

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 504067**

( P2003 - 504067A )

(43)公表日 平成15年2月4日 (2003.2.4)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ド* ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		35/76	4 B 0 2 4
35/76		39/00	H 4 B 0 5 0
38/46		39/395	E 4 B 0 6 3
39/00			T 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 76数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 509530(P2001 - 509530)

(86) (22)出願日 平成12年7月3日 (2000.7.3)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月8日 (2002.1.8)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/06609

(87)国際公開番号 W001/004326

(87)国際公開日 平成13年1月18日 (2001.1.18)

(31)優先権主張番号 09/350,982

(32)優先日 平成11年7月9日 (1999.7.9)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 ファルマシア・エ・アツプジヨン・エツセ  
・ピー・アー

イタリア国、20152・ミラン、ピア・ロベルト・コツク、1.2.

(72)発明者 ベルテルセン、イエンズ

イタリア国、イ - 20135・ミラン、ピア・パンヌッチ、211

(72)発明者 トーマ、サルバトーレ

イタリア国、イ - 20146・ミラノ、ピアレ  
・カテリーナ・デ・フォルリ、4

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 ( 外 5 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンキラーゼホモログタンパク質 ( T H P )、核酸およびそれらに関連した方法

(57)【要約】

本発明は、ヒトタンキラーゼタンパク質 ( T H P ) のヒトポリペプチドホモログ、および T H P を同定しコードするポリヌクレオチドを提供する。また、本発明は、発現ベクター、宿主細胞およびその製造方法を提供する。本発明はまた、ヒトの疾患、例えばヒトの癌および加齢関連疾患の治療に有用な T H P アゴニスト / アンタゴニストの同定方法を提供する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 a) 配列番号3またはその断片、  
b) 配列番号4またはその断片、  
c) 配列番号3もしくは配列番号4またはそれらの断片に相同な配列、  
d) 配列番号5またはその断片を含むポリペプチドをコードする配列、  
e) 配列番号5またはその断片に相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列

から選ばれるヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子であって、

該核酸分子がタンキラーゼホモログタンパク質の少なくとも一部をコードすることを特徴とする核酸分子。

【請求項2】 DNAである、請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】 RNAである、請求項1記載の核酸分子。

【請求項4】 該ヌクレオチド配列が配列番号4を含む、請求項2記載の核酸分子。

【請求項5】 配列番号3または配列番号4の少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子であって、該核酸分子の相補体がタンキラーゼホモログタンパク質の少なくとも一部をコードすることを特徴とする核酸分子。

【請求項6】 配列番号3または配列番号4に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項5記載の核酸分子。

【請求項7】 該オリゴヌクレオチドが配列番号3または配列番号4の調節領域に対するものである、請求項6記載の核酸分子。

【請求項8】 治療または診断における使用のための、前記請求項のいずれか1項記載の核酸分子。

【請求項9】 前記請求項のいずれか1項記載の核酸分子を含んでなる発現ベクター。

【請求項10】 プラスミドまたはウイルス粒子である、請求項9記載のベクター。

【請求項11】 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、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスから選ばれる、請求項10記載のベクター。

【請求項12】 該核酸分子が、シミアンウイルス40、マウス乳癌ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスの長末端反復配列、モロニーウイルス、サイトメガロウイルス前初期プロモーター、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、ヒトヘモグロブリン、ヒト筋クレアチンおよびヒトメタロチオネインから選ばれるプロモーターに作動的に結合している、請求項9～11のいずれか1項記載のベクター。

【請求項13】 治療または診断における使用のための、請求項8～12のいずれか1項記載のベクター。

【請求項14】 請求項9～12のいずれか1項記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項15】 細菌細胞、例えば大腸菌 (*E. coli*) である、請求項14記載の宿主細胞。

【請求項16】 酵母、例えばエス・セレビスイエ (*S. cerevisiae*) である、請求項14記載の宿主細胞。

【請求項17】 昆虫細胞、例えばエス・フルジペルダ (*S. frugiperda*) である、請求項14記載の宿主細胞。

【請求項18】 例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、アフリカミドリザル腎細胞、ヒト293細胞およびマウス3T3繊維芽細胞から選ばれる哺乳類細胞である、請求項14記載の宿主細胞。

【請求項19】 請求項1～8のいずれか1項記載の核酸分子にコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項20】 配列番号5を含む、請求項19記載のポリペプチド。

【請求項21】 配列番号5に相同なアミノ酸配列を含む、請求項19記載のポリペプチド。

【請求項22】 配列番号5と比較して少なくとも1つの同類アミノ酸置換を含む、請求項21記載のポリペプチド。

【請求項23】 配列番号5の断片を含む、請求項19記載のポリペプチド

。

【請求項24】 治療または診断における使用のための、請求項19～23のいずれか1項記載のポリペプチド。

【請求項25】 該ポリペプチドに対する免疫応答を誘導するための医薬の製造のための、請求項19～23のいずれか1項記載のポリペプチドの使用。

【請求項26】 配列番号5またはそのホモログもしくは断片を含むポリペプチドの製造方法であって、

a) 請求項9～12のいずれか1項記載のベクターを和合性宿主細胞内に導入し、

b) 該ポリペプチドの発現のための条件下で該宿主細胞を培養し、

c) 該ポリペプチドを回収する工程を含んでなる製造方法。

【請求項27】 該宿主細胞を細胞溶解し、該ポリペプチドを該ライセートから回収する、請求項25記載の製造方法。

【請求項28】 該宿主細胞を細胞溶解することなく該培地を精製することにより、該ポリペプチドを回収する、請求項26記載の製造方法。

【請求項29】 請求項19～23のいずれか1項記載の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。

【請求項30】 モノクローナル抗体である、請求項29記載の抗体。

【請求項31】 治療または診断における使用のための、請求項29または請求項30記載の抗体。

【請求項32】 請求項19～23のいずれか1項記載のポリペプチドに結合する抗体と陰性対照抗体とを含んでなるキット。

【請求項33】 タンキラーゼホモログタンパク質 (THP) に結合する化合物の同定方法であって、THPを化合物と接触させ、該化合物がTHPに結合するか否かを判定することを含んでなる方法。

【請求項34】 該判定が、例えばゲルシフトアッセイ、ウエスタンブロット、放射能標識競合アッセイ、ファージに基づく発現クローニング、クロマトグラフィーによる共分画、共沈、架橋、相互作用トラップ/ツーハイブリッド分析、サウスウエスタン分析およびELISAから選ばれるタンパク質結合アッセイ

を含む、請求項33記載の方法。

【請求項35】 タンキラーゼホモログタンパク質（THP）をコードする核酸分子に結合する化合物の同定方法であって、THPをコードする核酸分子を化合物と接触させ、該化合物が該核酸分子に結合するか否かを判定することを含んでなる方法。

【請求項36】 該判定がゲルシフトアッセイを含む、請求項35記載の方法。

【請求項37】 タンキラーゼホモログタンパク質（THP）の活性を調節する化合物の同定方法であって、THPを化合物と接触させ、THP活性が調節されているか否かを判定することを含んでなる方法。

【請求項38】 該活性がADPリボシル化またはTRF1結合である、請求項37記載の方法。

【請求項39】 請求項34～38のいずれか1項記載の方法により同定された化合物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、1つには、タンキラーゼ(tankyrase)ホモログタンパク質(THP)をコードする核酸分子、新規THPポリペプチド、およびTHPに結合する及び/又はTHPの活性を調節する化合物をスクリーニングするためのアッセイに関する。

**【0002】****(発明の背景)**

テロメアは、真核生物染色体の物理的末端であり、酵母からヒトまでのすべてのテロメアDNAに特徴的な短い反復ヌクレオチド配列からなる(例えば、Harleyら、Curr. Opin. Genet. Dev., 1995, 5, 249を参照されたい)。DNAポリメラーゼはDNAの最末端を複製することができないため、テロメアは染色体の完全性に必須である(例えば、Lundbladら、Cell, 1996, 87, 369を参照されたい)。この複製欠損は、各細胞周期で次第に短縮されるテロメアに影響を及ぼし、それが限界の長さに達したとき、細胞は死亡する(例えば、Goldstein, Science, 1990, 249, 1129を参照されたい)。いくつかの細胞においては、テロメア長は、特徴的なテロメア反復配列を付加する「テロメラーゼ」と称されるリボ核タンパク質逆転写酵素により維持される(Greiderら、Cell, 1985, 43, 405)。テロメラーゼはほとんどの体細胞内では発現されないため、これらの細胞は有限の寿命を有する。広範な腫瘍における包括的な研究は、すべての腫瘍細胞の85~95%がテロメラーゼを発現することを示している(例えば、Shayら、Eur. J. Cancer, 1997, 33, 787を参照されたい)。テロメラーゼ発現は腫瘍進行の初期事象であり、しばしば、前癌性段階で存在する。テロメラーゼ発現だけでは腫瘍形成に十分ではないが、それは、腫瘍の成長を継続させるための必須の許容事象であると考えられる。

**【0003】**

テロメラーゼに加えて、テロメアリピート結合因子1(TRF1)と称される

もう一つのタンパク質が、テロメア長を調節しうるものとして同定されており、TRF1は二本鎖テロメア反復配列に二量体として結合する(Chongら、Science、1995、270、1663)。テロメラーゼ発現細胞系内でのTRF1の過剰発現によって進行性のテロメアの短縮化が起こり、一方、TRF1の阻害によってテロメア長が増加する(van Steensellら、Nature、1997、385、740)。TRF1はテロメラーゼ自体の発現を制御しないが、むしろ、テロメラーゼの作用をテロメア末端で阻害することにより作用すると考えられている(Smithら、Science、1998、282、1484)。

#### 【0004】

テロメアDNAへのTRF1の結合能は、タンキラーゼと称される酵素(これはADPリボシル化によりTRF1を共有結合的に修飾する)の作用で修飾されることにより阻害されうる(Smithら、Science、1998、282、1484)。タンキラーゼは、4つの異なるドメインの存在により特徴づけられ本明細書においては該ポリペプチドのNH<sub>2</sub>-末端からカルボキシ末端への方にHPS、ANK、SAMおよびPARPの順序で挙げられるマルチドメインタンパク質である。HPSドメインは、His、ProおよびSerのホモ重合鎖を含有する領域であり、未知の機能を有する。ANKドメインは、アンキリン内に見出される33アミノ酸のANKモチーフの24個の反復単位を含有する。このドメインは、TRF1へのタンキラーゼの結合を引き起こす。SAMドメイン(不稔(sterile)アルファモジュール)の機能は未知であるが、タンパク質-タンパク質相互作用を引き起こすと考えられている。C末端の触媒活性領域はヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)酵素の活性領域とに相同である。PARPは、NAD<sup>+</sup>を基質として相当するタンパク質受容体上へポリ(ADP-リボース)の形成を触媒する。本発明は、ヒトタンキラーゼに対して少なくとも1つの機能的相同性を示す本発明でTHPと称される新規ポリペプチドと、例えばテロメラーゼ活性およびそれによるテロメア長の調節の手がかりとなる成分としての役割との驚くべき知見よりなる。したがって、THPは、テロメア長および/またはテロメアの維持を修飾および/または制御しうる

新規抗腫瘍剤の探索に有用である。本発明のこれら及び他の態様を以下に説明する。

【0005】

(発明の概要)

本発明は、1つには、配列番号3またはその断片、配列番号4またはその断片、配列番号3または配列番号4の少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列、配列番号3または配列番号4またはそれらの断片に相同なヌクレオチド配列、配列番号5またはその断片を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または配列番号5またはその断片に相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチドを含んでなる単離された核酸分子に関する。

【0006】

本発明はまた、前記核酸分子のいずれかを含んでなる組換え発現ベクターに関する。

【0007】

本発明はまた、前記核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【0008】

本発明はまた、配列番号5またはそのホモログもしくは断片を含むポリペプチドの製造方法であって、前記核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターを和合性宿主細胞内に導入し、該ポリペプチドの発現のための条件下で該宿主細胞を培養し、該ポリペプチドを該宿主細胞から回収することによる製造方法に関する。

【0009】

本発明はまた、前記核酸分子のいずれかと許容される担体または希釈剤とを含んでなる組成物に関する。

【0010】

本発明はまた、前記核酸分子のいずれかにコードされる単離されたポリペプチドに関する。

【0011】

本発明はまた、前記核酸分子のいずれかにコードされるポリペプチドと許容される担体または希釈剤とを含んでなる組成物に関する。

【0012】

本発明はまた、前記核酸分子のいずれかに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。

【0013】

本発明はまた、前記核酸分子のいずれかにコードされるポリペプチドに結合する抗体と陰性対照抗体とを含んでなるキットに関する。

【0014】

本発明はまた、前記核酸分子のいずれかにコードされるポリペプチドに対して哺乳動物において免疫応答を誘導する方法であって、該免疫応答を誘導するのに十分な量のポリペプチドを該哺乳動物に投与することによる方法に関する。

【0015】

本発明はまた、タンキラーゼホモログタンパク質（THP）に結合する化合物の同定方法であって、THPを化合物と接触させ、該化合物がTHPに結合するか否かを判定することによる方法に関する。

【0016】

本発明はまた、タンキラーゼホモログタンパク質（THP）をコードする核酸分子に結合する化合物の同定方法であって、THPを化合物と接触させ、該化合物が該核酸分子に結合するか否かを判定することによる方法に関する。

【0017】

本発明はまた、タンキラーゼホモログタンパク質（THP）の活性を調節する化合物の同定方法であって、THPを化合物と接触させ、THP活性が修飾された否かを判定することによる方法に関する。

【0018】

本発明はまた、THP活性を調節する化合物であって、THPを該化合物と接触させ、該化合物がTHPの活性を修飾しTHPに結合し又はTHPコード化核酸分子に結合するか否かを判定することにより同定された化合物に関する。

【0019】

本発明のこれらのおよび他の態様を、以下に更に詳しく説明する。

#### 【0020】

(好ましい実施形態の詳細な記載)

本発明は、とりわけ、T H Pまたはその一部をコードする単離された及び精製されたポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを含有するベクター、これらのベクターで形質転換された宿主細胞、T H Pの製造方法、前記ポリヌクレオチドおよびベクターの使用法、単離された及び精製されたT H P、ならびにT H P活性を調節する化合物のスクリーニング方法を提供する。

#### 【0021】

本明細書全体において、種々の定義がなされている。ほとんどの用語は、当業者によりそれらの用語に属すると考えられている意義を有する。後記または本明細書のどこかにおいて特に定義されている用語は、全体として本発明の文脈中で与えられた及び当業者に典型的に理解されている意義を有する。

#### 【0022】

本発明で用いる「活性」なる語は、直接的または間接的な結合を示唆または表す種々の測定可能な指標を意味し、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに直接的に結合する化合物のアフィニティー、または例えば、上流または下流タンパク質の量の測定値、または何らかの刺激または事象の後の他の同様の機能を含む、応答に影響を及ぼす、すなわち、何らかの暴露または刺激に対する応答における測定可能な影響を及ぼす種々の測定可能な指標を意味する。

#### 【0023】

本発明で用いる小文字の略語(T h p)は遺伝子、c D N A、R N Aまたは核酸配列を表し、一方、大文字の略語(T H P)はタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、オリゴペプチドまたはアミノ酸配列を表す。

#### 【0024】

本発明で用いる「抗体」なる語は、完全な無傷の抗体ならびにそのF a bフラグメントおよびF ( a b )<sub>2</sub>フラグメントを表すと意図される。完全な無傷の抗体は、モノクローナル抗体、例えばマウスモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体を含む。

## 【0025】

本発明で用いる「結合」なる語は、2つのタンパク質もしくは化合物または付随タンパク質もしくは化合物またはそれらの組合せの間の物理的または化学的相互作用を意味する。結合は、イオン結合、非イオン結合、水素結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用の結合は、直接的または間接的でありうる。間接的結合は、別のタンパク質または化合物を介した又はそれらの効果によるものである。直接的結合は、別のタンパク質または化合物を介して又はそれらの効果により生じるものではない他の実質的化学的中間体を伴わない相互作用を意味する。

## 【0026】

本発明で用いる「化合物」なる語は、小分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチドまたは核酸を含む（これらに限定されるものではない）任意の同定可能な化学物質または分子を意味し、そのような化合物は天然物または合成物でありうる。

## 【0027】

本発明で用いる「相補的」なる語は、核酸分子のヌクレオチド単位間のワトソン-クリック塩基対形成を指す。

## 【0028】

本発明で用いる「接触」なる語は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに物理的に接近するように化合物を直接的または間接的に一緒にすることを意味する。該ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、多数のバッファー、塩、溶液などの中に存在しうる。接触は、例えば、THPまたはその断片をコードする核酸分子またはポリペプチドを含有するビーカー、マイクロタイタープレート、細胞培養フラスコまたはマイクロアレイ、例えば遺伝子チップなどの中に該化合物を配置することを含む。

