

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5560398号
(P5560398)

(45) 発行日 平成26年7月23日(2014.7.23)

(24) 登録日 平成26年6月20日(2014.6.20)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

C 1 2 N 9/96 (2006.01)

C 1 2 N 9/96

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 34 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-535049 (P2008-535049)
 (86) (22) 出願日 平成18年10月11日 (2006.10.11)
 (65) 公表番号 特表2009-511036 (P2009-511036A)
 (43) 公表日 平成21年3月19日 (2009.3.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/ES2006/070152
 (87) 国際公開番号 W02007/090911
 (87) 国際公開日 平成19年8月16日 (2007.8.16)
 審査請求日 平成21年9月28日 (2009.9.28)
 (31) 優先権主張番号 P200502511
 (32) 優先日 平成17年10月14日 (2005.10.14)
 (33) 優先権主張国 スペイン (ES)

(73) 特許権者 507343604
 コンセジョ サペリオ デ インベスチガ
 シオネス シエンチフィカス
 スペイン国, イー-28006 マドリッ
 ド, シ/セーラ/117
 (73) 特許権者 508112151
 ユニバーシダド オウトノマ デ マドリ
 ッド
 スペイン国, 28049 マドリッド, シ
 ウダッド ウニベルシタリア デ カント
 ブランコ, シー/エインステイン, 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 テロメラーゼ活性を誘導するジスクリンのGSE24. 2ポリヌクレオチドおよびペプチドの配列、その取得方法、医薬組成物およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

テロメラーゼ活性を誘導するかまたは活性化する化合物であって、該化合物が塩基配列 SEQ ID NO 1 で示されるポリヌクレオチドから成る化合物。

【請求項2】

テロメラーゼ活性を誘導するかまたは活性化する化合物であって、該化合物が塩基配列 SEQ ID NO 1 によってコードされるタンパク質若しくはペプチドから成る化合物。

【請求項3】

哺乳動物の細胞の内部においてテロメラーゼ活性の回復を誘導するタンパク質またはペプチドの発現を可能にするポリヌクレオチドの化合物であって、該化合物が、

- a) ヒト GSE24. 2 の塩基配列 (SEQ ID NO 1) から成る塩基配列、
 b) a) の配列と少なくとも95%の同一度を有する塩基配列、
 c) a) および b) の配列のいずれかの断片、
 d) a), b) および c) に属するいずれかの配列を含む塩基配列

に属するいずれか1つの塩基配列によって示されるポリヌクレオチドから成る化合物。

【請求項4】

DNA, cRNA または mRNA の塩基配列によって示されるポリヌクレオチドを含む請求項3に記載の化合物。

【請求項5】

前記 a) の GSE24. 2 の塩基配列が SEQ ID NO 1 から成ることを特徴とす

る請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記 b) の G S E 2 4 . 2 の塩基配列が S E Q I D N O 1 1 または S E Q I D N O 1 3 から成ることを特徴とする請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 7】

請求項 4 ないし 6 に記載の 1 つまたは幾つかの化合物を含むことを特徴とする遺伝子構造体。

【請求項 8】

請求項 5 ないし 6 に記載の化合物を含むことを特徴とする発現ベクター。

【請求項 9】

発現ベクターが p L N C X 2 4 . 2 プラスミドであることを特徴とする請求項 8 に記載の発現ベクター。

【請求項 10】

哺乳動物の細胞の内部においてテロメラーゼ活性を誘導し、そして以下のグループ、すなわち、

a) ヒト G S E 2 4 . 2 アミノ酸配列 (S E Q I D N O 2) から成るアミノ酸配列、

b) a) の配列と少なくとも 9 5 % の同一度を有するアミノ酸配列、

c) a) および b) の配列のいずれかの断片、

d) a) , b) および c) に属するいずれかの配列を含むアミノ酸配列

に属するいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むことを特徴とするタンパク質またはペプチド

【請求項 11】

前記 a) のアミノ酸配列が S E Q I D N O 2 から成ることを特徴とする請求項 10 に記載のタンパク質。

【請求項 12】

前記 c) のアミノ酸配列が S E Q I D N O 1 2 または S E Q I D N O 1 4 になることを特徴とする請求項 10 に記載のタンパク質。

【請求項 13】

請求項 3 ないし 6 に記載の化合物、又は請求項 7 に記載の遺伝子構造体、又は請求項 8 および 9 に記載の発現ベクターを含み、請求項 10 ないし 12 に記載のペプチドまたはタンパク質が適切に発現され得ることを特徴とする遺伝子的に変性された真核生物または原核生物の細胞。

【請求項 14】

ヒト細胞であることを特徴とする請求項 13 に記載の細胞。

【請求項 15】

テロメラーゼ活性の変質によって生じる疾病の治療用の薬剤または医薬組成物を調製するために請求項 1 ないし 14 に記載の化合物、遺伝子構造体、発現ベクター、タンパク質または細胞を使用する使用方法。

【請求項 16】

前記疾病が以下のグループ、すなわち、老化または老化促進、神経退化病および先天性角化異常症 (d y s k e r a t o s i s c o n g e n i t a) に属することを特徴とする請求項 15 に記載の使用方法。

【請求項 17】

テロメラーゼ活性の変質により発生する疾病、障害または病態を治療するための医薬組成物または薬剤であって、請求項 3 に記載のテロメラーゼ活性を回復することができる化合物または作用剤を含むことを特徴とする医薬組成物または薬剤。

【請求項 18】

テロメラーゼ活性を誘導する化合物または作用剤が以下のグループ、すなわち、請求項 3 ないし 14 に記載の化合物、遺伝子構造体、発現ベクター、タンパク質または細胞に属することを特徴とする請求項 17 に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

前記化合物が以下のグループ、すなわち、

- a) ヒト G S E 2 4 . 2 の塩基配列 (S E Q I D N O 1) から成る塩基配列、
 - b) a) の配列と少なくとも 95 % の同一度を有する塩基配列、
 - c) a) および b) の配列のいずれかの断片、
 - d) a) , b) および c) に属するいずれかの配列を含む塩基配列
- に属するいずれか 1 つの塩基配列によって示されるポリヌクレオチドから成る請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記 a) の塩基配列が S E Q I D N O 1 であることを特徴とする請求項 19 に記載の医薬組成物。 10

【請求項 21】

前記 c) の塩基配列が S E Q I D N O 1 1 または S E Q I D N O 1 3 であることを特徴とする請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記化合物が請求項 7 に記載の遺伝子構造体であることを特徴とする請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記化合物が請求項 8 および 9 に記載の発現ベクターであることを特徴とする請求項 23 に記載の医薬組成物。 20

【請求項 24】

前記ベクターが p L N C X 2 4 . 2 プラスミドであることを特徴とする請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記化合物が、請求項 10 ないし 12 に記載のたんぱく質であることを特徴とする請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記タンパク質が以下のグループ、すなわち、

- a) ヒト G S E 2 4 . 2 アミノ酸配列 (S E Q I D N O 2) から成るアミノ酸配列、
 - b) a) の配列と少なくとも 95 % の同一度を有するアミノ酸配列、
 - c) a) および b) の配列のいずれかの断片、
 - d) a) , b) および c) に属するいずれかの配列を含むアミノ酸配列
- に属することを特徴とする請求項 25 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 27】

前記 a) の配列のアミノ酸配列が S E Q I D N O 2 配列である請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

前記 c) の配列のアミノ酸配列が S E Q I D N O 1 2 および S E Q I D N O 1 4 配列である請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

前記化合物が請求項 3 ないし 9 に記載の化合物、遺伝子構造体または発現ベクターによって形質変換された細胞であることを特徴とする請求項 18 に記載の医薬組成物。 40

【請求項 30】

テロメラーゼ活性の変質により発生する疾病、障害または病状に冒されている哺乳動物の治療または予防に用いる薬剤の調合のための医薬組成物の使用方法において、その使用方法が、その細胞の内部でテロメラーゼ活性を回復することができる適切な量の請求項 17 ないし 26 に記載の医薬組成物を使用する使用方法。

【請求項 31】

テロメラーゼ活性の変質により発生しかつヒトを冒している疾病が以下のグループ、すなわち、老化または老化促進、神経退化病、先天性角化異常症、クリ・デュ・シャ (C r 50

i d u c h a t)、運動失調毛細管拡張症、ナイメーヘン破壊症候群 (N i j m e g e n B r e a k a g e S y n d r o m e)、ブルーム症候群 (B l o o m S y n d r o m e)、ウェルナー症候群 (W e r n e r S y n d r o m e)、ファンコーニ貧血、潰瘍性大腸炎、血管老化、アテローム性動脈硬化症およびガンに属することを特徴とする請求項 30 に記載の、薬剤の調合のための医薬組成物の使用方法。

【請求項 32】

前記神経退化病が以下のグループ、すなわち、アルツハイマー病、パーキンソン病、小脳性運動失調症および脊髄変性症に属することを特徴とする請求項 31 に記載の、薬剤の調合のための医薬組成物の使用方法。

