEKELCVKYFEQWSECDQVEFVEHLISRMCH	91	
EINANIAKPLPQEQSDIHHIISKYNSNDKIRKILLDGLLSTSCFPOLSYISSLVTHM--	178	
MIQSELDKLTSAQQAVTHVWSLFSAPARHRDMLQGLLSQLCFPOLSEFVSREVNEA--	121	
* F-BOX *		
YQGHGINSYLKPMQLQDFITALPARGLDHIAENILSYLDAKSLCAELVCKEYRVVTSDG	186	
YQGHGINTYKPMQLQDFITALPARGLDHIAENILSYLDAKSLCSAELVCKEYRVVTSDG	151	
-----IKIDFTSILPQE-----LSLKLKLSYLDCCSILCNATRVCRKWQKLADD	221	
-----LKI DFTSALFVE-----LAQKVLCTYLDVSLTKBAQVSQRVTLADSD	164	
* * * * *		
MLWKKLIERMVRTDSLWRGLAERRGWCQYLFKNKPPDGNAPPNSFYRALYPKIIQDIET-	245	
MLWKKLIERMVRTDSLWRGLAERRGWCQYLFKNKPPDGKTPPNSFYRALYPKIIQDIET-	210	
RVVYHMCQEH-----DRKCPNCWGLPPLHMR--RARIQQNSTGSSSNADIQTQT---	270	
AVVVRMCQEHV-----NRKCTKCGWGLPPLERKLRNYTRORQLAKGGPQGRVTELAS	218	
-----IES	248	
-----IES	213	
-----TRPWKVIYRERFKVES	286	
HDSQDRSVNQHGKRPAAEAEEDPIKKRQCMAAAEASKAVTQPKTRSWKAVYRDRWQVSY	278	
* * * * *		
WD-1		
NWRGGRHSLORTHCRSETSKGVYCLQYDDQKIVSGLRDNTEKIKWDKNTLECKRILIGHTG	308	
NWRGGRHSLORTHCRSETSKGVYCLQYDDQKIVSGLRDNTEKIKWDKNTLECKRILMCHTG	273	
NWRKGHCRIQEFKGHMD---GVLTLQFNRYRLFTGSYDSTICLWDLFTGKLIIRRLSGHSD	343	
NWRNSRYKESVLKGHEN---GVTCLQDDNILEATGSYDITIKIWNIELECKIRTLVGHIA	335	
* * * * *		
WD-2		
SVLCLQYDERVITGSSDSTVVRVWDVNTGEMLNLIHCEAVLHLRENNGMMVTCCKORS	368	
SVLCLQYDERVITGSSDSTVVRVWDVNTGEMLNLIHCEAVLHLRENNGMMVTCCKORS	333	
GVKTLVYFDDKRLITGSLDKTRVWNYITGECISYRGHSDSVLSVDSYQKVIUSGSADKT	403	
GIRALQFDDSKLISGSLDHTIKVMNWHGECLSFAHTDSVLSVHEDGHLLASGSSDKT	395	
* * * * *		
WD-4		
IAVNDMASPTDITLRRVVLGHRAAVNVVDFDDKYIVSASGDRITIKVWNTSTCEFVRLN-	427	
IAVNDMASADITLRRVVLGHRAAVNVVDFDDKYIVSASGDRITIKVWNTSTCEFVRLN-	392	
VKVVHVESRVCYLRGHTIEWVNCVK--LHPKSFSCFSCSDDTITRMIDLIRNSCLKVFRG	461	
VKIFLNSKETYCLKXGSDVWNSTH--VDIKSRTVFSASDITIKLWDLDRQVIRTYEG	453	
-----	427	
-----	392	
HVGQVQKI IPLTIKDVE-----NLATDNTSDG	488	
HVGHVQVLIILPPEYEPDEEVLNGASQDNQDAMSVSSGGSGSPMSHAQIERAGSPGSHS	513	
* * * * *		
WD-5		
-----GHKRGIAQLQVDRDLVVSGSSDNTIIRLWDLIECGACLRV	465	
-----GHKRGIAQLQVDRDLVVSGSSDNTIIRLWDLIECGACLRV	430	
SSPQDDPTMTDGADESPTPSNEQETVLDENIPYPTH-LLSCGLDNTIKLWDLVKTGKCIPT	547	
SSHNLLPSSLPAGEDVRLHYGSFAVADESRLPPRYFMTGGLDSTMRLWDSATGRCLRT	573	
* * * * *		
WD-6		
LEGHLELVRCIRFDNKRIVSGAYDGGKIKVWDLVAALDPRAPACTLCLRTLVEHSGRVFRL	525	
LEGHLELVRCIRFDNKRIVSGAYDGGKIKVWDLVAALDPRAPACTLCLRTLVEHSGRVFRL	490	
QFGHVEGVWDIAADNFRITSCSHDGSIKVWDLQSGKCMHTFNERRLORETQHTQTQSLGD	607	
LEGHLEGVWDLAADNFRITIRVIVSGANDGMVKTWEPRSGKCDATYTGHC-----	619	
* * * * *		
WD-7		
QFDEFQIVSSSHDDTILIWDLNDPAAQAEPPRSPSRITYYISR●	569	h-βTrCP
QFDEFQIVSSSHDDTILIWDLNDPGLA●	518	x-βTrCP1
KVAPIACVCIGDSECFSGDEGCVKMYKFDLND●	640	MET30
---PVTGVGLSDSLMAGSSEDGRTIRLHSFKPCRQ●	650	SCON2