## 【0029】

本発明で用いる「相同ヌクレオチド配列」または「相同アミノ酸配列」またはそれらの変異体なる表現は、配列番号3もしくは配列番号4の全体または該コード化ポリペプチドの機能的ドメインをコードする配列番号3もしくは配列番号4

の少なくとも一部に対して又は配列番号5に対して少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約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%、最も好ましくは少なくとも約95%のヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの相同性により特徴づけられる配列を意味する。相同ヌクレオチド配列は、T H Pタンパク質のアイソフォームをコードする配列を含む。そのようなアイソフォームは、例えばRNAの選択的スプライシングの結果として同一生物の種々の組織内で発現されうる。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によりコードされうる。相同ヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（哺乳動物を含むが、これに限定されるものではない）のT H Pタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。相同ヌクレオチド配列はまた、本明細書に記載のヌクレオチド配列の天然に生じる対立遺伝子変異および突然変異を含むが、これらに限定されるものではない。しかし、相同ヌクレオチド配列は、ヒトタンキラーゼをコードするヌクレオチド配列を含まない。相同アミノ酸配列は、配列番号5中の同類アミノ酸置換をコードするアミノ酸配列、およびタンキラーゼ性を有するポリペプチドを含む。しかし、相同アミノ酸配列は、ヒトタンキラーゼをコードするアミノ酸配列を含まない。好ましくは、相同性(%)は、例えば、SmithおよびWaterman(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489; その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)のアルゴリズムを用いるデフォルト設定を用いるGapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix(登録商標), Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI)により測定する。

#### 【0030】

本発明で用いる「単離」された核酸分子なる語は、その天然の環境から取り出された核酸分子(DNAまたはRNA)を意味する。単離された核酸分子の具体例には、ベクター内に含有される組換えDNA分子、異種宿主細胞内に維持された組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成DNAまたはRNA分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

## 【0031】

本発明で用いる「調節する」または「修飾する」は、特定の活性またはタンパク質の量、質または効果の増加または減少を意味する。

## 【0032】

本発明で用いる「オリゴヌクレオチド」なる語は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）において用いられるのに十分な数の塩基を有する一連の連結ヌクレオチド残基を意味する。この短い配列は、ゲノムまたはcDNA配列に基づき（またはそれから設計され）、特定の細胞または組織内の同一、類似または相補的DNAまたはRNAの増幅、それらの確認または表示に用いられる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約10ヌクレオチドを有する、そして約50ヌクレオチドも有する、好ましくは約15～30ヌクレオチドを有するDNA配列の一部を含む。それらは化学合成され、プローブとして使用されうる。

## 【0033】

本発明で用いる「プローブ」なる語は、用途に応じて種々の長さ、好ましくは少なくとも約10ヌクレオチド、そして約6,000ヌクレオチドも有する核酸配列を意味する。それらは、同一、類似または相補的核酸配列の検出に用いられる。より長いプローブは、通常、天然源から又は組換えにより得られ、特異性が高く、ハイブリダイズするのがオリゴマーよりはるかに遅い。それらは、一本鎖または二本鎖であることが可能であり、PCR、ハイブリダイゼーションメンブレンに基づく又はELISA様技術における特異性を有するように注意深く設計されうる。

## 【0034】

本発明で用いる「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」なる表現は、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドがその標的配列にはハイブリダイズするが他のいずれの配列にもハイブリダイズしない条件を意味する。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、状況によって異なる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、一定のイオン強度およびpHにおいて、特定の配列の熱融解点（ $T_m$ ）より約5℃低い。 $T_m$ は、標的配列に相補的

なプローブの50%が平衡時に標的配列にハイブリダイズする温度(一定のイオン強度、pHおよび核酸濃度におけるもの)である。標的配列は、一般には、 $T_m$ で過剰に存在するため、該プローブは平衡時に50%を占める。典型的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度が、pH7.0~8.3で約1.0Mのナトリウムイオン、典型的には約0.01~1.0Mのナトリウムイオン(または他の塩)であり、温度が、短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10~50ヌクレオチド)では少なくとも約30、より長いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドでは少なくとも約60である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加により達成される。

#### 【0035】

該アミノ酸配列は、アミノ側からカルボキシ側の方向に左から右に示されている。該アミノおよびカルボキシ基は該配列中には示されていない。ヌクレオチド配列は、5'から3'の方向に左から右に一本鎖のみで示されている。ヌクレオチドおよびアミノ酸は、IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨されている方法で、あるいは(アミノ酸については)3文字の記号で表されている。

#### 【0036】

本発明の1つの態様は、THPをコードする新規ヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子に関する。該核酸分子は、好ましくは、RNAまたはDNAであるが、RNAおよびDNAの両方の単量体またはペプチド核酸単量体を含有しうる。該核酸分子は一本鎖または二本鎖でありうる。該核酸分子の単量体は、通常のスホジエステル結合または修飾された結合、例えばスホロチオアート結合などにより連結されうる。また、該単量体の糖部分は、例えば、ヌクレアーゼ抵抗性および/または細胞取込み特性を付与するのを補助する2'置換基の付加により修飾されうる。

#### 【0037】

本発明の好ましい実施形態においては、該核酸分子は、配列番号3を含み、それは4512塩基長であり、ヒトTHPをコードする約3498ヌクレオチド(

配列番号3内の約23位～約3520位)のオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。あるいは、該核酸分子は配列番号3の断片を含む。好ましくは、該断片は、約10～約100ヌクレオチド、約101～約200ヌクレオチド、約201～約300ヌクレオチド、約301～約400ヌクレオチド、約401～約500ヌクレオチド、約501～約600ヌクレオチド、約601～約700ヌクレオチド、約701～約800ヌクレオチド、約801～約900ヌクレオチド、約901～約1000ヌクレオチド、約1001～約1100ヌクレオチド、約1101～約1200ヌクレオチド、約1201～約1300ヌクレオチド、約1301～約1400ヌクレオチド、約1401～約1500ヌクレオチド、約1501～約1600ヌクレオチド、約1601～約1700ヌクレオチド、約1701～約1800ヌクレオチド、約1801～約1900ヌクレオチド、約1901～約2000ヌクレオチド、約2001～約2100ヌクレオチド、約2101～約2200ヌクレオチド、約2201～約2300ヌクレオチド、約2301～約2400ヌクレオチド、約2401～約2500ヌクレオチド、約2501～約2600ヌクレオチド、約2601～約2700ヌクレオチド、約2701～約2800ヌクレオチド、約2801～約2900ヌクレオチド、約2901～約3000ヌクレオチド、約3001～約3100ヌクレオチド、約3101～約3200ヌクレオチド、約3201～約3300ヌクレオチド、約3301～約3400ヌクレオチド、約3401～約3500ヌクレオチド、約3501～約3600ヌクレオチド、約3601～約3700ヌクレオチド、約3701～約3800ヌクレオチド、約3801～約3900ヌクレオチド、約3901～約4000ヌクレオチド、約4001～約4100ヌクレオチド、約4101～約4200ヌクレオチド、約4201～約4300ヌクレオチド、約4301～約4400ヌクレオチド、約4401～約4500ヌクレオチド、または約4501～約4511ヌクレオチド、およびそれらの任意の組合せを含む。該断片は、配列番号3の任意の部分内に位置する。

#### 【0038】

本発明のもう1つの好ましい実施形態においては、該核酸分子は、配列番号4を含み、それは3498塩基長であり、前記のORF(配列番号3内の約23位

～約3520位)を含む。あるいは、該核酸分子は配列番号4の断片を含む。好ましくは、該断片は、約10～約100ヌクレオチド、約101～約200ヌクレオチド、約201～約300ヌクレオチド、約301～約400ヌクレオチド、約401～約500ヌクレオチド、約501～約600ヌクレオチド、約601～約700ヌクレオチド、約701～約800ヌクレオチド、約801～約900ヌクレオチド、約901～約1000ヌクレオチド、約1001～約1100ヌクレオチド、約1101～約1200ヌクレオチド、約1201～約1300ヌクレオチド、約1301～約1400ヌクレオチド、約1401～約1500ヌクレオチド、約1501～約1600ヌクレオチド、約1601～約1700ヌクレオチド、約1701～約1800ヌクレオチド、約1801～約1900ヌクレオチド、約1901～約2000ヌクレオチド、約2001～約2100ヌクレオチド、約2101～約2200ヌクレオチド、約2201～約2300ヌクレオチド、約2301～約2400ヌクレオチド、約2401～約2500ヌクレオチド、約2501～約2600ヌクレオチド、約2601～約2700ヌクレオチド、約2701～約2800ヌクレオチド、約2801～約2900ヌクレオチド、約2901～約3000ヌクレオチド、約3001～約3100ヌクレオチド、約3101～約3200ヌクレオチド、約3201～約3300ヌクレオチド、約3301～約3400ヌクレオチド、または約3401～約3497ヌクレオチド、およびそれらの任意の組合せを含む。該断片は、配列番号4の任意の部分内に位置しうる。

#### 【0039】

本発明のもう1つの好ましい実施形態においては、該核酸分子は、配列番号3または配列番号4の少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列を含む。好ましくは、該核酸分子は、配列番号3または配列番号4において列挙された全配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。あるいは、該核酸分子は、配列番号3または配列番号4の一部に相補的(すなわち、前記の断片のいずれかに相補的)なヌクレオチド配列を含む。配列番号3または配列番号4の少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列は、例えば、配列番号3または配列番号4の少なくとも一部に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするオリ

ゴヌクレオチドを含む。好ましいオリゴヌクレオチドは、少なくとも約10ヌクレオチド、そして約50ヌクレオチドも、好ましくは、約15~30ヌクレオチドを含む。それらは化学合成され、プローブ、プライマーおよびアンチセンス因子として使用されうる。

#### 【0040】

本発明のもう1つの好ましい実施形態においては、該核酸分子は、配列番号3または配列番号4に相同なヌクレオチド配列を含む。好ましくは、該ヌクレオチド配列は、全配列番号3または配列番号4に対して少なくとも約75%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、最も好ましくは少なくとも約95%相同である。あるいは、該ヌクレオチド配列は、配列番号3または配列番号4の、それによりコードされるポリペプチドの機能的ドメインをコードする一部に対して、少なくとも約60%相同、より好ましくは少なくとも約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、最も好ましくは少なくとも約95%相同である。また、配列番号3または配列番号4に相同なヌクレオチド配列は、前記の長さの配列番号3または配列番号4に相同なヌクレオチド配列の断片も含む。

#### 【0041】

本発明のもう1つの好ましい実施形態においては、該核酸分子は、配列番号5を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。核酸分子は、好ましくは、配列番号4を含み、あるいは遺伝暗号の縮重を反映するコドン置換を含有する配列番号4を含む。当技術分野でよく知られているとおり、遺伝暗号の縮重のため、配列番号4にコードされるのと同じポリペプチドをコードしうる多数の他のDNAまたはRNA分子が存在する。したがって、本発明は、発現されると配列番号5のポリペプチドをコードするこれらの他のDNAまたはRNA分子を含む。単に特定のアミノ酸のコドンの変化により特徴づけられる、本明細書に具体的に開示するもの以外のDNAおよびRNA分子は、本発明の範囲内である。

#### 【0042】

当技術分野でよく知られているとおり、遺伝暗号の縮重のため、前記THP遺伝子にコードされるのと同じポリペプチドをコードしうる多数の他のDNAまた

はRNA分子が存在する。したがって、本発明は、発現されると配列番号4のポリペプチドをコードするそれらの他のDNAまたはRNA分子を含む。Thp遺伝子にコードされるアミノ酸残基配列を同定したら、それぞれの特定のアミノ酸残基のすべてのトリプレットコドンの知見を用いて、すべてのそのようなコード化RNAおよびDNA配列を記載することが可能である。単に特定のアミノ酸のコドンの変化により特徴づけられる、本明細書に具体的に開示するもの以外のDNAおよびRNA分子は、本発明の範囲内である。

## 【0043】

アミノ酸およびそれらの代表的略語、記号およびコドンの一覧を、以下の表1に示す。

## 【0044】

【表1】

表1

アミノ酸	略語	記号	コドン
アラニン	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
システイン	Cys	C	UGA UGU
アスパラギン酸	Asp	D	GAC GAU
グルタミン酸	Glu	E	GAA GAG
フェニルアラニン	Phe	F	UUC UUU
グリシン	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
ヒスチジン	His	H	CAC CAU
イソロイシン	Ile	I	AUA AUC AUU
リシン	Lys	K	AAA AAG
ロイシン	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
メチオニン	Met	M	AUG
アスパラギン	Asn	N	AAC AAU
プロリン	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA CAG
アルギニン	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
セリン	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
トレオニン	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
バリン	Val	V	GUA GUC GUG GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG
チロシン	Tyr	Y	UAC UAU

## 【0045】

当技術分野でよく知られているとおり、コドンはmRNA分子中のヌクレオチドのトリプレット配列を構成し、そのような場合、それは塩基チミジン(T)(これはDNA分子中に存在する)の代わりに塩基ウラシル(U)により特徴づけられる。ポリヌクレオチド中の同一アミノ酸残基についてのコドンの単純な変化は、コードされるポリペプチドの配列も構造も変化させないであろう。

【0046】

あるいは、該核酸分子は、配列番号5をコードするポリペプチドの断片をコードするヌクレオチド配列を含む。好ましくは、該断片は、約5～約20アミノ酸、約21～約40アミノ酸、約41～約60アミノ酸、約61～約80アミノ酸、約81～約100アミノ酸、約101～約120アミノ酸、約121～約140アミノ酸、約141～約160アミノ酸、約161～約180アミノ酸、約181～約200アミノ酸、約201～約220アミノ酸、約221～約240アミノ酸、約241～約260アミノ酸、約261～約280アミノ酸、約281～約300アミノ酸、約301～約320アミノ酸、約321～約340アミノ酸、約341～約360アミノ酸、約361～約380アミノ酸、約381～約400アミノ酸、約401～約420アミノ酸、約421～約440アミノ酸、約441～約460アミノ酸、約461～約480アミノ酸、約481～約500アミノ酸、約501～約520アミノ酸、約521～約540アミノ酸、約541～約560アミノ酸、約561～約580アミノ酸、約581～約600アミノ酸、約601～約620アミノ酸、約621～約640アミノ酸、約641～約660アミノ酸、約661～約680アミノ酸、約681～約700アミノ酸、約701～約720アミノ酸、約721～約740アミノ酸、約741～約760アミノ酸、約761～約780アミノ酸、約781～約800アミノ酸、約801～約820アミノ酸、約821～約840アミノ酸、約841～約860アミノ酸、約861～約880アミノ酸、約881～約900アミノ酸、約901～約920アミノ酸、約921～約940アミノ酸、約941～約960アミノ酸、約961～約980アミノ酸、約981～約1000アミノ酸、約1001～約1020アミノ酸、約1021～約1040アミノ酸、約1041～約1060アミノ酸、約1061～約1080アミノ酸、約1081～約1100

アミノ酸、約1101～約1120アミノ酸、約1121～約1140アミノ酸、約1141～約1160アミノ酸、または約1161～約1165アミノ酸、およびそれらの任意の組合せを含む。該断片は、配列番号5の任意の部分中に位置しうる。

【0047】

本発明のもう1つの実施形態においては、該核酸分子は、配列番号5に相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。あるいは、該核酸分子は、配列番号5に相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドの断片をコードするヌクレオチド配列を含む。好ましくは、該断片は、約5～約20アミノ酸、約21～約40アミノ酸、約41～約60アミノ酸、約61～約80アミノ酸、約81～約100アミノ酸、約101～約120アミノ酸、約121～約140アミノ酸、約141～約160アミノ酸、約161～約180アミノ酸、約181～約200アミノ酸、約201～約220アミノ酸、約221～約240アミノ酸、約241～約260アミノ酸、約261～約280アミノ酸、約281～約300アミノ酸、約301～約320アミノ酸、約321～約340アミノ酸、約341～約360アミノ酸、約361～約380アミノ酸、約381～約400アミノ酸、約401～約420アミノ酸、約421～約440アミノ酸、約441～約460アミノ酸、約461～約480アミノ酸、約481～約500アミノ酸、約501～約520アミノ酸、約521～約540アミノ酸、約541～約560アミノ酸、約561～約580アミノ酸、約581～約600アミノ酸、約601～約620アミノ酸、約621～約640アミノ酸、約641～約660アミノ酸、約661～約680アミノ酸、約681～約700アミノ酸、約701～約720アミノ酸、約721～約740アミノ酸、約741～約760アミノ酸、約761～約780アミノ酸、約781～約800アミノ酸、約801～約820アミノ酸、約821～約840アミノ酸、約841～約860アミノ酸、約861～約880アミノ酸、約881～約900アミノ酸、約901～約920アミノ酸、約921～約940アミノ酸、約941～約960アミノ酸、約961～約980アミノ酸、約981～約1000アミノ酸、約1001～約1020アミノ酸、約1021～約1040アミノ酸、約104