【請求項 33】

前記疾病がガンであることを特徴とする請求項 31 に記載の、薬剤の調合のための医薬組成物の使用方法。

【請求項 34】

前記先天性角化異常症 (D y s k e r a t o s i s c o n g e n i t a) が X - 染色体 - 連鎖形態の先天性角化異常症または常染色体優性の先天性角化異常症であることを特徴とする請求項 31 に記載の、薬剤の調合のための医薬組成物の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はヒトの健康に関連する用途による生物学的分野、特に生物学的化合物、即ちヒトの治療用途に関連する ポリヌクレオチド、ペプチドおよび形質変換されたヒト細胞に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ジスケリン (図 1) は 58 - k D 核酸タンパク質であり、該 58 - k D 核酸タンパク質はリボ染色体 RNA をプソイドウリジンする支配下で小さいリボ核酸タンパク質中に存在する S n o R N A s の H / A C A ボックスに関連している。他方、それは染色体の末端にテロメア反復を維持するための原因となるテロメラーゼ複合体の成分である。X - 染色体 - 連鎖型の先天性角化異常症 (マーローン等、2003 ; ベッセラー等、2004 「 M a r r o n e e t a l . , 2003 ; B e s s e l e r e t a l . , 2004 」) は骨髄不全を発生する先天性症候群でありそしてガンに対する大きな罹患性に関連している。この型の先天性角化異常症 (D y s k e r a t o s i s c o n g e n i t a) はジスケリン (D y s k e r i n) を符号化する D K C 1 遺伝子の特殊な突然変異によって発生する。別の常染色体優性の先天性角化異常症があり、この場合に、疾病はテロメラーゼ (h T R) の RNA 成分中の突然変異と関連している (ハイス等、1998 「 H e i s s e t a l . , 1998 」) 。先天性角化異常症を有する患者の繊維芽細胞およびリンパ母細胞はテロメラーゼ活性が少なくそしてテロメア (t e l o m e r e) は疾病に冒されていない細胞のテロメアより短い (シリニアバン等、1975 ; トローブリッジ等、1977 「 S i r i n i a v i n e t a l . , 1975 ; T r o w b r i g d e e t a l . , 1977 」) 。X - 染色体 - 連鎖型の先天性角化異常症を有する患者の細胞において、テロメラーゼ欠乏は h T E R T を転位的に発現することによって克服される (ミッチェル等、1999 「 M i t c h e l l e t a l . , 1999 」) 。h T R の突然変異によって発生される先天性角化異常症において、テロメラーゼ活性を回復する唯一の方法は h T R を発現することである (フュ等、2003 「 F u e t a l . , 」) 。

【0003】

テロメアは染色体 3 ' 末端における T T A G G G 保持配列の 500 - 2 , 000 反復から成りそして連続分割によるそれらの短縮は細胞の増殖能力用の制限となる。テロメアはシスプラチンを含んでいる外因性作用物質によって生じる DNA の損傷を受けやすい。シスプラチンは種々の細胞系においてテロメラーゼ活性を抑制することが可能であることが記載されている (石橋等、1998 ; バーガー等、1997 「 I s h i b a s h i e t

10

20

30

40

50

al., 1998; Burger et al., 1997」)。この抑制がどのような方法で発生するかについては複数の仮説がある。1つの可能性はTTAGGテロメアの反復配列におけるシスプラチンを象徴するG-Pt-G付加物の形成である。その代りに、メルカプト基とシスプラチンとの相互作用は逆転写酵素触媒サブユニット(hTERT)にとって不可欠でありそれは同様にhTERT発現の減少に起因する(バーガー等、1997「Burger et al., 1997」)。

【発明の開示】

【0004】

本発明の1つの目的は哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部におけるテロメラーゼ活性を回復することができるジスケリンのGSE24.2断片の塩基配列または該塩基配列によってコードされるタンパク質またはペプチド配列に基づいてテロメラーゼ活性を誘導または活性化する化合物、即ち本発明の活性体化合物にある。

10

【0005】

本発明の1つの特定の目的は哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部におけるテロメラーゼ活性を誘導するタンパク質またはペプチドの発現を可能にし、そして以下のグループ、すなわち、

a) ヒトGSE24.2の塩基配列(SEQ ID NO1)から成る塩基配列、

b) a)の配列に類似する塩基配列、

c) a)およびb)の配列のいずれかの断片、

d) a), b)およびc)に属するいずれかの配列を含む塩基配列

20

に属する1つまたは複数のGSE24.2の塩基配列からなる化合物、即ち本発明のGSE24.2遺伝子配列から成る化合物にある。

【0006】

本発明に使用されているように、用語「塩基配列」はDNA, cRNAまたはmRNA配列に関するものである。

【0007】

本発明の特定の実施形態は、a)のGSE24.2の塩基配列がSEQ ID NO1から成る化合物である。

【0008】

本発明の他の特定の実施形態は、b)GSE24.2の塩基配列が、TrubIおよびTrubIIペプチド領域(実施例1.7)をそれぞれコードするSEQ ID NO11またはSEQ ID NO13から成る化合物である。

30

【0009】

本発明の他の特定の目的はGSE24.2の塩基配列を含むGSE24.2遺伝子構造体にある。

【0010】

本発明の他の特定の目的は本発明に記載されたGSE24.2の塩基配列またはGSE24.2遺伝子構造体を含み、哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部におけるテロメラーゼ活性を回復することができるタンパク質またはペプチドの発現を可能にするGSE24.2発現ベクターにある。この特別な実施形態の1例は本発明のpLNCX24.2発現ベクターである(実施例参照)。

40

【0011】

加えて、本発明の他の特定の目的は哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部におけるテロメラーゼ活性を回復するのに向けられる活性を備え、かつ以下のグループ、すなわち、

a) ヒトGSE24.2アミノ酸配列(SEQ ID NO2)から構成されるアミノ酸配列、

b) a)の配列に類似するアミノ酸配列、

c) a)およびb)の配列のいずれかの断片、

d) a), b)およびc)に属するいずれかの配列を含むアミノ酸配列

に属する1つまたは複数のアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチド、即ち本発明の

50

G S E 2 4 . 2 タンパク質にある。

【 0 0 1 2 】

本発明の他の特定の実施形態は前記 a) のアミノ酸配列が S E Q I D N O 2 から構成されるタンパク質である。

【 0 0 1 3 】

本発明の他の特定の実施形態は前記 c) のアミノ酸配列、その断片が S E Q I D N O 1 2 または S E Q I D N O 1 4 から構成されるタンパク質である。

【 0 0 1 4 】

他方で、本発明の他の追加の目的は本発明の G S E 2 4 . 2 の塩基配列、又は構造体、又は発現ベクターを含みかつ本発明の G S E 2 4 . 2 ペプチドまたはタンパク質が適切に発現され得る遺伝子的に変性された真核生物の - 好ましくはヒトの - または原核生物の細胞、即ち本発明の G S E 2 4 . 2 細胞にある。

【 0 0 1 5 】

それゆえ、本発明の他の目的は本発明の範囲をこれに限定することなく、以下のグループ、すなわち、老化または老化促進、神経退化病および先天性角化異常症に属するテロメラーゼ活性の変質、好ましくは、減少によって発生される疾病の薬剤または治療用医薬組成物を調製するために本発明の G S E 2 4 . 2 活性対化合物を使用する使用方法にある。

【 0 0 1 6 】

本発明の他の目的は任意に 1 つまたはそれ以上の医薬的に許容し得る補助剤および / または賦形剤と共同してテロメラーゼ活性を回復することができる治療的に有効な量の化合物または作用剤を含みかつテロメラーゼ活性の発生および維持を刺激することができるテロメラーゼ活性の変質、好ましくはその活性の減少により発生する疾病、障害または病態の治療用の医薬組成物または薬剤、即ち本発明の医薬組成物にある。

【 0 0 1 7 】

本発明の他の目的はテロメラーゼ活性を回復することができる化合物または作用剤が以下のグループ、すなわち、哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部におけるテロメラーゼ活性を回復することができるタンパク質またはペプチドの発現を可能にする G S E 2 4 . 2 配列、遺伝子構造体または発現ベクターに属する本発明の医薬組成物にある。

【 0 0 1 8 】

本発明の特定の実施形態はテロメラーゼ活性を回復することができる化合物または作用剤が、以下のグループ、すなわち、

- a) ヒト G S E 2 4 . 2 の塩基配列 (S E Q I D N O 1) からなる塩基配列、
- b) a) の配列に類似する塩基配列、
- c) a) および b) の配列のいずれかの断片、
- d) a) , b) および c) に属するいずれかの配列を含む塩基配列

に属している 1 つまたは複数の G S E 2 4 . 2 配列によって示されるポリヌクレオチドから成る本発明の医薬組成物にある。

【 0 0 1 9 】

本発明の他の特定の実施形態は a) の塩基配列が G S E 2 4 . 2 の塩基配列 (S E Q I D N O 1) である本発明の医薬組成物である。

【 0 0 2 0 】

本発明の他の特定の実施形態は c) の塩基配列が S E Q I D N O 1 1 または S E Q I D N O 1 3 である本発明の医薬組成物である。

【 0 0 2 1 】

本発明の他の特定の実施形態は塩基配列が発現ベクター、好ましくは、 p L N C X 2 4 . 2 ベクターである本発明の医薬組成物である。

【 0 0 2 2 】

本発明の他の特定の目的はテロメラーゼ活性を回復することができる化合物または作用剤が本発明の G S E 2 4 . 2 配列、遺伝子構造体または発現ベクターによって符号化されたタンパク質またはペプチドである本発明の医薬組成物にある。

【 0 0 2 3 】

本発明の特定の実施形態は G S E 2 4 . 2 タンパク質またはペプチドが以下のグループ、すなわち、

a) ヒト G S E 2 4 . 2 アミノ酸配列 (S E Q I D N O 2) から構成されるアミノ酸配列、

b) a) の配列に類似するアミノ酸配列、

c) a) および b) の配列のいずれかの断片、

d) a) , b) および c) に属するいずれかの配列を含むアミノ酸配列に属する本発明の医薬組成物である。

【 0 0 2 4 】

本発明の他の特定の実施形態は a) の配列のアミノ酸配列が S E Q I D N O 2 である本発明の医薬組成物である。

【 0 0 2 5 】

本発明の他の特定の実施形態は c) のアミノ酸配列が S E Q I D N O 1 2 および S E Q I D N O 1 4 配列である本発明の医薬組成物である。

【 0 0 2 6 】

本発明の他の特定の目的はテロメラーゼ活性化化合物または作用剤が G S E 2 4 . 2 配列、遺伝子構造体または発現ベクターによって形質変換された細胞、好ましくはヒト細胞である本発明の医薬組成物にある。

【 0 0 2 7 】

本発明の他の目的は細胞内部のテロメラーゼ活性の回復を可能にする適切な投与量における医薬組成物の投与からなっているテロメラーゼ活性の変質、好ましくは減少により発生する疾病、障害または病態に冒されている哺乳動物、好ましくはヒトの治療または予防方法において本発明の医薬組成物を使用する使用方法にある。