Figure 2

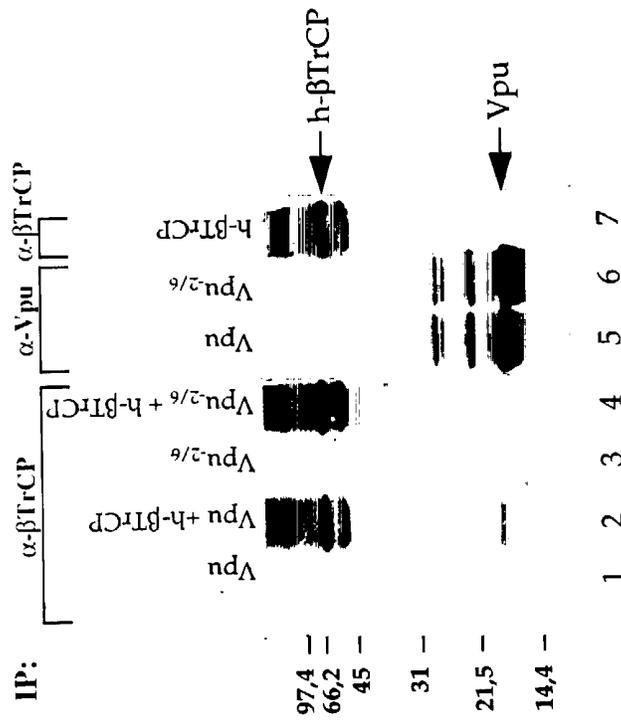


Fig 3

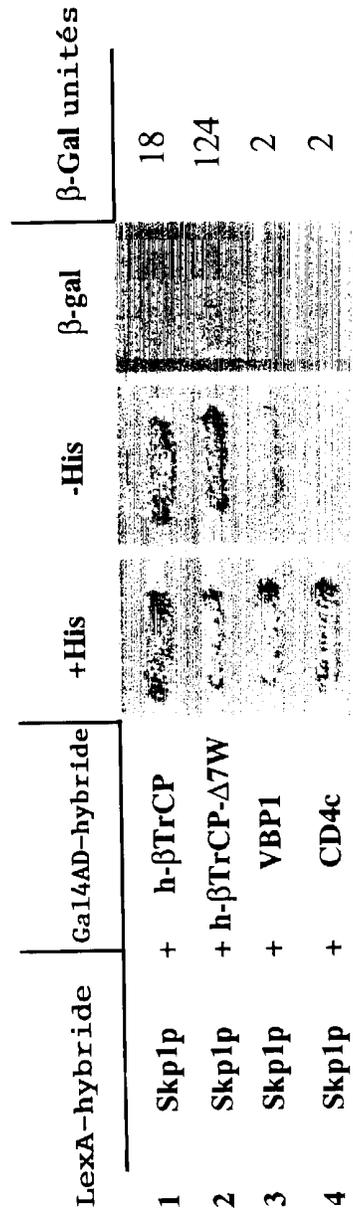


Figure 4

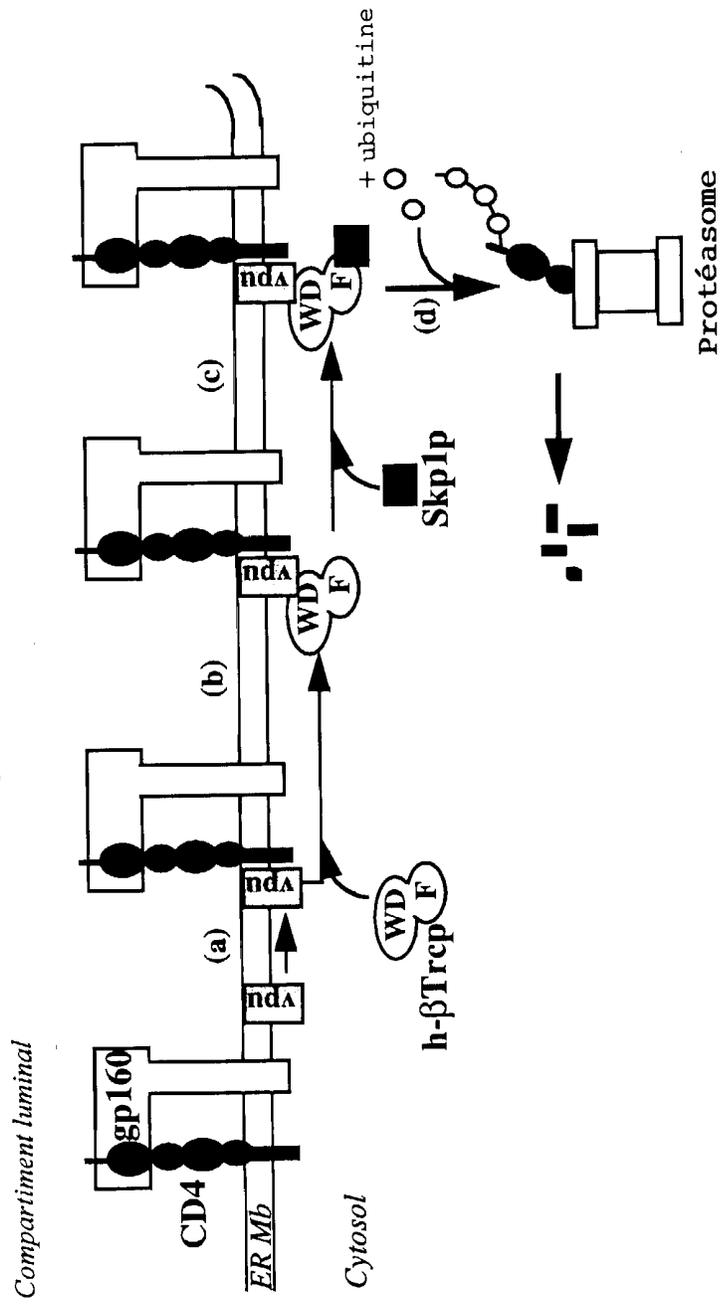


Figure 5

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 552886  
FR 9801100

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 95 21252 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 10 août 1995 * page 1 - page 5 * * page 19 - page 27 * * page 80 - page 82 *	1-5
Y	---	6-22
X	HUDSON J.W. ET AL.: "Beta-transducin repeat containing protein-3" EMBL SEQUENCE DATABASE, 1 février 1997, XP002082116 HEIDELBERG DE Accession Nr.: P70038 * abrégé *	4,5
D,Y	MARGOTTIN F ET AL.: "Interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: Role of Vpu residues involved in CD4 interaction and in vitro CD4 degradation" VIROLOGY., vol. 223, 1996, pages 381-386, XP002082117 RLANDO US * abrégé *	6-22
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9629 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 96-283507 XP002082120 & JP 08 11996 A (JAPAN TOBACCO INC) , 14 mai 1996 * abrégé *	1,10-13, 16,19,20
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
27 octobre 1998		De Kok, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03 82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 552886  
FR 9801100

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	BAI C ET AL.: "SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box" CELL, vol. 86, no. 2, 26 juillet 1996, pages 263-274, XP002082118 NA US * abrégé *	2-4,7,9, 12,16
A	NEER E.J. ET AL.: "The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins" NATURE., vol. 371, 22 septembre 1994, pages 297-300, XP002082119 LONDON GB * le document en entier *	1-5
A	EP 0 342 860 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 23 novembre 1989 * le document en entier *	21
T	PATTON E E ET AL: "Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis" TRENDS IN GENETICS, vol. 14, no. 6, juin 1998, page 236-243 XP004121083 * page 241, colonne 1, dernier alinéa *	1-22
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
27 octobre 1998		De Kok, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant

1  
EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)