1～約1060アミノ酸、約1061～約1080アミノ酸、約1081～約1000アミノ酸、約1101～約1120アミノ酸、約1121～約1140アミノ酸、約1141～約1160アミノ酸、または約1161～約1165アミノ酸、およびそれらの任意の組合せを含む。該断片は、配列番号5の任意の部分中に位置しうる。

【0048】

本発明に開示するヌクレオチド配列情報の知見を用いて、当業者は、当業者によく知られた及び例えばSambrookら，“Molecular cloning: a laboratory manual,”第2版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor, NY(1989)(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に開示されている種々の手段により、異なる起源(すなわち、異なる組織または異なる生物)に由来するTHPをコードする配列を同定し入手することが可能である。

【0049】

例えば、THPをコードするDNAは、本明細書に記載のThp遺伝子配列情報から得られたオリゴヌクレオチドプローブでmRNA、cDNAまたはゲノムDNAをスクリーニングすることにより得ることができる。プローブは、当業者に公知の方法に従い、検出可能な基、例えば蛍光基、放射性原子または化学発光基で標識することが可能であり、例えばSambrookらにより記載されている通常のハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用することができる。

【0050】

あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を、本明細書に記載のヌクレオチド配列から得られたPCRオリゴヌクレオチドプライマーと共に用いて、前記のThpヌクレオチド配列のいずれかを含む核酸分子を回収することができる。Mullisらの米国特許第4,683,195号およびMullisの第4,683,202号を参照されたい。たとえ特定の核酸配列が予め精製されておらず特定のサンプル中に単コピーでしか存在しない場合であっても、該PCR反応は、その特定の核酸配列の濃度を選択的に増加させる方法を提供する。該方法を

用いて、一本鎖または二本鎖DNAを増幅することができる。該方法の本質は、所望の核酸分子を鋳型依存性のポリメラーゼによって複製するためのプライマーとして働く2つのオリゴヌクレオチドプローブの使用を含む。

#### 【0051】

多種多様なその他のクローニングおよびインビトロ増幅方法が当業者によく知られている。これらの技術の具体例は、例えば、Bergerら, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger) (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に記載されている。

#### 【0052】

本発明の核酸分子およびそれに由来する断片は、ある疾患に関連した制限断片長多型(RFLP)に関するスクリーニングおよび遺伝地図作製に有用である。

#### 【0053】

THPをコードする本発明のヌクレオチド配列に由来するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは配列番号3もしくは配列番号4の断片またはそれらに相補的な配列は、種々の組織内のThp遺伝子発現をプローブするための診断手段として有用である。例えば、この酵素の天然発現またはそれに関連した病態を調べるために、通常のオートラジオグラフィ技術により、検出可能な基を保持するオリゴヌクレオチドプローブで、組織を*in situ*でプローブすることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号3もしくは配列番号4の調節領域またはそれらに対応するmRNA(開始コドン、TATAボックス、エンハンサー配列などを含むが、これらに限定されるものではない)に対するものである。

#### 【0054】

THPのヌクレオチド配列を入手または確認するために、自動配列決定方法を用いた。本発明のTHPヌクレオチド配列は、両方のDNA鎖に関して得られ、100%正確であると考えられる。しかし、当技術分野で公知のとおり、自動化方法により得られたヌクレオチド配列は、いくつかの誤りを含む。自動化により

決定されたヌクレオチド配列は、典型的には、与えられた核酸分子の実際のヌクレオチド配列と少なくとも約90%、より典型的には少なくとも約95%~少なくとも約99.9%同一である。当技術分野でよく知られた手動配列決定方法を用いて、実際の配列を、より正確に決定することができる。1以上のヌクレオチドの挿入または欠失をもたらす配列決定における誤りは、翻訳においてフレームシフトを引き起こす可能性があり、したがって、推定されるアミノ酸配列は、該突然変異の位置から開始する核酸分子の実際のヌクレオチド配列から推定されるものとは異なるであろう。

#### 【0055】

本発明のもう1つの態様は、前記核酸分子のいずれかを含んでなるベクターまたは組換え発現ベクターに関する。本発明においては、THPをコードするDNAまたはRNAを増幅するために、および/またはTHPをコードするDNAを発現させるために、ベクターを使用する。好ましいベクターには、プラスミド、ファージ、コスミド、ウイルス粒子またはウイルス、および組込まれうるDNA断片(すなわち、相同組換えにより宿主ゲノム内に組込まれうる断片)が含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましいウイルス粒子には、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、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスが含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましい発現ベクターには、pcDNA3(Invitrogen)およびpSVL(Pharmacia Biotech)が含まれるが、これらに限定されるものではない。他の発現ベクターには、pSPORTベクター、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)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0056】

好ましい発現ベクターは、適当な宿主内でTHPの発現を引き起こしうる適当な制御配列にTHPをコードしているDNA配列が作動的に結合している複製可

能なDNA構築物である。DNA領域は、それが互いに機能的に関連している場合、作動的に結合している。例えば、プロモーターは、それがコード配列の転写を制御する場合、該コード配列に作動的に結合している。増幅ベクターは発現制御ドメインを必要としないが、その代わりに、通常は複製起点により付与される宿主内での複製能と、形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子とだけを必要とする。発現ベクター内に制御配列が必要とされるかどうかは、選ばれた宿主および選ばれた形質転換方法に応じて様々となる。一般に、制御配列には、転写プロモーター、所望により使用される転写制御のためのオペレーター配列、適当なmRNAリボソーム結合をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終結を制御する配列が含まれる。

#### 【0057】

好ましいベクターは、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有する。本発明のプロモーター配列は、原核性、真核性またはウイルス性でありうる。適当な原核性配列の具体例には、バクテリオファージラムダの $R_R$ および $R_L$ プロモーター(The bacteriophage Lambda, Hershey, A. D. 編, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1973) (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)、Lambda II, Hendrix, R. W. 編, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1980) (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)) ; 大腸菌(E. coli)のtrp、recA、熱ショックおよびlacZプロモーター、およびSV40初期プロモーター(Benoistら Nature, 1981, 290, 304-310 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする))が含まれる。追加的なプロモーターには、マウス乳癌ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスの長末端反復配列、モロニーウイルス、サイトメガロウイルス前初期プロモーター、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、ヒトヘモグロブリン、ヒト筋クレアチンおよびヒトメタロチオネインが含まれるが、これらに限定されるものではない。

## 【0058】

追加的な調節配列も、好ましいベクター中に含まれうる。適当な調節配列の好ましい具体例は、ファージMS-2のレプリカーゼ遺伝子の及びバクテリオファージラムダの遺伝子cIIのシャイン・ダルガルノ配列により代表される。該シャイン・ダルガルノ配列は、THPをコードするDNAの直前に存在することが可能であり、成熟THPタンパク質の発現を引き起こしうる。

## 【0059】

さらに、適当な発現ベクターは、形質転換された宿主細胞のスクリーニングを可能にする適当なマーカールを含みうる。選択された宿主の形質転換は、当業者によく知られた及びSambrookら(前掲)に記載されている種々の技術のいずれかを用いて行なうことができる。

## 【0060】

また、複製起点は、外因性起点を含むような該ベクターの構築により付与されたり、あるいは宿主細胞染色体複製機構により付与されうる。該ベクターが宿主細胞染色体内に組込まれる場合には、後者で十分かもしれない。あるいは、ウイルス性複製起点を含有するベクターを使用する代わりに、当業者は、選択マーカールとTHP DNAとによる同時形質転換の方法により哺乳類細胞を形質転換することが可能である。適当なマーカールの一例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはチミジンキナーゼ(米国特許第4,399,216号を参照されたい)である。

## 【0061】

THPをコードするヌクレオチド配列は、連結のための平滑末端または付着末端化、適当な末端を得るための制限酵素消化、適宜行なう付着末端の埋め合わせ(フィルイン)、望ましくない結合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理および適当なりガーゼでの連結を含む通常の技術に従い、ベクターDNAで組換えられうる。そのような操作のための技術はSambrookら(前掲)に記載されており、当業者によく知られている。哺乳類発現ベクターの構築方法は、例えば、Okayamaら, Mol. Cell. Biol., 1983, 3, 280, Cosmanら, Mol. Immunol., 1986, 23, 935, C

osmanら, Nature, 1984, 312, 768, EP-A-0367566およびWO 91/18982(それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする))に開示されている。

#### 【0062】

本発明のもう1つの態様は、前記核酸分子のいずれか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。該ヌクレオチド配列の発現は、該発現ベクターを適当な宿主細胞内に導入した場合に生じる。本発明のポリペプチドの発現のための適当な宿主細胞には、原核生物、酵母および真核生物が含まれるが、これらに限定されるものではない。原核発現ベクターを使用する場合、適当な宿主細胞は、該クローン化配列を発現しうる任意の原核細胞であろう。適当な原核細胞には、エシェリキア(Escherichia)、バシラス(Bacillus)、サルモネラ(Salmonella)、シュードモナス(Pseudomonas)、ストレプトマイセス(Streptomyces)およびスタヒロコッカス(Staphylococcus)属の細菌が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0063】

真核発現ベクターを使用する場合には、適当な宿主細胞は、該クローン化配列を発現しうる任意の真核細胞であろう。好ましくは、真核細胞は高等真核生物の細胞である。適当な真核細胞には、非ヒト哺乳類組織培養細胞およびヒト組織培養細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましい宿主細胞には、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細胞(COS細胞)、ヒト293細胞およびマウス3T3繊維芽細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。細胞培養におけるそのような細胞の増殖は常套的方法となっている(Tissue Culture, Academic Press, KruseおよびPatterson編(1973))(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい)。

#### 【0064】

また、酵母宿主を宿主細胞として使用することができる。好ましい酵母細胞に

は、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、ピチア (*Pichia*) およびクラベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属が含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましい酵母宿主は、エス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) およびピー・パストリス (*P. pastoris*) である。好ましい酵母ベクターは、2T酵母プラスミド由来の複製起点配列、自律複製配列 (ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化のための配列、転写終結のための配列、および選択マーカー遺伝子を含む。本発明においては、酵母および大腸菌 (*E. coli*) の両方における複製のためのシャトルベクターも含まれる。

#### 【0065】

あるいは、昆虫細胞を宿主細胞として使用することができる。好ましい実施形態においては、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'Riellyら (編), W.H. Freeman and Company, New York, 1992、および米国特許第4,879,236号 (それらのそれぞれを参照により本明細書に組み入れることとする) を参照されたい) を使用して、本発明のポリペプチドを発現させる。また、例えば、MAXBA (商標) 完全バキュロウイルス発現系 (Invitrogen) を昆虫細胞内での産生に使用することができる。

#### 【0066】

本発明のもう1つの態様は、前記の核酸分子または組換え発現ベクターのいずれかと許容される担体または希釈剤とを含んでなる、医薬組成物を含む組成物に関する。好ましくは、該担体または希釈剤は医薬上許容されるものである。適当な担体は、この分野における標準的な参考書である *Remington's Pharmaceutical Sciences*, A. Osolの最新版 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) に記載されている。そのような担体または希釈剤の好ましい具体例には、水、食塩水、リンガー液、デキストロース溶液および5%ヒト血清アルブミンが含まれるが、これらに限定される

ものではない。また、リポソームおよび非水性ビヒクル、例えば不揮発性油を使用することができる。該製剤は、通常用いられる技術により滅菌する。

【0067】

本発明のもう1つの態様は、前記核酸分子にコードされる単離されたポリペプチドに関する。本発明の好ましい実施形態においては、そのような単離されたポリペプチドは、配列番号5に記載のアミノ酸配列を含む。あるいは、該ポリペプチドは、配列番号5をコードするポリペプチドの断片である。好ましくは、該断片は、約5～約20アミノ酸、約21～約40アミノ酸、約41～約60アミノ酸、約61～約80アミノ酸、約81～約100アミノ酸、約101～約120アミノ酸、約121～約140アミノ酸、約141～約160アミノ酸、約161～約180アミノ酸、約181～約200アミノ酸、約201～約220アミノ酸、約221～約240アミノ酸、約241～約260アミノ酸、約261～約280アミノ酸、約281～約300アミノ酸、約301～約320アミノ酸、約321～約340アミノ酸、約341～約360アミノ酸、約361～約380アミノ酸、約381～約400アミノ酸、約401～約420アミノ酸、約421～約440アミノ酸、約441～約460アミノ酸、約461～約480アミノ酸、約481～約500アミノ酸、約501～約520アミノ酸、約521～約540アミノ酸、約541～約560アミノ酸、約561～約580アミノ酸、約581～約600アミノ酸、約601～約620アミノ酸、約621～約640アミノ酸、約641～約660アミノ酸、約661～約680アミノ酸、約681～約700アミノ酸、約701～約720アミノ酸、約721～約740アミノ酸、約741～約760アミノ酸、約761～約780アミノ酸、約781～約800アミノ酸、約801～約820アミノ酸、約821～約840アミノ酸、約841～約860アミノ酸、約861～約880アミノ酸、約881～約900アミノ酸、約901～約920アミノ酸、約921～約940アミノ酸、約941～約960アミノ酸、約961～約980アミノ酸、約981～約1000アミノ酸、約1001～約1020アミノ酸、約1021～約1040アミノ酸、約1041～約1060アミノ酸、約1061～約1080アミノ酸、約1081～約1100アミノ酸、約1101～約1120アミノ酸、約1

121～約1140アミノ酸、約1141～約1160アミノ酸、または約1161～約1165アミノ酸、およびそれらの任意の組合せを含む。該断片は、配列番号5の任意の部分中に位置しうる。

【0068】

本発明のもう1つの好ましい実施形態においては、該ポリペプチドは、配列番号5および前記のその断片に相同なアミノ酸配列を含む。本発明は、該ポリペプチドの生物学的特性に実質的に類似した実質的に少なくとも1つの生物学的特性を有するそれに相同なタンパク質を含むと理解されるべきである。好ましくは、該生物学的特性の活性の程度は、T h p（例えば、配列番号5）の生物学的特性の活性の少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは100%である。そのようなタンパク質は変異体とも称される。この定義は、本明細書に記載のT h p 遺伝子のアイソフォーム、天然対立遺伝子変異体およびスプライス変異体を含むと意図される。これらの変異体は、例えば、同一起源生物の異なる組織における差次的発現または選択的スプライシングから生じうる。該変異体は、例えば、アミノ酸の挿入、欠失または置換により特徴づけられる。これに関しては、配列番号5に対して少なくとも70%の配列相同性、少なくとも80%の配列相同性、好ましくは約90%の配列相同性、より好ましくは約95%の配列相同性、最も好ましくは約98%の配列相同性を有するアミノ酸配列を有する変異体が本発明に含まれると意図される。好ましい相同ポリペプチドは、配列番号5と比較して少なくとも1つの同類アミノ酸置換を含む。アミノ酸の「挿入」、「置換」または「欠失」は、アミノ酸配列に対する又はアミノ酸配列内の変化である。特定のアミノ酸配列内で許容される変異は、該ペプチドを合成的に製造することにより又は組換えDNA技術によりT h p 配列内のヌクレオチドの挿入、欠失または置換を系統的に作製することにより、実験的に決定することができる。

【0069】

天然に存在するアミノ酸配列の改変は、多数の公知技術のいずれかにより達成することができる。例えば、Walderら, Gene, 1986, 42, 133, Bauerら, Gene, 1985, 37, 73, Craik, BioTechniques, 1985年1月, pp. 12-19, Smithら, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press (1981) および米国特許第4,518,584号および第4,737,462号(それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に記載されているオリゴヌクレオチド特異的(directed)突然変異誘発などの当業者によく知られた方法により、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド内の特定の位置に突然変異を導入することができる。