【 0 0 2 8 】

本発明の他の特定の目的はテロメラーゼ活性の変質により発生しかつヒトが有している以下のグループ、すなわち、老化または老化促進、神経退化病、先天性角化異常症 (D y s k e r a t o s i s c o n g e n i t a) 、クリ・デュ・シャ (C r i d u c h a t) 、毛細管拡張性運動失調、ナイメーヘン遮断症候群 (N i j m e g e n B r e a k a g e S y n d r o m e) 、ブルーム症候群 (B l o o m S y n d r o m e) 、ウェルナー症候群 (W e r n e r S y n d r o m e) 、ファンコーニ貧血 (F a n c o n e ' s a n a e m i a) 、潰瘍性大腸炎、血管老化、アテローム性動脈硬化症およびガンに属している疾病または障害の治療方法における本発明の医薬組成物の使用にある。

【 0 0 2 9 】

本発明の他の特定の実施形態は以下のグループ、すなわち、アルツハイマー病、パーキンソン病、小脳性運動失調症および脊髄変性症に属している神経退化病の治療方法において本発明の医薬組成物を使用するものである。

【 0 0 3 0 】

本発明の他の特定の実施形態は X - 染色体 - 連鎖型先天性角化異常症の治療方法において本発明の医薬組成物を使用するものである。

【 0 0 3 1 】

本発明の他の特定の実施形態は常染色体優性の先天性角化異常症の治療方法において本発明の医薬組成物を使用するものである。

【 0 0 3 2 】

本発明はテロメラーゼ活性の変質により発生する疾病、特に先天性角化異常症の治療用の新規な治療具を提供する課題に取り組んでいる。

【 0 0 3 3 】

本発明は本発明者等がジスケリンの内部配列 (S E Q I D N O 2) を発現するジスケリンの c D N A 断片、即ち断片 G S E 2 4 . 2 (S E Q I D N O 1) 発現が先天性角化異常症を有する患者の細胞中のおよび V A 1 3 細胞 (実施例 3) 中のテロメラーゼ活

10

20

30

40

50

性の欠乏を補償するということを立証したことに基礎を置いている。特に、先天性角化異常症を有する患者の細胞およびV A 1 3細胞がG S E 2 4 . 2配列でトランスフェクトされるとき、テロメラーゼ活性を回復することに加えて、h T E R Tおよびh T Rのレベルの増加がある。実際に、G S E 2 4 . 2ペプチドの発現がテロメラーゼプロモーターの基本活性を増加し、そしてシスプラチンによる治療後に、2 4 . 2細胞もまた多くの活性を有することが観察された。不思議なことに、コリンズ等(C o l l i n s e t a l .)は、これらの同一の患者の細胞において、テロメラーゼ活性がh T E R T遺伝子を過発現することによってのみ回復されるが、これらの患者において突然変異されるタンパク質、即ちジスケリンを発現することによっては回復されないことを以前に発表した(ミッチェル等、1 9 9 9「M i t c h e l l e t a l . , 1 9 9 9」)。

10

【0034】

ジスケリンの突然変異がテロメラーゼRNAの蓄積に影響を及ぼすことが文献に記載されており(望月等、2 0 0 4「M o c h i z u k i e t a l . , 2 0 0 4」)、それゆえ、G S E 2 4 . 2ペプチドによって生じる作用は、h T E R Tレベルの増加がテロメラーゼ複合体の形成を安定化させることができるので、h T E R Tレベルの増加およびh T Rの大きな安定化に起因し、それによってh T Rの劣化を阻止する。この関連において、本発明においては、G S E 2 4 . 2ペプチドによりトランスフェクトされた細胞において、h T Rではなく、h T E R Tタンパク質プロモーターがc - m y c発現に依存する方法において、とくに、プロモーターのプリンの豊富なP 1領域(r e g i o n)に配置されたN H E I I I領域に対するその結合によって構成的に活性化され(P u 2 7、実施例2参照)、かくして転写因子がDNAをアクセスできる方法において、DNAの2次的配座の変化を可能にする。その二次的構造を変性するこの領域の配列のあらゆる変化はG S E 2 4 . 2ペプチドの活性を変更する。

20

【0035】

同様に、ヒトG S E 2 4 . 2ペプチドと等価の配列(イーストのC B F 5、エス・セレビシアエ C B F 5「C B F 5 o f y e a s t , S . c e r e v i s i a e C B F 5」)はh T E R Tの活性化と同様な活性(データは示さない)を有し、ジスケリンのこの領域(d o m a i n)の活性における高度の機能的な保存を指示し、かくして本発明に使用され得るG S E 2 4 . 2と類似する素子または配列の多数の可能性を特定しかつ例示する。

30

【0036】

更に、このG S E 2 4 . 2ペプチドは、シスプラチンに対する生存能力を有するヒト細胞系を備えている(実施例1)。2 4 . 2細胞系はテロメラーゼ1の阻害物質の面の生存能力を増加する。この阻害物質はテロメラーゼ中にG - 四重体(G - q u a d r u p l e x e s)を形成しかつテロメラーゼ活性を減少するシスプラチンと同様の作用メカニズムを有する(サン等、1 9 9 7「S u n e t a l . , 1 9 9 7」)。h T E R T介在配列(イントロン)中にG - 四重体を形成する配列も記載されており、この阻害物質がまたh T E R Tレベルを減少することが可能であり、それによってまたテロメラーゼ活性を減少する(ルマテルール等、2 0 0 4「L e m a t e l e u r e t a l . , 2 0 0 4」)。

40

【0037】

シスプラチンとテロメラーゼの阻害物質との双方がテロメラーゼ活性を妨害することができるG - 四重体の形成を安定化する(レドン等、2 0 0 1「R e d o n e t a l . , 2 0 0 1」)ことを心に留めて、G S E 2 4 . 2ペプチドはこれらのG - 四重体の形成を抑制または減少することによってこれらの阻害物質の抗力を減少することができるか、またはh T E R Tレベルを増加することができ、かくして他のメカニズムによってテロメラーゼ活性を増加する。

【0038】

遺伝子抑制素子(G S E s)はペプチドまたはRNAアンチ - センス抑制遺伝子を符号化しかつ哺乳動物の細胞中の遺伝子発現について優性形質方法で作用する生物学的に活性

50

の cDNA 断片である。GSE24.2 はヌクレオチド 268 ないし 433 を含みかつ RUB (図 2b、SEQ ID NO12 および 14 参照) と呼ばれる異なる種の 2 つの高度に保存された領域 (ドメイン) によって形成される配列に対応する 165 - pb 断片である。これらの領域は snRNAs のプソイドウリジン化において重要な機能を有すると思われる (ズッチー二等、2003; パン等、2003「Zucchini et al., 2003; Pan et al., 2003」)、より意外なことに、個別にクローン化されたかかる領域により調製されたヌクレオチド配列は 55 アミノ酸の最初に記載した全体の配列ようにテロメラーゼプロモーターの基本活性を増加した (実施例 1.7、図 8c)。シスプラチンに対する抵抗を誘導しかつテロメラーゼ活性の欠乏を補償するこの活性は完全なタンパク質 (SEQ ID 4) またはアミノ酸末端断片があらゆる活性を少しも持たないので、GSE24.2 配列に見出されるジスケリンの領域に単に配置されている。最後に、これらの結果は、GSE24.2 素子又はその誘導体がテロメラーゼ活性を回復する薬剤として使用され得るようにテロメラーゼ複合体の変質 (テロメアの短縮及び細胞老化又は幹細胞の疾病) によって発生されるヒト障害または疾病に関する新規な治療的期待を開く。更に、細胞表現型中のテロメアの短縮、骨髄不全、免疫抑制およびガンに対する素因を含む DC 以外の異なる症候群が存在する。テロメア遺伝子はそれらのいずれかの突然変異に影響を及ぼされないが、テロメラーゼ置換およびテロメラーゼ活性がある。

【0039】

それゆえ、本発明の 1 つの目的はジスケリンの GSE24.2 断片の塩基配列または哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部にテロメラーゼ活性を回復することができる前記塩基配列によってコードされるタンパク質又はペプチド配列に基づいてテロメラーゼ活性を誘導又は活性化する化合物、即ち本発明の活性体化合物にある。

【0040】

本発明に使用される用語「テロメラーゼを誘導又は活性化する化合物」は強さを増強するかまたはその生物学的活性の存続時間を延長する分子に関するものである。この定義は更に GSE24.2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現を可能にするそれらの化合物または分子を包含している。活性体化合物はペプチド、タンパク質またはポリヌクレオチドから構成することができる。

【0041】

かくして、本発明の特定の目的は哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部においてテロメラーゼ活性の回復を誘導するたんぱく質またはペプチドの発現を可能にし、かつ以下のグループ、すなわち、

- a) ヒト GSE24.2 の塩基配列 (SEQ ID NO1) から成る塩基配列、
- b) a) の配列に類似する塩基配列、
- c) a) および b) の配列のいずれかの断片、
- d) a), b) および c) に属するいずれかの配列を含む塩基配列

に属している 1 つまたは複数の GSE24.2 の塩基配列から構成される化合物、即ち、本発明の GSE24.2 遺伝子配列から成る化合物にある。

【0042】

この記載に使用される意味において、用語「類似する」は本明細書に示される配列に基づいて単離または構成することができるあらゆるヌクレオチド配列を含むこと、例えば、GSE24.2 配列 (SEQ ID NO2) またはその断片 (SEQ ID NO12 および SEQ ID NO14) の活性を真似ることができるペプチドまたはタンパク質を符号化することができる 1 つまたはそれ以上のヌクレオチドの挿入、分子の末端のいずれかにおける 1 つまたはそれ以上のヌクレオチドの追加、または配列の末端またはその配列の内部における 1 つまたはそれ以上のヌクレオチドの削除を含んでいる保存または非保存のヌクレオチド置換を導入することによって単離または構成することができるあらゆるヌクレオチド配列を包含することを意図している。

【0043】

ジスケリン酵素は幾つかの有機体中に存在するプソイドウリジン合成酵素のファミリーに属している（図3B参照、ミッチェル等、1999「Mitchell et al., 1999」）。本発明に示された情報及び自然界に認知されている各種の有機体に基づいて、当業者は本発明に示した塩基配列に類似する塩基配列を単離または構成することができる。

【0044】

一般に、類似の塩基配列は上述した塩基配列と実質上相同である。この記載に使用される意味において、表現「実質上相同」は当該の塩基配列が少なくとも30%、好ましくは少なくとも85%、またはより好ましくは少なくとも95%の同一度を有することを意味する。

10

【0045】

本発明に使用される用語「塩基配列」はDNA、cDNAまたはmRNA配列に関するものである。

【0046】

本発明の特定の実施形態はSEQ ID NO1から構成されるa)のGSE24.2配列の塩基配列である。

【0047】

本発明の他の特定の実施形態はTruBIおよびTruBIIペプチド領域をそれぞれ符号化するSEQ ID NO11またはSEQ ID NO13から構成されるb)のGSE24.2配列の塩基配列である（実施例1.7）。

20

【0048】

d)として識別されたGSE24.2ヌクレオチド配列はGSE24.2遺伝子構造体に対応する。本発明のこのGSE24.2遺伝子構造体は必要ならばかつ発現されたペプチドの良好な単離、検出または細胞質分泌を可能にするために、前記ペプチドの単離、検出または細胞質分泌のために使用され易いペプチドをコードする塩基配列を含むこともできる。それゆえ、本発明の他の特定の目的はGSE24.2塩基配列に加えて、発現されたペプチドの単離、検出または細胞質分泌を許容するペプチドまたはペプチド配列をコードするあらゆる他の塩基配列を含み、例えば、図示のためにかつ本発明の範囲をこれに限定することなく、ポリヒスチジン配列（6xHis）、単クローン抗体によって識別し得るペプチド配列（例えば、その識別のため）、または免疫親和性クロマトグラフによって生じる溶解タンパク質を純化するのに使用され得るあらゆる他のペプチド、すなわち、c-myc, HA, E-tagのごときtagペプチドを含むGSE24.2遺伝子構造体を提供することにある（「使用している抗体、実験マニュアル」、エド・ハーロー、およびデイビッド・レーン著、ニューヨーク州所在のコールド・ハーバー・ラボラトリー・プレス、童、タグgingタンパク質。第347頁乃至第377頁「Osinig antibodies: a laboratory manual», Ed. Harlow and David Lane (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Chapter: Tagging proteins pp. 347-377」）。

30

【0049】

上述したGSE24.2の塩基配列およびGSE24.2遺伝子構造体は従来技術において広く知られている技術を使用することにより当業者によって得ることができる（サムブルック等著、「分子クローニング、実験マニュアル」、第2版、ニューヨーク州に所在のコールド・ハーバー・ラボラトリー・プレス社、1989年、第1乃至第3巻「Sambrook et al., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989. vols. 1-3」）。前記ヌクレオチド配列は細胞の内部における適宜な条件下でのその発現の調整を可能にする遺伝子発現ベクターに統合され得る。

40

【0050】

50

それゆえ、本発明の他の特定の目的は哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部においてテロメラーゼ活性を回復することができるたんぱく質またはペプチドの発現を可能にする本発明に記載した G S E 2 4 . 2 の塩基配列または G S E 2 4 . 2 遺伝子構造体を含む G S E 2 4 . 2 発現ベクターを提供することにある。特定の実施形態の 1 例は本発明の p L N C X 2 4 . 2 発現ベクターである（実施例 1 および 2 参照）。

【 0 0 5 1 】

一般に、発現ベクターは本発明に示された G S E 2 4 . 2 ヌクレオチド配列または G S E 2 4 . 2 遺伝子構造体に加えて、それに有効に結合されるその転写（例えば、p 7 7 , p l a c , p t r c , p t a c , p B A D , r e t 等）を行うプロモーターと、前記転写を制御および調整する他の必要なまたは適切な配列と、妥当ならば、生成物の翻訳、例えば、転写開始及び終了信号（t l t 2 等）、ポリアデニレーション信号（p o l y a d e n y a t i o n s i g n a l ）、複製起源、リボソーム結合配列（R B S ）、転写調整体符号化配列（エンハンサー）、転写サイレンサー（t r a n e c r i p t i o n s i l e n c e r s ）、抑制体等を含んでいる。適切な発現ベクターの例は各特殊な場合の条件および要求を基づいて発現プラスミド、ウイルスベクター（DNA または RNA ）、コスミド、人工染色体等の中から選択することができ、加えて、重要な 1 つまたは複数の遺伝子によりトランスフェクトされるかまたは形質転換された細胞を選択するのに使用され得るマーカーを包含してもよい。ベクターの選択は宿主細胞および意図される使用の型に依存する。それゆえ、本発明の特定の実施形態によれば、前記ベクターはプラスミドまたはウイルスベクターである。該ベクターは当業者によって公知の従来の方法によって得ることができ、同様に、微小有機体および真核生物細胞の形質転換に種々の広く知られた方法が使用することができ、それらの方法は化学的形質転換、電気穿孔方法（e l e c t r o p o r a t i o n ）、顕微鏡注射（m i c r o i n j e c t i o n ）等であり、これらの方法は種々のマニュアル（サムブルック・ジェイ、フリティッシュ・イー・エフ、およびマニアティス・ティー著、1989、分子クローニング：実験マニュアル、第 2 版、ニューヨーク州、コールド・スプリング・ハーバーに所在のコールド・スプリング・ハーバー研究所「S a m b r o o k , J . , F r i t e c h , E . F . , a n d M a n i a t i s , T . (1 9 8 9) . M o l e c u l a r c l o n i n g : a l a b o r a t o r y m a n u a l . 2 m d e d . C o l d s p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . 」）に記載されている。

【 0 0 5 2 】

加えて、本発明の他の特定の目的は哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部におけるテロメラーゼ活性を回復することを目的とした活性を有しかつ以下のグループ、すなわち、a) ヒト G S E 2 4 . 2 アミノ酸配列（S E Q I D N O 2 ）から構成されるアミノ酸配列、

b) a) の配列に類似するアミノ酸配列、

c) a) および b) の配列のいずれかの断片、

d) a) , b) および c) に属するいずれかの配列を含むアミノ酸配列

に属する 1 つまたは複数のアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチド、即ち本発明の G S E 2 4 . 2 タンパク質にある。

【 0 0 5 3 】

この記載に使用される意味において、用語「類似する」は本明細書に示した配列に基づいて単離または構成することができるあらゆるアミノ酸配列を含むこと、例えば、1 つまたはそれ以上のアミノ酸の挿入、分子の末端のいずれかにおける 1 つまたはそれ以上のアミノ酸の追加、または配列のあらゆる末端でのまたは内部における 1 つまたはそれ以上のアミノ酸の削除を含んでおりかつ S E Q I D N O 2 のテロメラーゼ回復活性を真似る保存または非保存のアミノ酸置換を導入することによって単離または構成されることができあらゆるアミノ酸配列を包含することを意図している。

【 0 0 5 4 】

10

20

30

40

50

ジスケリン酵素は複数の有機体中に存在するプソイドウリジン合成酵素のファミリーに属している（図3B参照、ミッチェル等、1999「Mitchell et al., 1999」）。本発明に示された情報かつ自然界に認められる種々の有機体を基礎にして、当業者は本発明に示されるアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列を単離または構成することができる。

【0055】

一般に、類似のアミノ酸配列は上述したアミノ酸配列と実質上相同である。この記載に使用される意味において、表現「実質上相同」はアミノ酸配列が少なくとも30%、好ましくは少なくとも85%、またはより好ましくは少なくとも95%の同一度を有することを意味する。

10

【0056】

本発明の他の特定の実施形態はa)のアミノ酸配列がSEQ ID NO 2から構成されているタンパク質である。

【0057】

本発明の他の特定の実施形態はc)のアミノ酸配列のその断片がSEQ ID NO 12またはSEQ ID NO 14から構成されているタンパク質である。

【0058】

他方において、本発明の他の追加の目的は本発明のGSE 24.2ヌクレオチド配列、構造体および発現ベクターを含みかつ本発明のGSE 24.2ペプチドまたはタンパク質が適切に発現され得る遺伝子的に変性された真核生物の - 好ましくはヒトの - または原核生物の細胞、即ち本発明のGSE 24.2細胞を提供することにある。これらの細胞は当業者に知られる遺伝子工学技術を使用するヌクレオチド配列によって形質転換されるか、インフェクトされるかまたはトランスフェクトさせることができ（サンプブルック・ジェイ、フリティッシュ・イー・エフ、およびマニアティス・ティー著、1989年、分子クローニング、実験マニュアル、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・研究所「Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory」）そして本発明の一部である。これらの細胞は医薬組成物、即ち前記ヌクレオチド配列の組み換え型の増幅の基礎を形成できるテロメラーゼ活性を回復することができるペプチドの生成に有用であるか、または遺伝子治療等用の細胞としてそれ自体有用である。特定の実施形態はヒトの組織再生用の細胞として使用され得る種々の細胞菌株からこれらのGSE 24.2ヌクレオチド配列によって形質転換されたヒト細胞である。

20

30

【0059】

遺伝子発現系はホスト細胞ゲノムに新規な遺伝子材料の統合を可能にするかまたは可能にしない。かくして、GSE 24.2の塩基配列、遺伝子構造または発現ベクターはテロメラーゼ活性の変質により発生する疾病に冒されているヒトの治療および予防の遺伝子治療方法においてテロメラーゼ活性の変質により冒されたホスト細胞、好ましくはヒト細胞を保護するための薬剤として使用され得る。同様に、本発明のGSE 24.2細胞はヒトの組織または細胞の再生または移植用薬剤として使用することができる。生物薬剤手段および遺伝子治療方法は、本発明の明細書に記載された情報により、それらが比較的容易に開発され得るように当業者に十分に知られている。そのうえ、タンパク質またはペプチドおよび細胞自体は生物薬剤となる。