#### 【0070】

好ましくは、本発明のTHP変異体は、天然に存在するTHPポリペプチドの生物活性を実質的に示す。「天然に存在するTHPポリペプチドの生物活性を実質的に示す」は、本発明の範囲内のTHP変異体が、同類置換された配列を含みうることを意味し、THPポリペプチドの1以上のアミノ酸残基が、該THPポリペプチドの二次構造および/または三次構造を改変しない異なる残基により置換されていることを意味する。そのような置換には、類似した物理化学的特性を有する残基によるアミノ酸の置換、例えば、脂肪族残基(Ile、Val、LeuまたはAla)間での置換、または塩基性残基LysおよびArg、アミド残基GlnおよびAsn、ヒドロキシル残基SerおよびTyrまたは芳香性残基PheおよびTyr間での置換が含まれうる。表現型上変化しないアミノ酸置換に関する更なる情報は、Bowieら, Science, 1990, 247, 1306-1310(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に記載されている。THPの生物活性を実質的に保有しうる他のTHP変異体は、該タンパク質の機能的領域以外の領域内でアミノ酸置換が施されているものである。

#### 【0071】

また、そのような宿主細胞内で発現されるポリペプチドは、異種タンパク質由

来の領域を含む融合タンパク質でありうる。そのような領域は、例えば、該ポリペプチドの分泌、安定性の改善または精製の促進を可能にするために加えられうる。例えば、適当なシグナルペプチドをコードする配列を発現ベクター内に組込むことができる。シグナルペプチド(分泌リーダー)のDNA配列は、該シグナルペプチドを含む融合タンパク質として該ポリペプチドが翻訳されるよう、ポリヌクレオチド配列にインフレームで融合されうる。意図した宿主細胞内で機能的であるシグナルペプチドは、該ポリペプチドの細胞外分泌を促進する。好ましくは、該ポリペプチドが該細胞から分泌される際に、該シグナル配列は該ポリペプチドから切断されることとなる。したがって、好ましい融合タンパク質は、THPのN末端が輸送ペプチドに融合したものでありうる。

#### 【0072】

1つの実施形態においては、該ポリペプチドは、該ポリペプチドの精製を促進させるために使用する異種領域を含む融合タンパク質を含む。そのような機能に用いられる利用可能なペプチドの多くは、結合相手への該融合タンパク質の選択的結合を可能にする。好ましい結合相手は、タンパク質のIgG結合ドメインを1以上を含み、例えばIgG共役セファロース上のアフィニティークロマトグラフィーにより均一状態にまで容易に精製される。あるいは、多数のベクターは、標的タンパク質のN末端またはC末端で発現されうるヒスチジン残基の伸長を保持するという利点を有する。したがって、関心のあるタンパク質を金属キレート化クロマトグラフィーにより回収することができる。該融合タンパク質が切断されて成熟THPタンパク質が得られるよう、THPの配列の直前には、タンパク質分解酵素(例えば、エンテロキナーゼ、因子X、プロコラゲナーゼまたはトロンビン)の認識部位をコードするヌクレオチド配列が存在する。融合相手の更なる具体例には、酵母I因子、Sf9昆虫細胞におけるミツバチメラチンリーダー、6-Hisタグ、チオレドキシントグ、赤血球凝集素タグ、GSTタグおよびOmpAシグナル配列タグが含まれるが、これらに限定されるものではない。当業者に理解されるとおり、該ペプチドを認識しそれに結合する結合相手は、任意の分子または化合物、例えば、金属イオン(例えば、金属アフィニティークラム)、抗体またはそのフラグメント、および該ペプチドに結合する任意タンパク質

またはペプチド、例えばFLAGタグでありうる。

【0073】

本発明のポリペプチドは、それに対する抗体を産生させるための抗原として使用することが可能であり、THPの活性を調節する化合物をスクリーニングするために使用することが可能である。THPは組成物中で使用することができる。したがって、本発明は、医薬としての使用のための、本発明のTHPまたは抗体に関する。また、本発明は、癌または腫瘍（例えば、基底細胞癌）に対する医薬の製造における該分子の使用に関する。本発明の医薬として使用する分子は、本明細書に記載のポリペプチドまたは抗体、および本明細書に記載のスクリーニング方法において同定された任意の新規物質でありうる。

【0074】

もう一つの態様において、本発明は、付随する天然パターンのグリコシル化、アシル化、シアル酸化または他の翻訳後修飾を有する又は有さないTHPポリペプチドを提供する。酵母または哺乳類発現系（後記で考察する）内で発現されたTHPは、分子量およびグリコシル化パターンにおいて天然THPポリペプチドに類似しうる又は有意に異なりうる。もちろん、細菌発現系内でのTHPの発現は、非グリコシル化THPを与えるであろう。

【0075】

本発明のもう一つの態様は、前記ポリペプチドのいずれかと許容される担体または希釈剤とを含んでなる、医薬組成物を含む組成物に関する。好ましくは、該担体または希釈剤は医薬上許容されるものである。前記のポリペプチドを含む組成物は、例えば、抗体産生の誘導または免疫応答の誘導（例えば、ワクチン製剤で用いられる）に使用することができる。

【0076】

本発明のもう一つの態様は、配列番号5またはそのホモログもしくは断片を含むポリペプチドの製造方法であって、前記組換え発現ベクターのいずれかを和合性宿主細胞内に導入し、該ポリペプチドの発現のための条件下で該宿主細胞を培養し、該ポリペプチドを該宿主細胞から回収することを含んでなる製造方法に関する。真核細胞系が好ましい。なぜなら、それは、例えば、あるアミノ酸残基の

グリコシル化、カルボキシ末端アミド化、酸化または誘導体化、コンホメーション制御などをもたらす種々のプロセッシング機構を与えるからである。

【0077】

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、好ましくは、実質的に精製され、最も好ましくは、均一状態にまで精製される。好ましくは、宿主細胞を細胞溶解し、該ポリペプチドを該宿主細胞のライセートから回収する。あるいは、好ましくは、該宿主細胞を細胞溶解することなく該細胞培養培地を該宿主細胞から精製することにより、該ポリペプチドを回収する。該ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシル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を含む良く知られた方法により、組換え細胞培養から回収し、精製することができる。

【0078】

これらのタンパク質を組換え技術により製造することに加えて、自動アミノ酸合成装置を使用してT H Pポリペプチドまたはその断片もしくはホモログを得ることができる。

【0079】

本発明のもう1つの態様は、本明細書に記載のいずれかのポリペプチド上のエピトープに結合する抗体に関する。好ましくは、該抗体は配列番号5内のエピトープに結合する。本発明の抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであることが可能であり、個々の対立遺伝子株または種変異体、またはそれらのフラグメントを含み、それらは共に、それらの天然に存在する(完全長)形態および組換え形態でありうる。また、該抗体は、天然立体配置または非天然立体配置の本発明のタンパク質に対して産生させることができる。抗イディオタイプ抗体も産生させることができる。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、および該抗体自体は、該ポリペプチドの単離および精製に有用である。また、抗体はT H P活性の特異的インヒビターでありうる。本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、よく知られた技術および容易に入手可能な出発

物質を用いて天然源から該タンパク質を精製するために使用することができる。そのような抗体はまた、組換えDNA法により該タンパク質を製造する場合に存在する物質から該タンパク質を精製するために使用することができる。

#### 【0080】

抗体を製造する多数の方法が当業者に公知である。モノクローナル抗体を製造するための技術に関しては、例えば、Stitesら(編), Basic and Clinical Immunology (第4版), Lange Medical Publications, Los Altos, CA (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) およびそれに引用されている参考文献を参照されたい。ファージまたは同様のベクターにおける組換え抗体のライブラリーの選択を含む技術は、Huseら, Science, 1989, 246, 1275-1281 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) に記載されている。抗体の製造、および完全な無傷抗体、FabフラグメントおよびF(ab)<sub>2</sub>フラグメントのタンパク質構造、およびそのような分子をコードする遺伝子配列の構成は良く知られており、例えばHarlow, E. およびD. Lane (1988) ANTIBODIES: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. (それを参照により本明細書に組み入れることとする) にも記載されている。簡単に説明すると、例えば、本発明のポリペプチドをマウスに注入する。該マウスの脾臓を摘出し、該脾臓細胞を単離し、不死化マウス細胞と融合させる。該ハイブリッド細胞またはハイブリドーマを培養し、抗体を分泌する細胞を選択する。該抗体を分析し、該ポリペプチドに特異的に結合することが判明したら、それを産生するハイブリドーマを培養して、抗体の連続的供給源を得る。

#### 【0081】

本発明はまた、医薬キットを含むキットに関する。該キットは、前記THP核酸分子のいずれか、前記THPポリペプチドのいずれか、または前記の本発明のポリペプチドに結合するいずれかのTHP抗体と、陰性対照とを含みうる。該キットは、好ましくは、追加的成分、例えば、説明書、固体支持体、定量に有用な

試薬などを含む。

【0082】

本発明のもう1つの態様は、本発明のポリペプチドに対して哺乳動物において免疫応答を誘導する方法であって、免疫応答を誘導するのに十分な量の該ポリペプチドを該哺乳動物に投与することによる方法に関する。該量は、該動物種、該動物のサイズなどに左右されるが、当業者により決定されうる。

【0083】

本発明のもう1つの態様は、THPまたはそれをコードする核酸分子を化合物と接触させ、該化合物がTHPまたはそれをコードする核酸分子に結合するか否かを判定することを含んでなる、THPまたはTHPをコードする核酸分子に結合する化合物の同定方法に関する。結合は、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, 1999, John Wiley & Sons, NY (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に記載されているゲルシフトアッセイ、ウエスタンブロット、放射能標識競合アッセイ、ファージに基づく発現クローニング、クロマトグラフィーによる共分画 (co-fractionation)、共沈、架橋、相互作用トラップ/ツーハイブリッド分析、サウスウエスタン分析、ELISAなどを含む (これらに限定されるものではない) 当業者によく知られた結合アッセイにより測定することができる。スクリーニングする化合物 (それには、THPまたはそれをコードする核酸分子に結合すると疑われる化合物が含まれうる) には、細胞外、細胞内、生物または化学由来の化合物が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような試験で使用するTHPポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、溶液中で遊離している、または固体支持体に結合している、または細胞表面上に保持されている、または細胞間に位置していることが可能である。当業者は、例えば、THPと試験される化合物との複合体の形成を測定することができる。あるいは、当業者は、試験される化合物により引き起こされるTHPとその基質との複合体形成の減少を調べることができる。

【0084】

本発明のもう1つの態様は、THPを化合物と接触させ、該化合物がTHPの

活性を修飾するか否かを判定することを含んでなる、THPの活性を調節する（すなわち、増加または減少させる）化合物の同定方法に関する。該試験化合物の存在下での活性を測定し、該試験化合物の不存在下での活性と比較する。該試験化合物を含有するサンプルの活性が、該試験化合物を欠くサンプルにおける活性より高い場合、該化合物は増強活性を有する。同様に、該試験化合物を含有するサンプルの活性が、該試験化合物を欠くサンプルの活性より低い場合、該化合物は阻害活性を有する。

#### 【0085】

本発明は、種々の薬物スクリーニング技術のいずれかにおいてTHPを使用して化合物をスクリーニングするのに特に有用である。スクリーニングされる化合物（それには、THP活性を調節すると疑われる化合物が含まれる）には、細胞外、細胞内、生物または化学由来の化合物が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような試験で使用するTHPポリペプチドは、任意の形態でありうるが、好ましくは、溶液中で遊離している、または固体支持体に結合している、または細胞表面上に保持されている、または細胞間に位置している。当業者は、例えば、THPと試験される化合物との複合体の形成を測定することができる。あるいは、当業者は、試験される化合物により引き起こされるTHPとその基質との複合体形成の減少を調べることができる。

#### 【0086】

本発明のTHPポリペプチドの活性は、例えば、該試験化合物の存在下および不存在下での該ポリペプチドのADPリボシル化能を測定することにより測定することができる（Simoninら、J. Biol. Chem., 1993, 268, 8529（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする））。ADPリボシル化活性に関して試験するために、問題のポリペプチドを、放射能標識された基質（ $^{32}\text{P} - \text{NAD}^+$ ）および適当なタンパク質標的（例えば、TRF1）と共にインキュベートすることができる。ゲル電気泳動の際の放射能標識産物と該タンパク質標的との共泳動は、該タンパク質標的のADPリボシル化に関する、したがって問題のポリペプチドのPARP活性に関する陽性結果を示すであろう。PARP触媒活性に関しては、該アッセイを過剰の $^{32}\text{P} - \text{NAD}$

+の存在下で行なった場合の、より大きな及び種々のサイズのADPリボシル化産物の観察も予想されるであろう。問題のポリペプチド以外に由来する外因性PARP活性の可能性を除外するためには、陰性対照が保証される(すなわち、アッセイを不活性化ポリペプチドで、またはポリペプチドの不存在下で行なう)。ADPリボシル化産物とポリ(ADP-リボース)に対するモノクローナル抗体とを組合せ、ついで該抗原/抗体複合体を検出することにより、該タンパク質標的上のADP-リボース重合体の存在の証明を達成することができる。また、PARP様活性は、特異的PARPインヒビター(すなわち、3-ベンズアミド)をアッセイ実施に加えることにより確認することができ、ADPリボシル化活性の有意な阻害を引き起こすであろう。

#### 【0087】

本発明のもう1つの実施形態においては、本発明のTHPポリペプチドの活性を、例えば、ANK結合を測定することにより測定することができる。タンキラーゼ中のANKドメインはTRF1に結合し、アンキリン(タンパク質-タンパク質相互作用に一般に関与しているタンパク質)に対して有意な構造的相同性を有する。タンキラーゼのANKドメインとアンキリンとの両方は、33アミノ酸のANKモチーフの24個の縦列を含有し、より短い第5ANKコピーを含む微妙な変化を共有する。いわゆる「アンキリンリピートタンパク質」は、有意に更に少ないANKコピーを有し、これは、タンキラーゼが真のアンキリンであることを強調するものである。アミノ酸配列分析は、任意のポリペプチド中のANK機能的ドメインを同定する主要な手段でありうる。そして種々の結合アッセイおよび免疫学的アッセイ(すなわち、免疫沈降法)は、ANKドメインを潜在的に同定しうる。また、TRF-1結合アッセイは、該試験化合物の存在下および不存在下、本発明のポリペプチドで行なうことができる。

#### 【0088】

酵素活性を調べるためには、例えばEnzyme Assays: A Practical Approach, R. E. SenthallおよびM. J. Danson編, 1992, Oxford University Press(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に記載されている光分析

、放射分析、HPLC、電気化学的分析などを含む（これらに限定されるものではない）他のアッセイを用いることができる。THPの活性を測定するために用いることができる代表的アッセイは、例えば、Smithら, Science, 1998, 282, 1484-1487, Simoninら, J. Biol. Chem., 1993, 268, 8529-8535および米国特許第5,874,444号（それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に記載されている。

#### 【0089】

本発明の好ましい実施形態において、THP活性を調節する化合物に関するスクリーニング方法は、該化合物をTHPと接触させ、該化合物とTHPとの複合体の存在に関してアッセイすることを含む。そのようなアッセイにおいては、THPは、典型的には標識されている。適当なインキュベーション後、遊離THPを、結合形態で存在するものから分離する。遊離または未複合体化標識の量が、THPへのその特定の化合物の結合能の尺度である。

#### 【0090】

本発明のもう1つの実施形態においては、THPに対する適当な結合アフィニティを有する化合物に関するハイスループットスクリーニングを用いる。簡単に説明すると、多数の異なる小ペプチド試験化合物を固体基体上で合成する。該ペプチド試験化合物をTHPと接触させ、洗浄する。ついで、結合したTHPを、当技術分野でよく知られた方法により検出する。

#### 【0091】

また、本発明の精製されたポリペプチドを、前記薬物スクリーニング技術で用いるためのプレート上に直接的にコーティングすることができる。また、非中和抗体を使用して該タンパク質を捕捉し、それを該固体支持体上に固定化することができる。

#### 【0092】

本発明の他の実施形態は、本発明のポリペプチドに特異的に結合しうる中和抗体が該ポリペプチドへの結合に関して試験化合物と競合する競合スクリーニングアッセイを含む。このようにして、THPと1以上の抗原決定基を共有するいず

れかのペプチドの存在を検出するために、該抗体を使用することができる。放射能標識競合結合研究は、A. H. Linら *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, vol. 41, no. 10. pp. 2127 - 2131 (その開示の全体を参照により本明細書に組み入れることとする) に記載されている。

【0093】

本発明の他の実施形態においては、相互作用性調節タンパク質の同定、特徴づけ及び精製のための研究手段として、本発明のポリペプチドを使用する。当技術分野で公知の種々の方法により、適当な標識を本発明のポリペプチドに組み込み、該ポリペプチドを使用して相互作用性分子を捕捉する。例えば、分子を該標識ポリペプチドと共にインキュベートし、洗浄して未結合ポリペプチドを除去し、該ポリペプチド複合体を定量する。種々の濃度のポリペプチドを使用して得られたデータを用いて、該タンパク質複合体とのポリペプチドの会合、アフィニティーおよび数に関する値を計算する。

【0094】

標識ポリペプチドはまた、該ポリペプチドが相互作用する分子(インヒビターを含むが、これらに限定されるものではない)の精製のための試薬として有用である。アフィニティー精製の1つの実施形態においては、ポリペプチドをクロマトグラフィーカラムに共有結合させる。細胞およびその膜を抽出し、種々の細胞成分を該カラムに通過させる。分子は、該ポリペプチドに対するそのアフィニティーにより該カラムに結合する。該ポリペプチド-複合体を該カラムから回収し、解離させ、回収された分子をタンパク質配列決定に付す。ついでこのアミノ酸配列を用いて、該捕捉分子を同定したり、あるいは適当なcDNAライブラリーからの対応遺伝子のクローニングのための縮重オリゴヌクレオチドを設計する。

【0095】

あるいは、本発明のTHPに類似した特性を示すがTHPより小さくヒトまたは動物体内でTHPより長い半減期を示す化合物を同定することができる。有機化合物を設計する場合には、本発明の分子を「リード」化合物として使用する。

医薬的に活性な公知化合物の模擬体の設計は、そのような「リード」化合物に基づく医薬の開発における良く知られたアプローチである。目的の特性に関して非常に多くの分子を無作為にスクリーニングするのを避けるために、模擬設計、合成および試験が一般に用いられる。さらに、本発明のDNAにコードされる推定アミノ酸配列の解析から導かれた構造データは、より特異的であり従ってより高い薬理的効力を有する新規薬物の設計に有用である。

#### 【0096】

本発明のタンパク質配列と全ての入手可能なデータベース中に存在する配列との比較は、酵素PARPドメインに対する有意な相同性を示した。したがって、他のPARPドメインタンパク質の入手可能な情報に基づき本発明のタンパク質の推定三次構造体を開発するために、コンピューターモデリングを用いることができる。したがって、THPの推定構造に基づく新規酵素インヒビターを設計することができる。

#### 【0097】

特定の実施形態においては、本発明のスクリーニング方法により同定される新規分子は低分子量有機分子であり、この場合、錠剤などの経口摂取用のその組成物または医薬組成物を製造することができる。該核酸分子、ベクター、ポリペプチド、抗体および本明細書に記載のスクリーニング方法により同定された化合物を含有する、経口、静脈内、皮膚、皮下、鼻腔内、筋肉内または腹腔内を含む（これらに限定されるものではない）任意の投与経路用の組成物または医薬組成物を製造することができる。該担体または他の成分の性質は、具体的な投与経路および投与する本発明の特定の実施形態に左右されるであろう。この場合において有用な技術およびプロトコールの具体例は、とりわけ、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A (編), 1980 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に記載されている。

#### 【0098】

これらの低分子量化合物の投与量は、治療すべき病態または状態および他の臨床因子、例えばヒトまたは動物の体重および状態、ならびに該化合物の投与経路

に左右されるであろう。ヒトまたは動物を治療する場合には、約0.5 mg / kg 体重 ~ 500 mg / kg 体重の該化合物を投与することができる。治療は、典型的には、より低い投与量で行われ、所望の治療結果が認められるまで継続する。

#### 【0099】

核酸分子、ポリペプチド、抗体、化合物（本明細書に記載のスクリーニング方法により同定されたもの）を含む本発明の化合物および方法は種々の医薬用途を有し、例えば、無調節細胞増殖、例えば癌細胞および腫瘍の増殖を治療または予防するために使用することができる。特定の実施形態においては、本発明分子は遺伝子治療において使用することができる。遺伝子治療法の総説としては、例えば、Anderson, Science, 1992, 256, 808-813（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい。

#### 【0100】

本発明を明らかにすると意図される以下の実施例により、本発明を更に例示する。これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。本発明は、本明細書に特に記載されている以外の状態で実施されることが明らかであろう。本明細書中の教示を考慮して本発明の多数の修飾および変形が可能であり、したがってそれらは本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0101】

後記の実施例1~3は実例であり、実施例4~8は予想例である。

#### 【0102】

実施例1：ヒトタンキラーゼのホモログの同定

ヒトタンキラーゼのヌクレオチド配列（Gene Bank 受託番号AF082556）またはそれから推定されるアミノ酸配列を、Life Seq（商標）Assembledデータベース（Incyte Pharmaceuticals）に対する問合せ配列として使用した。このデータベースは、既に同定されている注釈付きの配列を含有するものであり、Gapped BLAST（Altschulら, Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389;そ

の全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を使用して類似性の領域に関して該データベースを検索した。

#### 【0103】

簡単に説明すると、BLASTアルゴリズム(Basic Local Alignment Search Toolを表す)は、配列類似性の判定に適している(Altschulら, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410)。BLAST解析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を介して公に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、データベース配列中の同じ長さのワード(単語)と整列させた場合にいくつかの陽性評価閾値スコアTに適合する又はそれを満足する問合せ配列中の長さWの短いワードを同定することにより高スコア配列ペア(HSP)を同定する。Tは近傍(neighbourhood)ワードスコア閾値(Altschulら, 前掲)と称される。これらの初期近傍ワードヒットは、それを含有するHSPを見出すための検索を開始するためのシード(種)として作用する。該ワードヒットは、累積アライメントスコアが増加しうるまで各配列に沿って両方向に伸長される。各方向への該ワードヒットに関する伸長は、1)該累積アライメントスコアがその最大達成値から量Xにより減少した場合、2)該累積スコアが1以上の陰性スコア残基アライメントの蓄積によりゼロ以下に達した場合、または3)いずれかの配列の末端に達した場合に停止する。BlastアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは、該アライメントの感度および速度を定める。該Blastプログラムは、11のワード長(W)、BLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoffら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする))を参照されたい)、50のアライメント(B)、10の期待値(E)、M=5、N=4および両鎖の比較をデフォルトとして用いる。

#### 【0104】

BLASTアルゴリズム(Karlinら, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 1993, 90, 5873-5787 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)) および Gapped BLAST は、2つの配列間の類似性の統計分析を実行する。BLAST アルゴリズムにより与えられる類似性の1つの尺度は最小和確率 (smallest sum probability) ( $P(N)$ ) であり、これは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のマッチが偶然生じる確率の指標を与える。例えば、試験核酸と Thp 核酸との比較における最小和確率が約 1 未満、好ましくは約 0.1 未満、より好ましくは約 0.01 未満、最も好ましくは約 0.001 未満である場合、核酸は Thp 遺伝子または cDNA に類似とみなされる。

#### 【0105】

問合せ配列としてのタンキラーゼヌクレオチド配列での LifeSeq (商標) Assembled データベースの検索は、該問合せ配列に対する統計的に有意な重複相同性を有する ID# 232670.2 を有する鋳型配列を同定した。鋳型 ID# 232670.2 により同定された配列は、従来、ヒトタンキラーゼに相同であるとは判明していなかった。

#### 【0106】

該重複類似性は、70%の全DNA配列類似性で整列する、鋳型 232670 の残基 1~1589 に匹敵するタンキラーゼ AF082556 の残基 2565~4165 に伸長した。AF082556 の残基 2565~4165 および鋳型 232670 の残基 1~1589 の推定アミノ酸配列は、80%の類似性で整列した。該類似性重複は、それらの2つの最もC末端側のANKリピート、SAMドメインおよびPARPドメインをコードするタンキラーゼの残基を含んでいた。また、鋳型 232670.2 は、公開されているタンキラーゼ配列 (AF082556) 中には存在しない、該重複の3'の配列の2310bpを含有していた。

#### 【0107】

Incyte 集合データベースにおいては、鋳型 232670.2 の最も5'側の末端配列は、Incyte ライブラリー UTR STM R01 由来の Incyte クローン 3206491 により与えられる。クローン 3206491 は 36

97bp長であると判明し、自動配列決定により完全に配列決定された。得られた配列は、nt. 1~3697の鋳型232670.2の配列を証明した。

#### 【0108】

##### 実施例2：Thp cDNAのクローニング

完全長THPをコードするcDNAクローンを単離するために、クローン3206491 nt1~660に対応するDNA断片を、ファージcDNAライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニング用のプローブとして使用した。該DNA断片をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。50mlの該PCR反応混合物は、ポリメラーゼ混合物(0.02mM dNTP, 1x PCRバッファーおよび0.75ml Expanded High Fidelity Polymerase (Roche Biochemicals)、1μgの3206491プラスミド、および50pmolのフォワードプライマー(GAGTATTTGTTACAACACGG)(配列番号1)および50pmolのリバースプライマー(AATCTCCTTCAGCTCCTT)(配列番号2)を含有していた。95℃で15秒間、52℃で30秒間および72℃で90秒間(25サイクルの反復)のプログラムを用いて、Applied Biosystems PE2400サーモサイクラー中で増幅を行なった。該増幅産物を、アガロースゲル電気泳動により該3206491から分離し、Qiaquickゲル抽出キット(Qiagen)により精製した。

#### 【0109】

ラムダZAPIIファージ-ベクター内にクローニングされたヒト脳(Stratagene cat.#936213)から単離されたcDNAを含有するラムダファージライブラリーを、大腸菌(E.coli)XL-1ブルー宿主と共に15cmのLB-寒天プレート上に50,000pfu/プレートの密度でプレーティングし、37℃で一晩培養した(Sambrookら(前掲)に記載のとおり)にプレーティングした)。ファージプラークをナイロンメンブレン(Amersham Hybond NJ)に転写し、変性溶液(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)中で2分間変性させ、再生溶液(1M Tris pH7.5, 1.5M NaCl)中で5分間再生させ、2xSSC(20xSS

C : 3M NaCl , 0.3M Na - クエン酸) 中で手短に洗浄した。フィルターメンブレンを乾燥させ、80 で120分間インキュベートして該ファージDNAを該メンブレンに架橋させた。

#### 【0110】

該メンブレンを、前記のとおり調製されたDNAプローブでハイブリダイズさせた。DNA断片(25ng)を、Rediprimeランダムプライミング(Amersham Pharmacia Biotech)を製造業者の指示に従い用いて、<sup>32</sup>P - dCTP(NEN)で標識した。標識DNAを、S200遠心カラム(Amersham Pharmacia Biotech)により未取込みヌクレオチドから分離し、95 で5分間変性させ、氷上に維持した。該DNA含有メンブレン(前記)を、50mlのExpressHyb(Clontech)溶液中、68 で90分間プレハイブリダイズさせた。ついで該標識DNAプローブを該ハイブリダイゼーション溶液に加え、該プローブを、68 で70分間、該メンブレンにハイブリダイズしたままとした。該メンブレンを、2×SSC、0.1% SDS中、42 で各5分間で5回洗浄し、最後に0.1×SSC、0.2% SDS中で30分間洗浄した。フィルターを、増感スクリーンと共にKodak XARフィルム(Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA)に-80 で16時間さらした。1つの陽性コロニーを該プレートから単離し、15cm LBプレート上に約1000 pfuで再プレーティングした。プレーティング、フィルターへのプラークのリフトおよびハイブリダイゼーションは、前記のとおりに行なった。4個の陽性ファージプラークをこの二次スクリーニングから単離した。

#### 【0111】

cDNA含有プラスミド(pBluescript SK-)を、製造業者(Stratagene)により記載されているとおり、該単離ファージとExcisionヘルパーファージとに同時感染したXL-1ブルー細胞を培養することによるインビボ切除により、該単離ファージからレスキューした。該プラスミドを含有するXL-1ブルー細胞をLBプレート上にプレーティングし、37 で16時間培養した。各プレートからのコロニー(18)をLBプレート上に再プ

レーティングし、培養した。各プレートからの1つのコロニーを、順序良くナイロンフィルター上に付着させ、該フィルターをLBプレート上に配置して該コロニーを持ち上げた。ついで該フィルターを、前記のとおりに標識プローブでハイブリダイズさせた。3個の陽性コロニーを選択し、LB培地内で培養した。それらの3個のクローンから、製造業者の指示に従うQiagen Midi Kit (Qiagen)によりプラスミドDNAを単離した。該プラスミドを制限酵素Not IおよびSal Iで消化することにより、該インサートのサイズを測定し、それにより、約4500bpのインサートサイズが確認された。該全インサートの配列を、該プラスミドの両鎖上の自動配列決定により決定し、それを配列番号3に示す。該配列は、配列番号5に示すとおりポリペプチド(1166アミノ酸残基長)をコードする23~3520位のオープンリーディングフレーム(配列番号4)を含有する。配列番号3を含有するプラスミド(pCF497)は、American Type Culture Collection(ATCC)に1999年5月10日付けで寄託されており、受託番号PTA-35が付与されている。

#### 【0112】

##### 実施例3：ノーザンブロット分析

ノーザンブロットを行なって、mRNAの発現を調べた。センス配向オリゴヌクレオチド5'-CCCGAGAGCTGTTTCGAGGC(配列番号6)を5'-CAATCTTTACTCTGTTATATCCT-3'(配列番号7)と共にプライマーとして使用して、配列番号3のTHP cDNA配列の一部を増幅した。96~701位の606塩基対長の断片を増幅し、プローブとして使用した。

#### 【0113】

Clontechからの多ヒト組織ノーザンブロット(Human II #7767-1)を該プローブでハイブリダイズさせた。プレハイブリダイゼーションを、5×SSC、1×デンハルト試薬、0.1% SDS、50%ホルムアミド、250mg/ml サケ精子DNA中、42℃で4時間行なった。ハイブリダイゼーションを、同じ混合物中、約 $1.5 \times 10^6$  cpm/mlの標識プ

ローブの添加により、42 で一晩行なった。

#### 【0114】

該プローブを、Rediprime DNA標識系 (Amersham Pharmacia) により  $-^{32}\text{P}$ -dCTPで標識し、Nick Column (Amersham Pharmacia) 上で精製し、該ハイブリダイゼーション溶液に加えた。該フィルターを、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\%$  SDS中、42 で数回洗浄した。フィルターを、増感スクリーンと共にKodak XARフィルム (Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA) に  $-80$  でさらした。

#### 【0115】

単一の7kbのmRNAを、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および膵臓を含む分析した全ての組織内で発現させる。該発現は、胎盤および骨格筋 (これらは、その他の組織と比較して発現レベルにおける約2倍の増加を示す) を除く全ての組織においてかなり一定している。すべてのレーンの等しいローディングが、ヒトGAPDHプローブでのフィルターハイブリダイゼーションにより証明された (データは示していない)。

#### 【0116】

実施例4：哺乳類細胞内でのTHPの発現

##### 1. 293細胞内でのTHPの発現

哺乳類細胞293細胞 (形質転換ヒト初代胎児腎細胞) 内でのTHPの発現のために、ベクターpcDNA3.1 myc-his (Invitrogen) を使用して、関連THPコード配列を保持するプラスミドを調製する。該プラスミドは配列番号3のヌクレオチド17~3513を含有する。ベクターpcDNA3.1は、抗myc抗体での該組換えタンパク質の検出のためのc-mycエピトープ、ニッケルキレートクロマトグラフィーでの精製のためのC末端ポリヒスチジン、および安定なトランスフェクト体の選択のためのネオマイシン耐性遺伝子を含有する。このTHP cDNAの増幅のためのフォワードプライマーは、該THP配列にマッチする22ヌクレオチド (配列番号3のヌクレオチド17~38) およびNotIクローニング部位を導入するための19ヌクレオチドの

5'伸長を含有する5'-AAGCGGCCGCATTATGGAAAGGATCATGTCGGGTTCGCCGCT-3'(配列番号8)である。該リバースプライマーは、配列番号3の塩基3497~3513のTHP配列の逆相補体に対応する17ヌクレオチドおよびクローニング用のBamH1制限部位を導入するための8ヌクレオチドの5'伸長を含有する5'-AAGGATCCACCA TACCTTCAGGCCT-3'(配列番号9)である。該PCR条件は、アニーリング温度としての55である。該PCR産物をゲル精製し、該ベクターのNotI-BamH1部位内に導入する。

#### 【0117】

該DNAを、Qiagenクロマトグラフィーカラムを使用して精製し、SUPERFACTトランスフェクション媒体(Qiagen)を使用して293細胞内にトランスフェクトする。一過性にトランスフェクトされた細胞を、抗Hisおよび抗THPペプチド抗体でプローブするウエスタンブロットを用いて、トランスフェクションの24時間後の発現に関して試験する。恒久的にトランスフェクトされた細胞をG418で選択し、増殖させる。該組換えタンパク質の産生は、抗His、抗Mycまたは抗THPペプチド抗体でプローブするウエスタンブロットにより、細胞から検出される。