40

【0060】

それゆえ、本発明の他の目的は図示のためにかつ本発明の範囲を制限することなしに以下のグループ、すなわち、老化または老化促進、神経退化病、先天性角化異常症、クリ・デュ・シャ（CdC, OMIM 123450）、運動失調毛細管拡張症（AT, OMIM 208900）、ナイメーヘン破壊症候群（NBS, OMIM 251260）、ブルーム症候群（BS, OMIM 109000）、ウェルナー症候群（WS, OMIM 277900）、ファンコーニ貧血（FA, OMIM 227650）、潰瘍性大腸炎、血管

50

老化、アテローム性動脈硬化症およびガンに属しているテロメラゼ活性の変質、好ましくは減少により発生された疾病の治療用の薬剤または医薬組成物の調製における本発明の G S E 2 4 . 2 活性体化合物の使用にある。

【 0 0 6 1 】

最近行われた研究はテロメラゼ活性の維持における欠乏と骨髄不全を有する他の症候群との間の潜在的な関係を際立たせた。先天性角化異常症を有する患者の死亡の主たる原因は日和見感染または出血（原因の 7 0 % において）によって発生される骨髄不全である。他の死亡原因は肺疾患およびガンである。

【 0 0 6 2 】

クリ・デュ・シャ病（C d C , O M I M 1 2 3 4 5 0）は染色体 5 の短いアームの欠失と関連する先天的な遺伝性症候群であり、そして 1 : 2 0 , 0 0 0 および 1 : 5 0 , 0 0 0 の頻度で現れ、深刻な精神遅滞（2 0 以下の I Q）に冒された患者の頻度は 1 % に達する。

10

【 0 0 6 3 】

運動失調毛細管拡張症（A T , O M I M 2 0 8 9 0 0）は A T M 遺伝子の突然変異によって生じる常染色体劣性症候群である。問題は寿命の 2 ないし 5 年の間に現れかつ進行性神経退化（大脳運動失調症）、目の毛細管拡張症、免疫不全、性機能低下症、ゲノム不安定性、早老化、軽い糖尿病、小人及びガンに対する素因（リンパ腫および白血病）からなる。

【 0 0 6 4 】

20

ナイメーヘン遮断症候群（N B S , O M I M 2 5 1 2 6 0）はニブリン遺伝子の突然変異または損失によって発生される常染色体劣性疾病である。この症候群は小頭症、破壊的顔面外観、知能の遅れた成長、進行性精神遅滞およびリンパ腫および呼吸管感染に対する強力な素因を特徴とする。

【 0 0 6 5 】

ブルーム症候群（B S , O M I M 2 1 0 9 0 0）およびウェルナー症候群（W S , O M I M 2 7 7 9 0 0）。B S は r e c Q 遺伝子の突然変異、即ちヘリケース活性を有するタンパク質によって誘導される常染色体劣性症候群である。W S は、また、ヘリケース r e c Q の突然変異によって発生される常染色体劣性症候群である。両疾病は加速された老化を特徴とするものであり、アテローム性動脈硬化症、骨粗鬆症、糖尿病、両眼白内障およびある種の腫瘍、とくに肉腫（W S）および白血病（B S）に対する素因を含んでいる。

30

【 0 0 6 6 】

ファンコーニ貧血（F A , O M I M 2 2 7 6 5 0）は、多数の発育欠乏、骨髄不全症、骨髄白血病の発生率の一千倍の増加および固体腫瘍を発生する強力な素因を特徴とする常染色体劣性疾病である。突然変位担体中の疾病の発生頻度は 1 : 1 0 0 である。

【 0 0 6 7 】

潰瘍性大腸炎は 1 0 0 人中のスペイン人の 1 人が冒される疾病である。それは遺伝的かつ環境的要因が介入する自己免疫起源を有すると考えられている。潰瘍性大腸炎は小腸が冒され、その結果の潰瘍化、粘液バリアの破裂および結腸粘膜の萎縮を有する結腸葉の慢性炎症を特徴とするものである。ガンの危険は疾病の持続時間により増加しそして結腸およびリンパ腫のごとき多数の器官に発生する。

40

【 0 0 6 8 】

他方では、細胞老化の結果はアテローム性動脈硬化症を含んでいる。一方では、テロメラゼ機能障害はアテローム性動脈硬化性プラークにより血管内に存在する。血管原種細胞中のテロメラゼの再活性はこれらの細胞の分化能力および脈管形成を増大する。これらの原種細胞の損失は重大な血管機能障害に寄与し、それゆえ、抗老化治療は老化およびアテローム性動脈硬化症の血管作用を一時的に和らげるような新規のアプローチを提供する。

【 0 0 6 9 】

50

最後に、本発明の G S E 2 4 . 2 素子の他の潜在的な適用に関し、いったん、この素子の生物学的活性を実施し、そのメカニズム、またはメカニズムの 1 つを知れば、その素子を N H E I I I 領域 (r e g i o n) に結合することにより非常に幅を広くすることができる。この領域には、他のプロモーターのこのポリプリン配列の幾つかの例が存在するが、しかしこのポリプリン領域は C C R 5 および P D G F A 遺伝子のプロモーター領域に配置されている。他方で、n m 2 3 H 1 転移抑制ペプチド (ヨシロウ・オー等、2 0 0 1 ; グラント等、2 0 0 4) が存在するけれども、この N H E 領域 (d o m a i n) と互いに影響し合う幾つかの転写因子が知られている。この関連において、本発明の G S E 2 4 . 2 素子は腫瘍成長および潰瘍の転移拡散の抑制因子として使用することができ、それは本発明の一部である。

10

【 0 0 7 0 】

本発明に使用される用語「神経退化病」は、とくに、図示のために、以下のグループ、すなわち、アルツハイマー病、パーキンソン病、小脳性運動失調症および脊髄変性症に属している疾病に関するものである。

【 0 0 7 1 】

本発明の他の目的はテロメラーゼ活性の発生および維持を刺激することができる 1 つまたはそれ以上の治療的に許容できる補助薬および / または賦形剤と結合するテロメラーゼ活性を回復することができる治療的に有効な量の化合物または作用剤を含んでいるテロメラーゼ活性の変質、好ましくは活性の減少により発生する疾病、障害または病態の治療用の医薬組成物または薬剤、即ち本発明の医薬組成物にある。

20

【 0 0 7 2 】

前記組成物に使用され得る治療的に許容し得る補助薬および賦形剤は治療組成物の調製に習慣的に使用される当業者に知られている補助薬および賦形剤である。

【 0 0 7 3 】

この記載に使用される意味において、表現「治療的に有効な量」は所望の効果を発生するために計算されたテロメラーゼ活性を回復することができる作用剤または化合物の量に関するものであり、一般に、それは他の原因の中で患者の年齢および状態、変質または障害の重大さ、および投与のルートおよび頻度を含んでいる化合物の特性によって決定される。

【 0 0 7 4 】

30

他の特定の実施形態において、前記治療組成物は治療的に許容し得る希釈剤中において固体形状または水性懸濁液で調製される。本発明によって提供される治療組成物は適切な投与ルートによって投与することができ、このため、前記組成物は選択された投与ルートに適切な医薬形状で調合される。特定の実施形態において、本発明によって提供される治療組成物の投与は非経口ルート、経口ルート、腹腔内ルート、皮下ルート等によって実施される。薬剤投与の種々の医薬形状およびそれらを得るのに必要な添加剤の説明は、例えば、「トラタド・デ・ファルマシア・ガレニカ」、シー・ファウリ・イ・トリロ、1 9 9 3、ルサン 5、S . A、エデシオネス、マドリッド (「 T r a t a d o d e F a r m a c i a G a l e n i c a 」 , C . F a u l i i T r i l l o , 1 9 9 3 , L u z a n 5 , S . A . E d i c i o n e s , M a d r i d) に見出され得る。

40

【 0 0 7 5 】

本発明の他の特定の目的はテロメラーゼ活性を回復することができる化合物または作用剤が以下のグループ、すなわち、哺乳動物、好ましくはヒトの細胞の内部におけるテロメラーゼ活性を回復することができるタンパク質またはペプチドの発現を可能にする G S E 2 4 . 2 配列、遺伝子構造体またはベクターに属する本発明の医薬組成物にある。

【 0 0 7 6 】

本発明の特定の実施形態はテロメラーゼ活性を回復することができる化合物または作用剤が以下のグループ、すなわち、

- a) ヒト G S E 2 4 . 2 の塩基配列 (S E Q I D N O 1) から成る塩基配列、
- b) a) の配列に類似する塩基配列、

50

c) a) および b) の配列のいずれかの断片、
 d) a) , b) および c) に属するいずれかの配列を含む塩基配列
 に属する1つまたは複数の G S E 2 4 . 2 の塩基配列によって示されるポリヌクレオチド
 から成る本発明の医薬組成物である。

【 0 0 7 7 】

本発明の他の特定の実施形態は a) の塩基配列が G S E 2 4 . 2 の塩基配列 (S E Q
 I D N O 1) である本発明の医薬組成物である。

【 0 0 7 8 】

本発明の他の特定の実施形態は c) の塩基配列が S E Q I D N O 1 1 または S E Q
 I D N O 1 3 塩基配列である本発明の医薬組成物である。

10

【 0 0 7 9 】

本発明の他の特定の実施形態は塩基配列がベクター、好ましくは p L N C X 2 4 . 2 ベ
 クターである本発明の医薬組成物である。

【 0 0 8 0 】

本発明の他の特定の目的はテロメラーゼ活性を回復することができる化合物または
 作用剤が本発明の G S E 2 4 . 2 配列、遺伝子構造またはベクターによって符号化される
 タンパク質またはペプチドである本発明の医薬組成物にある。

【 0 0 8 1 】

本発明の特定の実施形態は G S E 2 4 . 2 タンパク質またはペプチドが以下のグループ
 、すなわち、

20

a) ヒト G S E 2 4 . 2 アミノ酸配列 (S E Q I D N O 2) から成るアミノ酸配列、
 b) a) の配列に類似するアミノ酸配列、
 c) a) および b) の配列のいずれかの断片、
 d) a) , b) および c) に属するいずれかの配列を含むアミノ酸配列
 に属する本発明の医薬組成物である。