#### 【0118】

##### 2. COS細胞内でのTHPの発現

COS7細胞内でのTHPの発現のために、配列番号3のヌクレオチド17~3513として与えられた配列を有するポリヌクレオチド分子をベクターpSecTag2A内にクローニングした。ベクターpSecTag2Aは、分泌のためのマウスIgG鎖リーダー配列、抗myc抗体での該組換えタンパク質の検出のためのc-mycエピトープ、ニッケルキレート化クロマトグラフィーでの精製のためのC末端ポリヒスチジン、および安定なトランスフェクト体の選択のためのゼオシン(Zeocin)耐性遺伝子を含有する。

#### 【0119】

該フォワードプライマーは、5'-AAAAGCTTTATGGAAAGGATCATGTCGGGTTCGCCGCTGC-3'(配列番号10)である。こ

のプライマーの最初の15ヌクレオチドは、クローニング用のHindIII制限部位を導入する5'伸長を構成し、それに続いて、配列番号3で与えられた配列のヌクレオチド残基17~38に対応する22ヌクレオチドが位置する。該リバースプライマーは配列番号19である。このプライマーは、BamHIクローニング部位を導入する8ヌクレオチドおよびそれに続く、配列番号3に与えられた配列の塩基3497~3513の逆相補体に対応する17ヌクレオチドの5'伸長を含有する。

#### 【0120】

該PCRは、95℃で5分間の初期変性工程、30サイクルの95℃で30秒間の変性、58℃で30秒間のアニーリングおよび72℃で30秒間の伸長、ならびにそれに続く72℃で5分間の伸長よりなる。該PCR産物をゲル精製し、ベクターp3-CIのXbaIおよびSalI部位内に連結する。この構築物を、増幅およびDNA精製のために大腸菌(E.coli)細胞内に形質転換する。該DNAをQiagenクロマトグラフィーカラムで精製し、BRLからのLipofectamine試薬を製造業者のプロトコールに従い使用してCOS7細胞内にトランスフェクトする。トランスフェクションの48および72時間後、該培地および該細胞を組換えタンパク質の発現に関して試験する。

#### 【0121】

該細胞培養培地を10mgのタンパク質/mlまで濃縮し、該タンパク質を例えばクロマトグラフィーにより精製することにより、COS細胞培養から発現されたTHPを精製する。精製されたTHPを、YM-10メンブレンを備えたAmicon濃縮器中、0.5mg/mlまで濃縮し、-80℃で保存する。

#### 【0122】

##### 実施例5：昆虫細胞内でのTHPの発現

バキュロウイルス系におけるTHPの発現のために、配列番号3のヌクレオチド17~3513として与えられた配列を有するポリヌクレオチド分子をPCRにより増幅した。該フォワードプライマーは配列番号8である。このプライマーの最初の19ヌクレオチドは、NotIクローニング部位を付加する5'伸長を構成し、それに続いて、配列番号3で与えられる配列のヌクレオチド残基17~

38に対応する22ヌクレオチドが位置する。該リバースプライマーは配列番号9である。このプライマーの最初の8ヌクレオチドは、BamHIクローニング部位を導入する5'伸長を構成し、それに続いて、配列番号3で与えられる配列のヌクレオチド残基3497~3513の逆相補体に対応する17ヌクレオチドが位置する。

#### 【0123】

該PCR産物をゲル精製し、NdeIおよびKpnIで消化し、ベクターpAcHTL-A(Pharmingen, San Diego, CA)の対応部位内にクローニングする。該pAcHTL発現ベクターは、オートグラファカリフォルニカ核多角体ウイルス(AcMNPV)の強力なポリヘドリンプロモーター、および該マルチクローニング部位の上流の6xHisタグを含有する。該マルチクローニング部位の前に、リン酸化のためのプロテインキナーゼ部位および該組換えタンパク質の切り出しのためのトロンビン部位も存在する。もちろん、pAcHTL-Aの代わりに多数の他のバキュロウイルスベクター(例えば、pAc373、pVL941およびpAcIM1)を使用することが可能であろう。THPポリペプチドの発現のための他の適当なベクターを使用することが可能であるが、これは、該ベクター構築物が、必要に応じて、転写、翻訳およびトランスフィッキングのための適当に位置するシグナル(例えば、インフレームAUGおよびシグナルペプチド)を含む場合に限られる。そのようなベクターは、とりわけ、Luckowら, *Virology* 170:31-39に記載されている。

#### 【0124】

標準的なバキュロウイルス発現法、例えば、Summersら(A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No.1555(1987))に記載の方法を用いて、該ウイルスを増殖させ単離する。

#### 【0125】

好ましい実施形態においては、「BaculoGold」トランスフェクショ

ンキット (Pharmingen, San Diego, CA) を該製造業者により確立された方法を用いて使用して、該THP遺伝子を含有するpAcHLT-Aをバキュロウイルス内に導入する。感染の24時間後に感染細胞を<sup>35</sup>S-メチオニンで放射能標識することにより、個々のウイルス単離物をタンパク質産生に関して分析する。感染細胞を感染の48時間後に回収し、該標識タンパク質をSDS-PAGEにより可視化する。高い発現レベルを示すウイルスを単離し、大規模発現に使用することができる。

#### 【0126】

Sf9細胞内でのTHPポリペプチドの発現のためには、配列番号3のヌクレオチド17~3513として与えられる配列を有するポリヌクレオチド分子を、バキュロウイルスに関して前記したプライマーおよび方法を用いて、PCRにより増幅する。該THP cDNAを、Sf9昆虫における発現のためのベクターpAcHLT-A (Pharmingen) 内にクローニングする。内部NdeI部位の除去 (バキュロウイルスにおける発現に関して前記したのと同じプライマーを使用する) の後、該インサートを該NotIおよびBamH1部位内にクローニングする。DNAをQiagenクロマトグラフィーカラムで精製し、Sf9細胞内で発現させる。未精製プラークについて予備のウエスタンブロットを行い、THP特異的抗体と反応した予想されるサイズの組換えタンパク質の存在を確認する。これらの結果を、HiG5細胞を更に精製しおよび発現を最適化した後に確認した。

#### 【0127】

##### 実施例6：トラップ/ツ-ハイブリッド系の相互作用

THP相互作用性タンパク質に関してアッセイするために、相互作用トラップ/ツ-ハイブリッドライブラリースクリーニング法を用いることができる。このアッセイは、Fieldsら, Nature, 1989, 340, 245 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) に最初に記載された。プロトコールは、Current Protocols in Molecular Biology 1999, John Wiley & Sons, NYおよびAusubel, F.M.ら 1992, Short protocols

in molecular biology, 第4版, Greene and Wiley - interscience, NY (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) に公開されている。キットは、Clontech, Palo Alto, CA (Matchmaker Two-Hybrid System 3) から入手可能である。

【0128】

全部または一部のTHPと酵母転写因子GAL4 DNA結合ドメイン(DNA-BD)とをコードするヌクレオチド配列の融合体を、標準的なサブクローニング技術を用いて適当なプラスミド(すなわち、pGBKT7)において構築する。同様に、潜在的THP結合タンパク質のcDNAから、第2プラスミド(すなわち、pGADT7)において、GAL4活性ドメイン(AD)融合ライブラリーを構築する(cDNAライブラリーの生成についてのプロトコールに関しては、Sambrookら, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) を参照されたい)。該DNA-BD/THP融合構築物を配列決定により確認し、共にツーハイブリッド分析の達成を妨げる自律性レポーター遺伝子活性化および細胞毒性に関して試験する。宿主細胞内での発現および転写活性の欠如を確実にするため、同様の制御をAD/ライブラリー融合構築物で行なう。該THPおよびライブラリー融合プラスミドを標準的方法(Ausubelら, 1992, Short protocols in molecular biology, 第4版, Greene and Wiley - interscience, NY (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)) に従い使用して、酵母細胞を形質転換する(約 $10^5$ 形質転換体/mg DNA)。DNA-BD/THPとAD/ライブラリータンパク質とのインビボ結合は、特異的酵母プラスミドレポーター遺伝子(すなわち、lacZ、HIS3、ADE2、LEU2)の転写をもたらす。酵母細胞を栄養欠損培地上にプレーティングして、レポーター遺伝子の発現に関してスクリーニングする。Xgal(5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-

- D - ガラクトシド) で補足された培地内での培養に際して、 - ガラクトシダーゼ活性に関して、コロニーを二重にアッセイする( - ガラクトシダーゼに関するフィルターアッセイは、Breedenら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1985, 50, 643 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) に記載されている)。陽性AD - ライブラリープラスミドを形質転換体からレスキューし、元の酵母株と無関係なDNA - BD融合タンパク質を含有する他の株とに再導入して、特異的THP / ライブラリータンパク質相互作用を確認する。インサートDNAを配列決定して、GAL4 ADに融合したオープンリーディングフレームの存在を確認し、該THP結合タンパク質の同一性を確認する。

#### 【0129】

##### 実施例7：ゲル電気泳動を用いる移動度シフトDNA結合アッセイ

ゲル電気泳動移動度シフトアッセイは、特異的タンパク質 - DNA相互作用を迅速に検出する。プロトコールは、Sambrookら, 1989, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubel, F.M.ら 1992, Short protocols in molecular biology, 第4版, Greene and Wiley - interscience, NY (それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする) などのマニュアルにおいて広く利用可能である。

#### 【0130】

プローブDNA (< 300 bp) を、合成オリゴヌクレオチド、制限エンドヌクレアーゼ断片またはPCR断片から入手し、<sup>32</sup>Pで末端標識する。精製されたTHP (約15 µg) または粗THP抽出物 (約15 ng) のアリコート、放射能標識プローブDNA、非特異的担体DNA (約1 µg)、BSA (300 µg/ml) および10% (v/v) グリセロールを含有する10~15 µlのバッファー (すなわち、TAEまたはTBE, pH 8.0~8.5) 中、一定温度 (22~37 の範囲) で少なくとも30分間インキュベートする。ついで該

反応混合物をポリアクリルアミドゲル上にローディングし、タンパク質 - DNA 複合体からの遊離プローブDNAの良好な分離が生じるまで30 ~ 35 mAで泳動させる。ついで該ゲルを乾燥させ、遊離DNAとタンパク質 - DNA複合体とに対応するバンドをオートラジオグラフィーにより検出する。

#### 【0131】

実施例8：THP活性を調節する化合物を同定するためのアッセイ

THPは、PARPドメインの活性により自己ポリ[ADP]リボシル化する。このTHP活性に関してスクリーニングするために、バキュロウイルスにおいて発現されたTHPを使用する(実施例5を参照されたい)。4 µgのTHPを、100 µlのアッセイバッファー(50 mM Tris, pH 8.0, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM DTT)中、1.3 µM <sup>32</sup>P標識NAD<sup>+</sup>と共に25 で30分間インキュベートする。<sup>32</sup>P標識NAD<sup>+</sup>の取込みを、20% TCAの添加によるTCA沈殿、およびガラス繊維上への不溶性物質の濾過による収集により測定する。該フィルターを流体 - カウンター中のシンチレーション計数により計数し、得られた計数をTHP PARP活性の尺度として用いる。また、この同じアッセイを、例えば、THP PARPインヒビターである小分子に関して大きな化合物ライブラリーをスクリーニングするために用いることができる。

#### 【0132】

前記の本発明の好ましい実施形態のいくつかは、後記で大まかに説明されており、以下の実施形態を含むが、これらに限定されるものではない。当業者に理解されるとおり、本発明の精神から逸脱することなく、本発明の好ましい実施形態に多数の変更および修飾を施すことが可能である。そのようなすべての変形が本発明の範囲内に含まれると意図される。本明細書に引用されている各刊行物の全開示を参照により本明細書に組み入れることとする。

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacia & Upjohn S.p.A, et al

<120> Tankyrase Homolog Protein (THP), Nucleic Acids, and  
Methods Related To The Same

<130> REP06471WO

<140> not yet known

<141> 2000-07-03

<150> 09/350,982

<151> 1999-07-09

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primers

<400> 1

gagtatttgt tacaacacgg

20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primers

<400> 2

aatctccttc agctcctt

18

<210> 3

<211> 4512

<212> DNA

<213> Homo sapien

<220>  
 <221> unsure  
 <222> (1124)  
 <223> n is any base

<220>  
 <221> unsure  
 <222> (2672)  
 <223> n is any base

<400> 3

```

.gaatccgcg gcgccagga tcatgtcggg tgcgctgc gccggcggg gagcggcctg 60
cgcgagcgcc gcgccagag ccgtggagcc ggccgcccga gagctgttcg aggcgtgccg 120
caacggggac gtggaacgag tcaagaggct ggtgacgctt gagaagggtg acagccgcca 180
cacggcgggc aggaaatcoa ccccgcgtca cctcgccgca ggttttgggc ggaaagacgt 240
agttgaatat ttgcttcaga atggtgcaaa tgtccaagca cgtgatgatg ggggccttat 300
tcctcttcat aatgcatgct cttttggtca tgcgtaagta gtcaatctcc ttttgcgaca 360
tgggtcagac cccaatgctc gagataattg gaattatact cctctccatg aagctgcaat 420
taaaggaaaag attgatgttt gcattgtgct gttacagcat ggagctgagc caaccatccg 480
aaatacagat ggaaggacag cattggattt agcagatcca tctgccaagc cagtgcctac 540
tgggtgaatat aagaaagatg aactcttaga aagtgccagg agtggcaatg aagaaaaaat 600
gatggctcta ctacacccat taaatgtcaa ctgccacgca agtgatggca gaaagtcaac 660
tccattacat ttggcagcag gatataacag agtaaagatt gtacagctgt tactgcaaca 720
tggagctgat gtccatgcta aagataaagg tgatctggtt ccattacaca atgcctgttc 780
ttatggctat tatgaagtaa ctgaactttt ggtcaagcat ggtgcctgtg taaatgcaat 840
ggacttgtgg caattcactc ctcttcatga ggcagcttct aagaacaggg ttgaagtatg 900
ttctcttctc ttaagttatg gtgcagaccc aacactgctc aattgtcaca ataaaagtgc 960
tatagacttg gctcccacac cacagttaaa agaagatta gcatatgaat ttaaaggcca 1020
ctcgttctg caagctgcac gagaagctga tgttactcga atcaaaaaac atctctctct 1080
ggaaatggtg aatttcaagc atcctcaaac acatgaaaca gcantgcatt gtgctgctgc 1140
atctccatat cccaaaagaa agcaaatatg tgaactgttg ctaagaaaag gagcaamcat 1200
caatgaaaag actaaagaat tcttgactcc tctgcacgtg gcatctgaga aagctcataa 1260
tgatrttgtt gaagtagtgg tgaaacatga agcaaaggtt aatgctctgg ataacttgg 1320
tcagacttct ctacacagag ctgcatattg tggcatccta caaacctgcc gcctactcct 1380
gagctatggg tgtgatccta acattatata ccttcagggc tttactgctt tacagatggg 1440
aaatgaaaat gtacagcaac tcctccaaga gggatatctc ttaggtaatt cagaggcaga 1500
cagacaattg ctggaagctg caaaggctgg agatgtcgaa actgtaaaaa aactgtgtac 1560
tgttcagagt gtcaactgca gagacattga agggcgtcag tctacaccac ttcattttgc 1620
agctgggtat aacagagtgt ccgtggtgga atatctgcta cagcatggag ctgatgtgca 1680
tgctaaagat aaagrrgsec ttgtaccttt gcacaatgca tgttcttatg gacattatga 1740
agttgcagaa cttcttgtaa aacatggagc agtagttaat gtagctgatt tatggaaatt 1800
tacaccttta catgaagcag cagcaaaaag aaaatatgaa atttgcaaac ttctgtcca 1860
gcatggtgca gaccctacaa aaaaaaacag ggatggaaat actcctttgg atcttgtaa 1920
agatggagat acagatattc aagatctgct tagggagat gcagctttgc tagatgctgc 1980
caagaagagt tgtttagcca gagtgaagaa gttgtctct cctgataatg taaattgccg 2040
cgatacccaa ggcagacatt caacaccttt acatttagca gctgggtata ataatttaga 2100
agttgcagag tatttgttac aacacggagc tgatgtgaat gcccaagaca aaggaggact 2160
tattccttta cataatgcag catcttacgg gcatgtagat gtagcagctc tactaataaa 2220

```

```

gtataatgca tgtgtcaatg ccacggacaa atgggcttgc acacctttgc acgaagcagc 2280
ccaaaaggga cgaacacagc tttgtgcttt gktgctagcc catggagctg acccgactct 2340
taaaaatcag gaaggacaaa cacctttaga tttagtttca gcggatgatg tcagcgctct 2400
tctgacagca gccatgcccc catctgctct gccctcttgt tacaagcctc aagtgtctca 2460
tgggtgtgaga agcccaggag ccaactgcaga tgcctctctc tcaggtccat ctagcccatc 2520
aagcctttct gcagccagca gtcttgacaa cttatctggg agtttttcag aactgtcttc 2580
agtagttagt tcaagtggaa cagaggggtc ttccagtttg gagaaaaagg aggttccagg 2640
agtagatttt agcataactc aattcgttaag gnatcttggc cttgagcacc taatggatat 2700
at ttgagaga gaacagatca ctttggatgt attagttgag atggggcaca aggagctgaa 2760
ggagattgga atcaatgctt atggacatag gcacaaacta attaaaggag tcgagagact 2820
tatctccgga caacaaggtc ttaaccata ttttaacttg aacacctctg gtatgtgaaac 2880
aattcttata gatctgtctc ctgatgataa agagtttcag tctgtggagg aagagatgca 2940
aagtacagtt cgagagcaca gagatggagg tcatgcaggt ggaatcttca acagatacaa 3000
tattctcaag attcagaagg tttgtaacaa gaaactatgg gaaagataca ctcaccggag 3060
aaaagaagtt tctgaagaaa accacaacca tgccaatgaa cgaatgctat ttcattgggtc 3120
tccttttgtg aatgcaatta tccacaaggg ctttgatgaa aggcattgcgt acataggtgg 3180
tatgtttggg gctggcattt attttctga aaactcttcc aaaagcaatc aatattgata 3240
tggaaattgga ggaggactg ggtgtccagt tcacaaagac agatcttggt acatttgcca 3300
caggcagctg ctcttttggc gggtaacctt gggaaagtct ttcctgcagt tcagtgcaat 3360
gaaaatggca cattctctc caggtcacac ctcagtcact ggtaggccca gtgtaaattg 3420
cctagcatta gctgaatatg ttatttacag aggagaacag gcttatcctg agtatttaat 3480
tacttaccag attatgaggc ctgaaggat ggtcagtgga taaatagtta ttttaagaaa 3540
ctaattccac tgaacctaaa atcatcaaag cagcagtgcc ctctacgttt tactcctttg 3600
ctgaaaaaaaa atcatcttgc ccacaggcct gtggcaaaag gataaaaatg tgaacgaagt 3660
ttaacattct gacttgataa agctttaata atgtacagtg ttttctaat atttctgtt 3720
ttttcagcac tttaacagat gccattccag gttaaactgg gttgtctgta ctaaattata 3780
aacagagtta acttgaacct tttatatgtt atgcattgat tctaacaaac tgtaatgcc 3840
tcaacagaac taattttact aatacaatac tgtgttcttt aaaacacagc atttactctg 3900
aatacaattt catttgtaaa actgtaaata agagcttttg tactagccca gtatttattt 3960
acattgcttt gtaatataaa tctgttttag aactgcagcg gtttacaaa tttttcata 4020
tgtattgttc atctatactt gcactttaca tcgtcatgat tgagtgatct ttacatttga 4080
ttccagaggc tatgttcagt tgttagttgg gaaagattga gttatcagat ttaatttggc 4140
gatgggagcc tttatctgtc attagaaatc tttctcattt aagaacttat gaatatgctg 4200
aagatttaat ttgtgatacc tttgtatgta tgagacacat tccaaagAAC tctaactatg 4260
ataggtcctg attactaaag aagcttcttt actggcctca atttctagct ttcattgttg 4320
aaaattttct gcagtccttc tgtgaaaatt agagcaaggt gctcctgttt tttagagaaa 4380
ctaaatcttg ctgttgaaca attattgtgt tcttttcatg gaacataagt aggatgttac 4440
at tccaggg tggaagggt aatcctaaat catttcccaa tctattctaa ttaccttaaa 4500
tctaaagggg aa 4512

```

<210> 4

<211> 3498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3498)  
<223> CDS

<220>  
<221> unsure  
<222> (1102)  
<223> n is any base

<220>  
<221> unsure  
<222> (2650)  
<223> n is any base

<220>  
<221> unsure  
<222> (368)  
<223> Xaa is Met or Leu or Val

<220>  
<221> unsure  
<222> (392)  
<223> Xaa is Asn or Thr

<220>  
<221> unsure  
<222> (415)  
<223> Xaa is Val or Ile

<220>  
<221> unsure  
<222> (558)  
<223> Xaa is Gly or Glu

<220>  
<221> unsure  
<222> (559)  
<223> Xaa is Gly or Ala

<220>  
<221> unsure  
<222> (764)  
<223> Xaa is Leu or Val

<220>  
<221> unsure  
<222> (884)  
<223> Xaa is Asn or His or Asp or Tyr

<400> 4  
atg tcg ggt cgc cgc tgc gcc ggc ggg gga gcg gcc tgc gcg agc gcc 48  
Met Ser Gly Arg Arg Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Ala Ser Ala  
1 5 10 15  
gcg gcc gag gcc gtg gag ccg gcc gcc cga gag ctg ttc gag gcg tgc 96  
Ala Ala Glu Ala Val Glu Pro Ala Ala Arg Glu Leu Phe Glu Ala Cys  
20 25 30  
cgc aac ggg gac gtg gaa cga gtc aag agg ctg gtg acg cct gag aag 144  
Arg Asn Gly Asp Val Glu Arg Val Lys Arg Leu Val Thr Pro Glu Lys  
35 40 45  
gtg aac agc cgc gac acg gcg ggc agg aaa tcc acc ccg ctg cac ctc 192  
Val Asn Ser Arg Asp Thr Ala Glu Arg Lys Ser Thr Pro Leu His Leu  
50 55 60  
gcc gca ggt ttt ggg cgg aaa gac gta gtt gaa tat ttg ctt cag aat 240  
Ala Ala Gly Phe Gly Arg Lys Asp Val Val Glu Tyr Leu Leu Gln Asn  
65 70 75 80  
ggt gca aat gtc caa gca cgt gat gat ggg ggc ctt att cct ctt cat 288  
Gly Ala Asn Val Gln Ala Arg Asp Asp Gly Gly Leu Ile Pro Leu His  
85 90 95  
aat gca tgc tct ttt ggt cat gct gaa gta gtc aat ctc ctt ttg cga 336  
Asn Ala Cys Ser Phe Gly His Ala Glu Val Val Asn Leu Leu Leu Arg  
100 105 110  
cat ggt gca gac ccc aat gct cga gat aat tgg aat tat act cct ctc 384  
His Gly Ala Asp Pro Asn Ala Arg Asp Asn Trp Asn Tyr Thr Pro Leu  
115 120 125  
cat gaa gct gca att aaa gga aag att gat gtt tgc att gtg ctg tta 432  
His Glu Ala Ala Ile Lys Gly Lys Ile Asp Val Cys Ile Val Leu Leu  
130 135 140  
cag cat gga gct gag cca acc atc cga aat aca gat gga agg aca gca 480  
Gln His Gly Ala Glu Pro Thr Ile Arg Asn Thr Asp Gly Arg Thr Ala  
145 150 155 160  
ttg gat tta gca gat cca tct gcc aaa gca gtg ctt act ggt gaa tat 528  
Leu Asp Leu Ala Asp Pro Ser Ala Lys Ala Val Leu Thr Gly Glu Tyr  
165 170 175  
aag aaa gat gaa ctc tta gaa agt gcc agg agt ggc aat gaa gaa aaa 576  
Lys Lys Asp Glu Leu Leu Glu Ser Ala Arg Ser Gly Asn Glu Glu Lys  
180 185 190

atg atg gct cta ctc aca cca tta aat gtc aac tgc cac gca agt gat	624
Met Met Ala Leu Leu Thr Pro Leu Asn Val Asn Cys His Ala Ser Asp	
195 200 205	
ggc aga aag tca act cca tta cat ttg gca gca gga tat aac aga gta	672
Gly Arg Lys Ser Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gly Tyr Asn Arg Val	
210 215 220	
aag att gta cag ctg tta ctg caa cat gga gct gat gtc cat gct aaa	720
Lys Ile Val Gln Leu Leu Leu Gln His Gly Ala Asp Val His Ala Lys	
225 230 235 240	
gat aaa ggt gat ctg gta cca tta cac aat gcc tgt tct tat ggt cat	768
Asp Lys Gly Asp Leu Val Pro Leu His Asn Ala Cys Ser Tyr Gly His	
245 250 255	
tat gaa gta act gaa ctt ttg gtc aag cat ggt gcc tgt gta aat gca	816
Tyr Glu Val Thr Glu Leu Leu Val Lys His Gly Ala Cys Val Asn Ala	
260 265 270	
atg gac ttg tgg caa ttc act cct ctt cat gag gca gct tct aag aac	864
Met Asp Leu Trp Gln Phe Thr Pro Leu His Glu Ala Ala Ser Lys Asn	
275 280 285	
agg gtt gaa gta tgt tct ctt ctc tta agt tat ggt gca gac cca aca	912
Arg Val Glu Val Cys Ser Leu Leu Leu Ser Tyr Gly Ala Asp Pro Thr	
290 295 300	
ctg ctc aat tgt cac aat aaa agt gct ata gac ttg gct ccc aca cca	960
Leu Leu Asn Cys His Asn Lys Ser Ala Ile Asp Leu Ala Pro Thr Pro	
305 310 315 320	
cag tta aaa gaa aga tta gca tat gaa ttt aaa ggc cac tcg ttg ctg	1008
Gln Leu Lys Glu Arg Leu Ala Tyr Glu Phe Lys Gly His Ser Leu Leu	
325 330 335	
caa gct gca cga gaa gct gat gtt act cga atc aaa aaa cat ctc tct	1056
Gln Ala Ala Arg Glu Ala Asp Val Thr Arg Ile Lys Lys His Leu Ser	
340 345 350	
ctg gaa atg gtg aat ttc aag cat cct caa aca cat gaa aca gca ntg	1104
Leu Glu Met Val Asn Phe Lys His Pro Gln Thr His Glu Thr Ala Xaa	
355 360 365	
cat tgt gct gct gca tct cca tat ccc aaa aga aag caa ata tgt gaa	1152
His Cys Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Pro Lys Arg Lys Gln Ile Cys Glu	
370 375 380	

ctg ttg cta aga aaa gga gca amc atc aat gaa aag act aaa gaa ttc	1200
Leu Leu Leu Arg Lys Gly Ala Xaa Ile Asn Glu Lys Thr Lys Glu Phe	
385	390 395 400
ttg act cct ctg cac gtg gca tct gag aaa gct cat aat gat rtt gtt	1248
Leu Thr Pro Leu His Val Ala Ser Glu Lys Ala His Asn Asp Xaa Val	
	405 410 415
gaa gta gtg gtg aaa cat gaa gca aag gtt aat gct ctg gat aat ctt	1296
Glu Val Val Val Lys His Glu Ala Lys Val Asn Ala Leu Asp Asn Leu	
	420 425 430
ggt cag act tct cta cac aga gct gca tat tgt ggt cat cta caa acc	1344
Gly Gln Thr Ser Leu His Arg Ala Ala Tyr Cys Gly His Leu Gln Thr	
	435 440 445
tgc cgc cta ctc ctg agc tat ggg tgt gat cct aac att ata tcc ctt	1392
Cys Arg Leu Leu Leu Ser Tyr Gly Cys Asp Pro Asn Ile Ile Ser Leu	
	450 455 460
cag ggc ttt act gct tta cag atg gga aat gaa aat gta cag caa ctc	1440
Gln Gly Phe Thr Ala Leu Gln Met Gly Asn Glu Asn Val Gln Gln Leu	
	465 470 475 480
ctc caa gag ggt atc tca tta ggt aat tca gag gca gac aga caa ttg	1488
Leu Gln Glu Gly Ile Ser Leu Gly Asn Ser Glu Ala Asp Arg Gln Leu	
	485 490 495
ctg gaa gct gca aag gct gga gat gtc gaa act gta aaa aaa ctg tgt	1536
Leu Glu Ala Ala Lys Ala Gly Asp Val Glu Thr Val Lys Lys Leu Cys	
	500 505 510
act gtt cag agt gtc aac tgc aga gac att gaa ggg cgt cag tct aca	1584
Thr Val Gln Ser Val Asn Cys Arg Asp Ile Glu Gly Arg Gln Ser Thr	
	515 520 525
cca ctt cat ttt gca gct ggg tat aac aga gtg tcc gtg gtg gaa tat	1632
Pro Leu His Phe Ala Ala Gly Tyr Asn Arg Val Ser Val Val Glu Tyr	
	530 535 540
ctg cta cag cat gga gct gat gtg cat gct aaa gat aaa grr gsc ctt	1680
Leu Leu Gln His Gly Ala Asp Val His Ala Lys Asp Lys Xaa Xaa Leu	
	545 550 555 560
gta cct ttg cac aat gca tgt tct tat gga cat tat gaa gtt gca gaa	1728
Val Pro Leu His Asn Ala Cys Ser Tyr Gly His Tyr Glu Val Ala Glu	
	565 570 575

ctt ctt gtt aaa cat gga gca gta gtt aat gta gct gat tta tgg aaa	1776
Leu Leu Val Lys His Gly Ala Val Val Asn Val Ala Asp Leu Trp Lys	
580 585 590	
ttt aca cct tta cat gaa gca gca gca aaa gga aaa tat gaa att tgc	1824
Phe Thr Pro Leu His Glu Ala Ala Ala Lys Gly Lys Tyr Glu Ile Cys	
595 600 605	
aaa ctt ctg ctc cag cat ggt gca gac cct aca aaa aaa aac agg gat	1872
Lys Leu Leu Leu Gln His Gly Ala Asp Pro Thr Lys Lys Asn Arg Asp	
610 615 620	
gga aat act cct ttg gat ctt gtt aaa gat gga gat aca gat att caa	1920
Gly Asn Thr Pro Leu Asp Leu Val Lys Asp Gly Asp Thr Asp Ile Gln	
625 630 635 640	
gat ctg ctt agg gga gat gca gct ttg cta gat gct gcc aag aag agt	1968
Asp Leu Leu Arg Gly Asp Ala Ala Leu Leu Asp Ala Ala Lys Lys Ser	
645 650 655	
tgt tta gcc aga gtg aag aag ttg tct tct cct gat aat gta aat tgc	2016
Cys Leu Ala Arg Val Lys Lys Leu Ser Ser Pro Asp Asn Val Asn Cys	
660 665 670	
cgc gat acc caa ggc aga cat tca aca cct tta cat tta gca gct ggt	2064
Arg Asp Thr Gln Gly Arg His Ser Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gly	
675 680 685	
tat aat aat tta gaa gtt gca gag tat ttg tta caa cac gga gct gat	2112
Tyr Asn Asn Leu Glu Val Ala Glu Tyr Leu Leu Gln His Gly Ala Asp	
690 695 700	
gtg aat gcc caa gac aaa gga gga ctt att cct tta cat aat gca gca	2160
Val Asn Ala Gln Asp Lys Gly Gly Leu Ile Pro Leu His Asn Ala Ala	
705 710 715 720	
tct tac ggg cat gta gat gta gca gct cta cta ata aag tat aat gca	2208
Ser Tyr Gly His Val Asp Val Ala Ala Leu Leu Ile Lys Tyr Asn Ala	
725 730 735	
tgt gtc aat gcc acg gac aaa tgg gct ttc aca cct ttg cac gaa gca	2256
Cys Val Asn Ala Thr Asp Lys Trp Ala Phe Thr Pro Leu His Glu Ala	
740 745 750	
gcc caa aag gga cga aca cag ctt tgt gct ttg ktg cta gcc cat gga	2304
Ala Gln Lys Gly Arg Thr Gln Leu Cys Ala Leu Xaa Leu Ala His Gly	
755 760 765	