【 0 0 8 2 】

本発明の他の特定の実施形態は a) のアミノ酸配列が S E Q I D N O 2 配列である
 本発明の医薬組成物である。

【 0 0 8 3 】

本発明の他の特定の実施形態は c) のアミノ酸配列が S E Q I D N O 1 2 または S
 E Q I D N O 1 4 配列である本発明の医薬組成物である。

30

【 0 0 8 4 】

本発明の他の特定の目的はテロメラーゼを活性化する化合物または作用剤が G S E 2 4
 . 2 配列、構造またはベクターによって形質転換される細胞、好ましくはヒト細胞である
 本発明の医薬組成物にある。

【 0 0 8 5 】

本発明の他の目的はその細胞の内部においてテロメラーゼ活性の回復を可能にする適切
 な投与量における医薬組成物の投与からなっているテロメラーゼ活性の変質により発生す
 る疾病、障害または病体に冒されている哺乳動物、好ましくはヒトの治療または予防方法
 における本発明の医薬組成物の使用、即ち本発明の医薬組成物の使用にある。

40

【 0 0 8 6 】

本発明の医薬組成物は他の医薬化合物と分離してまたは共同して治療方法に使用するこ
 とができる。

【 0 0 8 7 】

本発明の他の特定の目的は図示のためにかつ本発明の範囲を制限することなしに、以下
 のグループ、すなわち、老化または老化促進、神経退化病、先天性角化異常症、クリ・デ
 ユ・シャ (C d C , O M I M 1 2 3 4 5 0) 、運動失調毛細管拡張症 (A T , O M I M
 2 0 8 9 0 0) 、ナイメーヘン破壊症候群 (N B S , O M I M 2 5 1 2 6 0) 、ブル
 ーム症候群 (B S , O M I M 2 1 0 9 0 0) 、ウェルナー症候群 (W S , O M I M 2 7
 7 9 0 0) 、ファンコーニ貧血 (F A , O M I M 2 2 7 6 5 0) 、潰瘍性大腸炎、血管

50

老化、アテローム性動脈硬化症およびガンに属しているテロメラーゼ活性の変化により発生されかつヒトを冒している疾病または障害の治療方法における本発明の医薬組成物の使用にある。

【 0 0 8 8 】

本発明の他の特定の実施形態は以下のグループ、すなわち、アルツハイマー病、パーキンソン病、小脳性運動失調症および脊髄変性症に属している神経退化病の治療方法における本発明の医薬組成物の使用である。

【 0 0 8 9 】

本発明の他の特定の実施形態はX - 染色体 - 連鎖型先天性角化異常症の治療方法における本発明の医薬組成物の使用である。

10

【 0 0 9 0 】

本発明の他の特定の実施形態は常染色体優性の先天性角化異常症の治療方法における本発明の医薬組成物の使用である。

【参考文献】

【 0 0 9 1 】

ベトナレク・エー、シルカイトス・エー、グリーン・エー、ルーベット・アール、ケロップ・ジー、クリストフ・ケー、およびアルダス・エム著、1999年、4 - (ヒドロキシフェニル) ルチナミド治療の乳房の腫瘍における細胞増殖およびテロメラーゼ活性の抑制。ガンの発生。第20(5)巻：第879頁 - ベッスラー・エム、ウィルソン・ディービー、メイソン・ピージェイ著、2004年。先天性角化異常症およびテロメラーゼ。小児科医の現代持論。2月号、第16(1)巻、第23 ~ 28頁。批評。(Bednarek A, Shilkaitis A, Green A, Lubet R., Kelloff G, Christov K and Aldaz M. 1999. Suppression of cell proliferation and telomerase activity in 4 - (hydroxyphenyl) retinamide - treated mammary tumors. Carcinogenesis. 20(5): 879 - Bessler M, Wilson DB, Mason PJ. 2004. Dyskeratosis congenita and telomerase. Curr Opin Pediatr. Feb; 16(1): 23 - 8. Review.)

20

30

【 0 0 9 2 】

バーガー・エーエム、ダブル・ジェイエー、およびニューエル・ディーアール著、1997年。ヒト睾丸ガン細胞におけるシスプラチンによるテロメラーゼ活性の抑制。ヨーロッパ癌ジャーナル、第33(4)巻：第638頁乃至第644頁。(Burger AM, Double JA and Newell DR. 1997. Inhibition of Telomerase Activity by Cisplatin in Human Testicular Cancer Cells. Eur J Cancer. 33(4): 638 - 44)

【 0 0 9 3 】

セザール・エージェイおよびグリフィス・ジェイディー著、2004年。ALT細胞中のテロメラーゼDNAは自由テロメラーゼサークルおよび外来のt - ループによって特徴付けられる。分子細胞生物学。第24(22)巻：第9948頁 - 第9957頁。(Cesare AJ and Griffith JD. 2004. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. Mol. Cell. Biol. 24(22): 9948 - 9957.)

40

【 0 0 9 4 】

チェン・エッチ、ウー・ゼット、ツェン・ジェイ、ルウ・ジー、ヤン・ジェイ、リウ・エム、フアン・ディー、およびリン・ジェイ著、2003年。培養されたヒト脈絡膜黒色腫細胞におけるシスプラチンによるテロメラーゼ活性および細胞毒作用についての抑制。

50

ヤン・ケー・シュエー・バオ。第19(1)巻:第54頁-第59頁。(Cheng H, Wu Z, Zheng J, Lu G, Yan J, Liu M, Huang D, Lin J. 2003. Inhibition on telomerase activity and cytotoxic effects by cisplatin in cultured human choroidal melanoma cells. Yan Ke Xue Bao. 19(1):54-9)

【0095】

フー・ディーおよびコリンズ・ケー著、2003年。ヒトテロメラーゼRNAおよびH/ACA小核RNAの異なる生物発生進路。分子細胞。第11(5)巻:第1361頁-第1372頁。グラント・シーエル、パウエル・ティージェイ、ナグリー・アールビー、ピアース・ゴージェイ、ティエ・ディー、グリーン・グスマン・エム、およびハーレー・エルエッチ著。G-四重サイレンサー要素およびcMYC過発現、NM23抑圧、および治療救助に対するそれらの関係。米国国立科学学会会報。2004年、第101(16)巻:第6140頁-第6145頁。(Fu D, Collins K. 2003. Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs. Mol Cell. 11(5):1361-72. Grand CL, Powell TJ, Naglee RB, Bearss BJ, Tye D, Gleason-Guzman M, Hurley LH. Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue. Proc Natl Acad Sci USA. 2004, 101(16):6140-6145)

【0096】

ハイス・エヌエス、マイト・エスダブリュー、バルリアーミー・ティージェイ、クラウク・エスエム、ウーマン・エス、メイソン・ピーージェイ、ホーストカ・エー、およびドカル・アイ著。1998年。X-結合の先天性角化異常症は推定上の仁機能をもつ非常に保護された遺伝子の突然変異によって発生される。出生遺伝学。第19(1)巻:第32頁-第38頁。(Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauch SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Doka I. 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. Nat Genet. 19(1):32-8.)

【0097】

イシバシ・ティーおよびリップード・エスジェイ著、1998年。シスプラチンで治療された細胞中のテロメラーゼ損失。米国国立科学学会会報。第14;95(8)巻:第4219頁-第4223頁。(Ishibashi T, Lippard SJ. 1998. Telomere loss in cells treated with cisplatin. Proc Natl Acad Sci USA. 14;95(8):4219-23.)

【0098】

ジュン・ヒュン・キム、ジョー・ヒー・キム、グ・オイ・リー、サン・ウーン・キム、およびクォン・チュン著、2003年。ヒトガン細胞の細胞老化を導いている強力なテロメラーゼ抑制体であるキノサリン派生物の識別。生化学ジャーナル、第15;373(Pt2)巻:第523頁-第529頁。(Jun Hyun KIM, Joo Hee KIM, Gun Eui Lee, Sang Woong KIM and in Kwon CHUNG. 2003. Identification of a quinoxaline derivative that is a potent telomerase inhibitor leading to cellular senesc

10

20

30

40

50

ence of human cancer cells. Biochem J. 15; 373 (Pt 2): 523-9.)

【0099】

ルマルティール・ティー、ゴメス・ディー、パティルスキー・アール、マンダイン・イー、マイリエット・ピー、およびリオ・ジェイエフ著、2004年。テロメラーゼの特殊なリガンド抑制体による四重のc-myc遺伝子促進剤の安定化。生化学生物物理学研究通信。第22; 323(3)巻: 第802頁 - 第808頁。マローン・エー、およびメイソン・ピージェイ著、2003年。先天性角化異常症。細胞分子生命科学、第60(3)巻: 第507頁 - 第517頁。批評。(Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, Riou JF. 2004. Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase. Biochem Biophys Res Commun. 22; 323(3): 802-8. Marrone A, Mason PJ. 2003. Dyskeratosis congenita. Cell Mol Life Sci 60(3): 507-17. Review.)

10

【0100】

メセ・エッチ、ウエヤマ・ワイ、スズキ・エー、ナカヤマ・エス、ササキ・エー、ハマカワ・エッチ、およびマツムラ・ティー著、2001年。うろこ状細胞の悪性腫瘍細胞系においてシスプラチンにより殺している腫瘍細胞の測定としてのテロメラーゼ活性の抑制。化学療法、第47(2)巻: 第136頁 - 第142頁。(Mese H, Ueyama Y, Suzuki A, Nakayama S, Sasaki A, Hamakawa H, Matsumura T. 2001, Inhibition of telomerase activity as a measure of tumor cell killing by cisplatin in squamous cell carcinoma cell line. Chemotherapy. 47(2): 136-42.)

20

【0101】

ミッチェル・ジェイアール、ウッド・イー、コリンズ・ケー著、1999年。テロメラーゼ成分はヒト疾病、先天性角化異常症において欠点がある。ネイチャー。12月2日; 第402(6761)巻: 第551頁 - 第555頁。(Mitchell JR, Wood E, Collins K. 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. Nature. Dec 2; 402(6761): 551-5.)