gct gac ccg act ctt aaa aat cag gaa gga caa aca cct tta gat tta	2352
Ala Asp Pro Thr Leu Lys Asn Gln Glu Gly Gln Thr Pro Leu Asp Leu	
770 775 780	
gtt tca gcg gat gat gtc agc gct ctt ctg aca gca gcc atg ccc cca	2400
Val Ser Ala Asp Asp Val Ser Ala Leu Leu Thr Ala Ala Met Pro Pro	
785 790 795 800	
tct gct ctg ccc tct tgt tac aag cct caa gtg ctc aat ggt gtg aga	2448
Ser Ala Leu Pro Ser Cys Tyr Lys Pro Gln Val Leu Asn Gly Val Arg	
805 810 815	
agc cca gga gcc act gca gat gct ctc tct tca ggt cca tct agc cca	2496
Ser Pro Gly Ala Thr Ala Asp Ala Leu Ser Ser Gly Pro Ser Ser Pro	
820 825 830	
tca agc ctt tct gca gcc agc agt ctt gac aac tta tct ggg agt ttt	2544
Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ser Ser Leu Asp Asn Leu Ser Gly Ser Phe	
835 840 845	
tca gaa ctg tct tca gta gtt agt tca agt gga aca gag ggt gct tcc	2592
Ser Glu Leu Ser Ser Val Val Ser Ser Ser Gly Thr Glu Gly Ala Ser	
850 855 860	
agt ttg gag aaa aag gag gtt cca gga gta gat ttt agc ata act caa	2640
Ser Leu Glu Lys Lys Glu Val Pro Gly Val Asp Phe Ser Ile Thr Gln	
865 870 875 880	
ttc gta agg nat ctt gga ctt gag cac cta atg gat ata ttt gag aga	2688
Phe Val Arg Xaa Leu Gly Leu Glu His Leu Met Asp Ile Phe Glu Arg	
885 890 895	
gaa cag atc act ttg gat gta tta gtt gag atg ggg cac aag gag ctg	2736
Glu Gln Ile Thr Leu Asp Val Leu Val Glu Met Gly His Lys Glu Leu	
900 905 910	
aag gag att gga atc aat gct tat gga cat agg cac aaa cta att aaa	2784
Lys Glu Ile Gly Ile Asn Ala Tyr Gly His Arg His Lys Leu Ile Lys	
915 920 925	
gga gtc gag aga ctt atc tcc gga caa caa ggt ctt aac cca tat tta	2832
Gly Val Glu Arg Leu Ile Ser Gly Gln Gln Gly Leu Asn Pro Tyr Leu	
930 935 940	
act ttg aac acc tct ggt agt gga aca att ctt ata gat ctg tct cct	2880
Thr Leu Asn Thr Ser Gly Ser Gly Thr Ile Leu Ile Asp Leu Ser Pro	
945 950 955 960	

gat gat aaa gag ttt cag tct gtg gag gaa gag atg caa agt aca gtt	2928
Asp Asp Lys Glu Phe Gln Ser Val Glu Glu Glu Met Gln Ser Thr Val	
965 970 975	
cga gag cac aga gat gga ggt cat gca ggt gga atc ttc aac aga tac	2976
Arg Glu His Arg Asp Gly Gly His Ala Gly Gly Ile Phe Asn Arg Tyr	
980 985 990	
aat att ctc aag att cag aag gtt tgt aac aag aaa cta tgg gaa aga	3024
Asn Ile Leu Lys Ile Gln Lys Val Cys Asn Lys Lys Leu Trp Glu Arg	
995 1000 1005	
tac act cac cgg aga aaa gaa gtt tct gaa gaa aac cac aac cat gcc	3072
Tyr Thr His Arg Arg Lys Glu Val Ser Glu Glu Asn His Asn His Ala	
1010 1015 1020	
aat gaa cga atg cta ttt cat ggg tct cct ttt gtg aat gca att atc	3120
Asn Glu Arg Met Leu Phe His Gly Ser Pro Phe Val Asn Ala Ile Ile	
1025 1030 1035 1040	
cac aaa ggc ttt gat gaa agg cat gcg tac ata ggt ggt atg ttt gga	3168
His Lys Gly Phe Asp Glu Arg His Ala Tyr Ile Gly Gly Met Phe Gly	
1045 1050 1055	
gct ggc att tat ttt gct gaa aac tct tcc aaa agc aat caa tat gta	3216
Ala Gly Ile Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Ser Lys Ser Asn Gln Tyr Val	
1060 1065 1070	
tat gga att gga gga ggt act ggg tgt cca gtt cac aaa gac aga tct	3264
Tyr Gly Ile Gly Gly Gly Thr Gly Cys Pro Val His Lys Asp Arg Ser	
1075 1080 1085	
tgt tac att tgc cac agg cag ctg ctc ttt tgc cgg gta acc ttg gga	3312
Cys Tyr Ile Cys His Arg Gln Leu Leu Phe Cys Arg Val Thr Leu Gly	
1090 1095 1100	
aag tct ttc ctg cag ttc agt gca atg aaa atg gca cat tct cct cca	3360
Lys Ser Phe Leu Gln Phe Ser Ala Met Lys Met Ala His Ser Pro Pro	
1105 1110 1115 1120	
ggt cat cac tca gtc act ggt agg ccc agt gta aat ggc cta gca tta	3408
Gly His His Ser Val Thr Gly Arg Pro Ser Val Asn Gly Leu Ala Leu	
1125 1130 1135	
gct gaa tat gtt att tac aga gga gaa cag gct tat cct gag tat tta	3456
Ala Glu Tyr Val Ile Tyr Arg Gly Glu Gln Ala Tyr Pro Glu Tyr Leu	
1140 1145 1150	



Met Met Ala Leu Leu Thr Pro Leu Asn Val Asn Cys His Ala Ser Asp  
195 200 205

Gly Arg Lys Ser Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gly Tyr Asn Arg Val  
210 215 220

Lys Ile Val Gln Leu Leu Leu Gln His Gly Ala Asp Val His Ala Lys  
225 230 235 240

Asp Lys Gly Asp Leu Val Pro Leu His Asn Ala Cys Ser Tyr Gly His  
245 250 255

Tyr Glu Val Thr Glu Leu Leu Val Lys His Gly Ala Cys Val Asn Ala  
260 265 270

Met Asp Leu Trp Gln Phe Thr Pro Leu His Glu Ala Ala Ser Lys Asn  
275 280 285

Arg Val Glu Val Cys Ser Leu Leu Leu Ser Tyr Gly Ala Asp Pro Thr  
290 295 300

Leu Leu Asn Cys His Asn Lys Ser Ala Ile Asp Leu Ala Pro Thr Pro  
305 310 315 320

Gln Leu Lys Glu Arg Leu Ala Tyr Glu Phe Lys Gly His Ser Leu Leu  
325 330 335

Gln Ala Ala Arg Glu Ala Asp Val Thr Arg Ile Lys Lys His Leu Ser  
340 345 350

Leu Glu Met Val Asn Phe Lys His Pro Gln Thr His Glu Thr Ala Xaa  
355 360 365

His Cys Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Pro Lys Arg Lys Gln Ile Cys Glu  
370 375 380

Leu Leu Leu Arg Lys Gly Ala Xaa Ile Asn Glu Lys Thr Lys Glu Phe  
385 390 395 400

Leu Thr Pro Leu His Val Ala Ser Glu Lys Ala His Asn Asp Xaa Val  
405 410 415

Glu Val Val Val Lys His Glu Ala Lys Val Asn Ala Leu Asp Asn Leu  
420 425 430

Gly Gln Thr Ser Leu His Arg Ala Ala Tyr Cys Gly His Leu Gln Thr  
435 440 445

Cys Arg Leu Leu Leu Ser Tyr Gly Cys Asp Pro Asn Ile Ile Ser Leu  
 450 455 460

Gln Gly Phe Thr Ala Leu Gln Met Gly Asn Glu Asn Val Gln Gln Leu  
 465 470 475 480

Leu Gln Glu Gly Ile Ser Leu Gly Asn Ser Glu Ala Asp Arg Gln Leu  
 485 490 495

Leu Glu Ala Ala Lys Ala Gly Asp Val Glu Thr Val Lys Lys Leu Cys  
 500 505 510

Thr Val Gln Ser Val Asn Cys Arg Asp Ile Glu Gly Arg Gln Ser Thr  
 515 520 525

Pro Leu His Phe Ala Ala Gly Tyr Asn Arg Val Ser Val Val Glu Tyr  
 530 535 540

Leu Leu Gln His Gly Ala Asp Val His Ala Lys Asp Lys Xaa Xaa Leu  
 545 550 555 560

Val Pro Leu His Asn Ala Cys Ser Tyr Gly His Tyr Glu Val Ala Glu  
 565 570 575

Leu Leu Val Lys His Gly Ala Val Val Asn Val Ala Asp Leu Trp Lys  
 580 585 590

Phe Thr Pro Leu His Glu Ala Ala Ala Lys Gly Lys Tyr Glu Ile Cys  
 595 600 605

Lys Leu Leu Leu Gln His Gly Ala Asp Pro Thr Lys Lys Asn Arg Asp  
 610 615 620

Gly Asn Thr Pro Leu Asp Leu Val Lys Asp Gly Asp Thr Asp Ile Gln  
 625 630 635 640

Asp Leu Leu Arg Gly Asp Ala Ala Leu Leu Asp Ala Ala Lys Lys Ser  
 645 650 655

Cys Leu Ala Arg Val Lys Lys Leu Ser Ser Pro Asp Asn Val Asn Cys  
 660 665 670

Arg Asp Thr Gln Gly Arg His Ser Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gly  
 675 680 685

Tyr Asn Asn Leu Glu Val Ala Glu Tyr Leu Leu Gln His Gly Ala Asp  
 690 695 700



Asp Asp Lys Glu Phe Gln Ser Val Glu Glu Glu Met Gln Ser Thr Val  
 965 970 975  
 Arg Glu His Arg Asp Gly Gly His Ala Gly Gly Ile Phe Asn Arg Tyr  
 980 985 990  
 Asn Ile Leu Lys Ile Gln Lys Val Cys Asn Lys Lys Leu Trp Glu Arg  
 995 1000 1005  
 Tyr Thr His Arg Arg Lys Glu Val Ser Glu Glu Asn His Asn His Ala  
 1010 1015 1020  
 Asn Glu Arg Met Leu Phe His Gly Ser Pro Phe Val Asn Ala Ile Ile  
 1025 1030 1035 1040  
 His Lys Gly Phe Asp Glu Arg His Ala Tyr Ile Gly Gly Met Phe Gly  
 1045 1050 1055  
 Ala Gly Ile Tyr Phe Ala Glu Asn Ser Ser Lys Ser Asn Gln Tyr Val  
 1060 1065 1070  
 Tyr Gly Ile Gly Gly Gly Thr Gly Cys Pro Val His Lys Asp Arg Ser  
 1075 1080 1085  
 Cys Tyr Ile Cys His Arg Gln Leu Leu Phe Cys Arg Val Thr Leu Gly  
 1090 1095 1100  
 Lys Ser Phe Leu Gln Phe Ser Ala Met Lys Met Ala His Ser Pro Pro  
 1105 1110 1115 1120  
 Gly His His Ser Val Thr Gly Arg Pro Ser Val Asn Gly Leu Ala Leu  
 1125 1130 1135  
 Ala Glu Tyr Val Ile Tyr Arg Gly Glu Gln Ala Tyr Pro Glu Tyr Leu  
 1140 1145 1150  
 Ile Thr Tyr Gln Ile Met Arg Pro Glu Gly Met Val Asp Gly  
 1155 1160 1165

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primers

<400> 6 cccgagagct gttcgaggc	19
<210> 7 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primers	
<400> 7 caatctttac tctgttatat cct	23
<210> 8 <211> 41 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primers	
<400> 8 aagcggccgc attatggaaa ggatcatgtc gggtcgccgc t	41
<210> 9 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primers	
<400> 9 aaggatccac cataccttca ggcct	25
<210> 10 <211> 39 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primers	
<400> 10 aaaagcttta tggaaaggat catgtcgggt cgccgctgc	39

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/06609		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/54 C12N9/10 C07K16/40 C12Q1/68 C12Q1/48 A61K38/45 //A61P29/00		
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 A61K		
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) BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 15647 A (GARVAN INST MED RES ;SUTHERLAND ROBERT LYNDAY (AU); DALY ROGER JO) 1 April 1999 (1999-04-01) page 8 -page 10, line 24 page 13 -page 17 ---	1-3,5, 8-19, 21-38
A	SMITH S ET AL: "Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres" SCIENCE, vol. 282, no. 5393, 20 November 1998 (1998-11-20), pages 1484-1487, XP002118903 ISSN: 0036-8075 cited in the application ---	-/--
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 5 December 2000	Date of mailing of the international search report 11/12/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Andres, S	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/06609

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 00 61813 A (FUNK WALTER D ; MORIN GREGG B (US); GERON CORP (US); PIATYSZEK MIEC) 19 October 2000 (2000-10-19) page 2, line 9 -page 3, line 15 examples claims figure 4	1-38

1

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 39

Present claim 39 relates to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its modulatory activity on tankyrase homolog protein or the corresponding nucleic acids. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, no search has been carried out for claim 39.

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.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/06609

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9915647 A	01-04-1999	AU 9245898 A EP 1017802 A	12-04-1999 12-07-2000
WO 0061813 A	19-10-2000	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
	45/00	48/00	4 C 0 8 4
	48/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/00	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 6
C 0 7 K	16/40	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/19	1/21	4 H 0 4 5
	1/21	9/00	
	5/10	C 1 2 Q 1/25	
	9/00	1/68	A
C 1 2 Q	1/25	G 0 1 N 33/15	Z
	1/68	33/50	Z
G 0 1 N	33/15	33/53	D
	33/50	33/566	
	33/53	33/577	B
	33/566	33/58	Z
	33/577	C 1 2 P 21/08	
	33/58	C 1 2 R 1:91	
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 N 15/00	Z N A A
(C 1 2 N	5/10	5/00	B
C 1 2 R	1:91)	A 6 1 K 37/54	

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

(72)発明者 イサツキ、アントネツラ  
 イタリア国、イ - 20146・ミラノ、ピア・  
 モンテカテイーニ、14

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB20 CB01 CB21  
DA12 DA13 DA14 DA36 DA77  
FB02 FB03 FB07 HA16  
4B024 AA01 AA11 BA07 CA04 DA02  
DA06 DA12 EA02 EA04 FA02  
GA11 HA01  
4B050 CC03 DD11 LL01  
4B063 QA01 QQ21 QQ43 QR32 QR55  
QS02 QS34  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13  
4B065 AA26X AA80X AA90X AA99Y  
BA02 CA27 CA44  
4C084 AA01 AA06 AA07 AA13 AA17  
BA01 BA18 BA19 BA20 BA21  
BA22 CA53 NA14 ZB26  
4C085 AA03 AA13 AA14 BB11 CC21  
EE01  
4C086 AA01 AA03 EA16 NA14 ZB26  
4C087 AA01 BC83 CA12 ZB26  
4H045 AA11 CA40 DA76 EA20 EA50  
FA74

专利名称(译)	Tankerase同源蛋白 ( THP ) , 核酸和相关方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003504067A</a>	公开(公告)日	2003-02-04
申请号	JP2001509530	申请日	2000-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	FUARUMASHIAËATSUPUJON SPA		
申请(专利权)人(译)	法玛西亚等Atsupujiyon-Etsuse撒尿啊		
[标]发明人	ベルテルセンイエンズ トーマサルバトーレ イサツキアントネツラ		
发明人	ベルテルセン,イエンズ トーマ,サルバトーレ イサツキ,アントネツラ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/46 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P29/00 A61P35/00 C07K16/40 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N9/10 C12N15/09 C12N15/54 C12P21/08 C12Q1/25 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/53 G01N33 /566 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	A61K38/00 A61P29/00 C12N9/1077 C12N2799/021 C12N2799/026 C12Y204/0203		
FI分类号	A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/00.H A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P35 /00 C07K16/40 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12Q1/25 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/577.B G01N33/58.Z C12P21/08 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B A61K37/54		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/HA16 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024 /EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B063/QA01 4B063/QQ21 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS02 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064 /CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA80X 4B065/AA90X 4B065 /AA99Y 4B065/BA02 4B065/CA27 4B065/CA44 4C084/AA01 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084 /CA53 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087 /BC83 4C087/CA12 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	09/350982 1999-07-09 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了人tankyrase蛋白 ( THP ) 的人多肽同源物, 以及鉴定和编码THP的多核苷酸。 本发明还提供表达载体, 宿主细胞及其制备方法。 本发明还提供了鉴定可用于治疗人类疾病例如人类癌症和与年龄有关的疾病的THP激动剂/拮抗剂的方法。

アミノ酸	略語	記号	コドン
アラニン	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
システイン	Cys	C	UGA UGU
アスパラギン酸	Asp	D	GAC GAU
グルタミン酸	Glu	E	GAA GAG
フェニルアラニン	Phe	F	UUC UUU
グリシン	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
ヒスチジン	His	H	CAC CAU
イソロイシン	Ile	I	AUA AUC AUU
リシン	Lys	K	AAA AAG
ロイシン	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
メチオニン	Met	M	AUG
アスパラギン	Asn	N	AAC AAU
プロリン	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA CAG
アルギニン	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
セリン	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
トレオニン	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
バリン	Val	V	GUA GUC GUG GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG
チロシン	Tyr	Y	UAC UAU