30

【0102】

モチヅキ・ワイ、ヒー・ジェイ、クルカラニ・ビー、ベッスラー・エム、およびメイソン・ピージェイ著、2004年。マウスジスケリン突然変異はテロメラーゼRNAの蓄積および小核RNA、テロメラーゼ活性、およびリボソームRNA処理に影響を及ぼす。米国国立科学学会会報。第20; 101(29)巻: 第10756頁 - 第10761頁。(Mochizuki Y, He J, Kulkarni S, Bessler M, Mason PJ. 2004. Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar SA. 20; 101(29): 10756-61.)

40

【0103】

オー・エス、ソン・ワイエッチ、キム・ユージェイ、イム・ジェイ、およびキム・ティーケー著、1999年。通常および腫瘍細胞におけるヒトテロメラーゼ(cTERT)遺伝子の異なるプロモーター活性に関するMy cの体内および対外分析。生化学生物物理学研究通信、第22; 263(2)巻: 第361頁 - 第365頁。(Oh S, Song YH, Kim UJ, Yim J, Kim TK. 1999. In vivo and i

50

n vitro analyses of Myc for differential promoter activities of the human telomerase (hTERT) gene in normal and tumor cells. Biochem Biophys Res Commun. 263(2):361-5.)

【0104】

パン・エッチ、アガルワラ・エス、マウスタカス・ディーティー、ファイナー・モア・ジェイ、およびシュトラウド・アールエム著、2003年。tRNAプソイドウリジン合成酵素TruBおよびそのRNA複合体；堅固な結合および誘導された嵌合の組み合わせによるRNA認知。米国国立科学学会会報。第28；100(22)巻：第12648頁 - 第126

10

53頁。(Pan H, Agarwalla S, Moustakas DT, Finer-Moore J, Stroud RM. 2003. Structure of tRNA pseudouridine synthase TruB and its RNA complex: RNA Acad Sci USA 28;100(22):12648-53.)

【0105】

プール・ジェイシー、アンドリュース・エルジー、およびトレフスボル・ティーオー著、2001年。テロメラーゼ(cTERT)の触媒サブユニットの活性、機能、および遺伝子調整。遺伝子第16；269(1-2)巻：第1頁 - 第12頁。批評。(Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. 2001. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). Gene. 16;269(1-2):1-12. Review.)

20

【0106】

レドン・エス、ボンバード・エス、エリソンド・リオハス・エムエー、およびコッタード・ジェイシー著、2001年。(T2G4)4テロメラーゼ配列：構造およびクロスリンク研究。生化学。第24；40(29)巻：第8463頁 - 第8470頁。(Redon S, Bombard S, Elizondo-Riojas MA, Chottard JC. 2001. Platinatation for the (T2G4)4 telomeric sequence: a structural and cross-linking study. Biochemistry. 24;40(29):8463-70.)

30

【0107】

ロニンソン・アイビー、グドコフ・エーヴィ、ホルツメイヤー・ティーエー、キルシュリング・ディージェイ、カザロフ・エーアール、ゼルニック・シーアール、マゾ・アイエー、アキセノビッチ・エス、およびシンマパヤ・アール著、1995年。遺伝子抑制要素：分子ガン研究用の新規な手段。ガン研究。第15；55(18)巻：第4023頁 - 第4028頁。(Roninson IB, Gudkov AV, Holzmayer TA, Kirschling DJ, Kazarov AR, Zelnick CR, Mazo IA, Axenovich S, Thimmapaya R. 1995. Genetic suppressor elements: new tools for molecular oncology. Cancer Res. 15;55(18):4023-8.)

40

【0108】

サンチェス・ペレス・アイ、ムルギア・ジェイアール、およびペローナ・アール著、1998年。シスプラチンは細胞死亡に関連付けられるJNKの永続性の活性を含んでいる。ガン遺伝子。第29；16(4)巻：第533頁 - 第540頁。(Sanchez-Perez I, Murguia JR, Perona R. 1998. Cisplatin induces a persistent activation of JNK

50

that is related to cell death. *Oncogene* 29;16(4):533-40.)

【0109】

シデッキ・ジエイン・エー、グラント・ソーエル、ベアース・ディージェイ、およびハーレイ・エルエッチ著、2002年。c-MYC転写を抑制するような小さい分子による促進剤領域およびその目標におけるG-クアドルプレックスに関する直接的な証拠。米国国立科学学会会報。第3;99(18)頁:第11593頁-第11598頁。(Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. 2002. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 3;99(18):11593-8.)

10

【0110】

シリナビン・シーおよびトロブリッジ・エー著、1975年。先天性角化異常症:臨床的特徴および遺伝的態様。医療遺伝学ジャーナル。第12巻,第339頁-第354頁。(Sirinavin C and Trowbridge A. 1975. Dyskeratosis congenita: clinical features and genetic aspects. *J. Med. Genet.* 12, 339-354.)

20

【0111】

サン・ディー、トンプソン・ビー、キャサズ・ビーイー、サラザール・エム、ケルウィン・エスエム、トレント・ジェイディー、ジェンキンス・ティーシー、ナイドル・エス、およびハーレイ・エルエッチ著、1997年。G-クアドルプレックス-相互作用化合物によるヒトテロメラーゼの抑制。医療科学ジャーナル。第4;40(14)巻:第2113頁-第2116頁。(Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin SM, Trent JO, Jenkins TC, Neidle S, Hurley LH. 1997. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J Med Chem.* 4;40(14):2113-6.)

30

【0112】

トロブリッジ・エーエー、シリナビン・シーおよびリンマン・ジェイダブリュー著、1977年。先天性角化異常症:同胞群の血液学的評価および文献の批評。増幅血液学ジャーナル。第3巻。第143頁-第152頁。(Trowbridge AA, Sirinavin C and Linman JW. 1997. Dyskeratosis congenita: hematologic evaluation of a sibship and review of the literature. *Am. J. Hematol.* 3, 143-152.)

【0113】

ライト・ダブリューイー、シェイ・ジェイダブリュー、およびピアティスゼク・エムエー著、1995年。テロメラーゼ反復増幅プロトコル(TRAP)の変性は信頼性、直線性および感度の増加を結果として生じる。核酸研究。第25;23(18)巻:第3794頁-第3795頁。(Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. 1995. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res* 25;23(18):3794-5.)

40

【0114】

50

ヨシロウ・オー、タナカ・エム、ヨシイ・エス、ナカヤ・エヌケー、およびスギモラ・エッチ著。腫瘍転位抑制体nm23H1はTiam1とのRac1 G相互作用を調整する。米国国立科学学会会報。2001年、第98(8)巻：第4385頁 - 第4390頁。(Yoshiro O, Tanaka M, Yoshii S, Nakaya NK, Sugimora H. Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 G interaction with Tiam1. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98(8): 4385 - 4380.)

【0115】

ツァン・アールジー、ツァン・アールピー、ワン・エックスダブリュー、およびシエ・エッチ著、2002年。BEL-7404ヒト肝臓ガン細胞におけるテロメラーゼ活性およびテロメアの長さについてのシスプラチンの作用。細胞研究。第12(1)巻：第55頁 - 第62頁。(Zhang RG, Zhang RP, Wang XW, Xie H. 2002. Effects of cisplatin on telomerase activity and telomere length in BEL-7404 human hepatoma cells. Cell Res 12(1): 55 - 62.)

【0116】

ズッチーニ・シー、ストリッポリ・ピー、ビオルチ・エー、ソルミ・アール、レンツイ・エル、ダダッボ・ピー、カリンチ・ピー、およびヴァルバッソーリ・エル著、2003年。先天性角化異常症1遺伝子および新規な構成要素を含んでいるプソイドウリジン合成酵素遺伝子のヒトTRUB族。分子医療国際ジャーナル。第11(6)巻：第697頁 - 第704頁。(Zucchini C, Strippoli P, Biolchi A, Solmi R, Lenzi L, D'Addabbo P, Carinci P, Valvassori L. 2003. The human TRUB family of pseudouridine synthase genes, including the Dyskeratosis Congenita 1 gene and the novel member TRUB1. Int J Mol Med. 11(6): 697 - 704.)

【発明を実施するための最良の形態】

【0117】

図1はテロメラーゼ複合体の概略構成を示している。hTR RNAと結合して、hTERF、ジスケリン、p23, hsp90およびTEP1タンパク質はテロメラーゼのリボ核酸タンパク質複合体を構成する。

【0118】

図2は293T細胞系のJNKおよびp38死亡進路の細胞の生存能力及び活性化、すなわちシスプラチンで処理されたpLNCXおよび24.2を示す。A)細胞生存能力。293T細胞を植え付けた後に、すなわち、空のベクター(pLNCX)およびGSE24.2(24.2)を24穴を有するプレート中で発現させた後に、それらはシスプラチンの0 - 100 µg/ml間の濃度により培養された。細胞の生存能力は薬剤に対する72時間の露出後にクリスタル・バイオレット技術によって測定された。データは4つ一組で実施された2つの実験の平均を示している。B)活性動力学。シスプラチン濃度での両方の細胞系の処理は6時間にわたって図に示した。次に、JNKおよびp38の活性が活性形状をとくに認める抗体を使用して研究された。負荷制御として、JNK-1のレベルが検出された。

【0119】

図3は使用された構造に含まれるDSK配列およびDSKと同族の遺伝子の配列を示している。A)ヌクレオチド268ないし433をカバーするGSE24.2がそれに対して対応する領域を示すジスケリンのcDNAの概略図。DSK5'構造の場所が同様に示されている。B)他の有機体からのプソイドウリジン合成酵素配列に対するGSE24.2

10

20

30

40

50

2 アミノ酸の比較配列。T R U B I および T R U B I I 保存のドメインが示されている。
【 0 1 2 0 】

図 4 は 2 9 3 T 細胞系、すなわち、シスプラチンで処理された p L N C X , 2 4 . 2 , D S K 5 ' および D S K の生存能力を示している。上述し細胞系 (p L N C X , 2 4 . 2) 、先行する図に記載されたジスケリンの断片を過発現する D S K 5 ' 細胞系、およびジスケリン (D S K) の完全な c D N A を過発現する第 4 の細胞系が使用されている。生存能力は図 1 A に示されるように決定された。データは 4 つ一組で実施された 2 つの実験の平均を示している。

【 0 1 2 1 】

図 5 は 2 9 3 T 細胞系のテロメラーゼ活性、すなわち、シスプラチンにより処理された p L N C X および 2 4 . 2 のテロメラーゼ活性を示している。細胞は 6 0 m m のプレートに植え付けられ、3 日間 0 . 5 μ g / m l のシスプラチンで予め処理されかつ続いて 3 μ g / m l の投与量でシスプラチンにより処理された (予め処理されない細胞) 。テロメラーゼ活性はインテルゲン T R A P e z e アッセイによって測定された。実験は 3 回実施され、同一の結果であった。

【 0 1 2 2 】

図 6 は細胞生存能力及び 2 9 3 T 細胞系のテロメラーゼ活性、すなわちテロメラーゼ I の阻害物質で処理された p L N C X および 2 4 . 2 を示している。A) 細胞生存能力。2 4 の穴のプレート中に 2 9 3 T 細胞、すなわち、p L N C X および 2 4 . 2 を植え付けた後に、それらはテロメラーゼ I の阻害物質の 0 - 2 0 μ M 間の濃度で培養された。細胞生存能力は薬剤に対する 7 2 時間の露出後にクリスタル・バイオレット技術によって測定された。データは 4 つ一組で実施された 2 つの実験例の平均を示している。B) テロメラーゼ I の阻害物質の種々の投与量でのテロメラーゼ活性。3 日間テロメラーゼ I の阻害物質の種々の濃度の存在における 2 9 3 T 細胞、すなわち、p L N C X および 2 4 . 2 テロメラーゼ活性。それらの細胞は 6 0 m m のプレートに植え付けられかつ続いて特定された濃度および時間で処理された。テロメラーゼ活性はインテルゲン T R A P e z e アッセイによって測定された。C) テロメラーゼ I の阻害物質による種々の処理時間でのテロメラーゼ活性。1 日および 5 日での T I I (5 μ M) の存在におけるテロメラーゼ活性。その細胞は B におけるように植え付けられた。続いて、それらは特定の時間において 5 μ M の阻害物質により処理された。

【 0 1 2 3 】

図 7 は 2 9 3 T 細胞、すなわち、シスプラチンによる処理に続いて 2 9 3 T 細胞、すなわち p L N C X および 2 4 . 2 中のテロメラーゼに関連した種々の遺伝子の発現レベルを示している。その細胞は 6 0 m m のプレートに植え付けられ、3 日間 0 . 5 μ g / m l のシスプラチンによる予備処理に続いて c D D P の 3 μ g / m l により処理され、続いて、図に特定された時間 (2 日および 7 日間) で集められた。R N A の抽出に続いて、R T - P C R がメッセンジャー R N A s の発現レベルを研究するために h T E R T , h T R およびジスケリンに特定のオリゴにより実施された。開始 R N A 対照として、G A P D H の増幅用のオリゴが使用された。

【 0 1 2 4 】

図 8 は 2 9 3 T 細胞系、すなわち、p L N C X および 2 4 . 2 と p L N C X - 2 4 . 2 構造体および p L N C X のないプラスミドにより一時的にトランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞とにおける h T E R T プロモーターの活性を示している。A) p L N C X および 2 4 . 2 細胞の両方が 0 . 2 5 μ g の h T E R T - l u c リポーターベクターにより一時的にトランスフェクトされた。細胞は 6 0 m m のプレートに植え付けられた。トランスフェクション (核酸挿入) の 2 4 時間後、細胞は溶解されそして 1 0 μ g の合計タンパク質のルシフェラーゼ活性が定量化された。トランスフェクション対照として、それらの細胞はリポーターベクター、C M V - R e n i l l a と同時にトランスフェクトされた。B) 2 9 3 T 細胞は p L N C X ベクターおよび 2 4 . 2 プラスミド (5 μ g) によりトランスフェクトされ、そして両方は 0 . 2 5 μ g の h T E R T - l u c リポーターベクターにより

同時にトランスフェクトされた。Aにおけるように細胞を植え付けた後、それらはpLNCXおよび24.2でトランスフェクトされそしてhTERT-1ucリポーターベクターにより同時にトランスフェクトされ、続いてそれらはAにおけるように処理された。トランスフェクション対照として、CMV-Renillaリポーターベクターが使用された。データは非トランスフェクトの細胞に関連するルシフェラーゼの相対的な単位の比に対応する。各ポイントは、±により、3つの独立した実験例から得られた標準偏差を示している。C) 293T細胞は種々のGSE24.2, DSK, TRIB1, TRIB1I構造およびpLNCXのないプラスミド(5 μg)によりトランスフェクトされ、そして0.25 μgのhTERT-1ucリポーターベクターにより同時にトランスフェクトされた。細胞は60 mmのプレートに植え付けられ; トランスフェクション(トランスフェクト)の24時間後、それらの細胞は溶解させられかつ10 μgの合計タンパク質のルシフェラーゼ活性が定量化された。トランスフェクション対照として、それらの細胞はリポーターベクター、CMV-Renillaと同時にトランスフェクトされた。データは非トランスフェクトの細胞に関するルシフェラーゼの相対的な単位の比に対応する。各ポイントは、±により、3つの独立した実験から得られた標準偏差を示している。

【0125】

図9はシスプラチンによる処理に続くhTERTプロモーターの活性を示している。A) pLNCX細胞系および24.2細胞系の両方は0.25 μgのhTERT-1ucリポーターベクターにより一時的にトランスフェクトされた。トランスフェクション(トランスフェクト)の24時間後、それらは8時間3 μg/mlのシスプラチンにより処理された。それらの細胞は60 mmのプレートに植え付けられトランスフェクション(核酸挿入)の24時間後かつcDDPによる処理に続いて、それらの細胞は溶解されそして10 μgの合計タンパク質のルシフェラーゼ活性が定量化された。トランスフェクション対照として、それらの細胞はリポーターベクター、CMV-Renillaと同時にトランスフェクトされた。B) 293T細胞はpLNCXおよび24.2により一時的にトランスフェクトされた後、0.25 μgのhTERT-1ucリポーターベクターによりトランスフェクトされそしてAにおけるように処理された。Aにおけるように細胞を植え付けた後、それらはpLNCXおよび24.2でトランスフェクトされそしてhTERT-1ucリポーターベクターにより同時にトランスフェクトされ、その後それらはAにおけるように処理された。トランスフェクション対照として、CMV-Renillaリポーターベクターが使用された。データは非トランスフェクトの細胞に関するルシフェラーゼの相対的な単位の比に対応する。各ポイントは、±により、3つの独立した実験例から得られた標準偏差を示している。

【0126】

図10は先天性角化異常症を有する患者の細胞と、24.2プラスミドまたはpLNCXがないベクターにより一時的にトランスフェクトされたVA13細胞とにおけるテロメラーゼ活性およびhTERTおよびhTRの発現レベルを示している。A) テロメラーゼ活性は先天性角化異常症(DC-1, DC-2およびDC-3)に罹っている患者の細胞および15百万個の細胞による45 μgのpLNCXのないプラスミド(-)またはpLNCX 24.2ベクター(+)の電気穿孔法に続いてキャリヤマザー(DC-C)においてTRAPアッセイによって測定された。B) 先天性角化異常症を有する患者の1人の細胞からのRNAのRT-PCR、即ちDC3が空の(empty)ベクターによりトランスフェクトされそしてhTERTおよびhTRに特有のオリゴを使用して、DC3が24.2プラスミドでトランスフェクトされた。開始RNA対照として、GAPDHの増幅用のオリゴが使用された。(C) VA13細胞におけるテロメラーゼ活性。それらの細胞は百万個の細胞あたりDKCまたはGSE24.2ペプチドを発現している16 μgの対照pLNCXのないベクターにより一時的にトランスフェクトされた。24時間後、テロメラーゼ活性が、各トランスフェクト(核酸挿入)からのタンパク質抽出の希釈を使用して、上述されたように分析された。(D) 百万個の細胞あたり16 μgの種々の構造によりトランスフェクトされたVA13細胞におけるhTERTおよびhTRの発現レベル

10

20

30

40

50

。RNAレベルが上述されたように検出された。GAPDHが対照として使用された。A, B, C, およびDにおいて、実験は同一結果で3回繰り返された。(E) V A 1 3 細胞におけるhTERTプロモーターの活性。それらの細胞は特定の構造(百万個の細胞あたり10 μ g)およびhTERT-lucリポーター(百万個の細胞あたり1 μ g)により同時にトランスフェクトされた。トランスフェクト(核酸挿入)の24時間後、ルシフェラーゼ活性が上述されたように測定された。CMV-Renilla(百万個の細胞あたり0.1 μ g/ml)がトランスフェクト(核酸挿入)効率用の対照として使用された。データは4つ一組で実施された2つの実験の平均を示している。

【0127】

図11はGSE24.2ペプチドがc-MYCによって調整されたhTERTプロモーターの活性を増加することを示している。(A) 293T細胞が種々の構造(百万個の細胞あたり10 μ g/DNA)およびhTERT-lucリポーター(百万個の細胞あたり1 μ g)により同時にトランスフェクトされた。(B) 特定の細胞系がhTERT-lucリポーターおよびMad/myc発現ベクターにより同時にトランスフェクトされた。(C) 特定の細胞系がHIV-lucリポーターおよびMad/myc発現ベクターにより同時にトランスフェクトされた。トランスフェクト(核酸挿入)の24時間後、細胞は6時間50 ng/mlのTNF- α で刺激されそしてルシフェラーゼ活性が上述されたように分析された。CMV-Renilla(百万個の細胞あたり10 μ g)がトランスフェクト(核酸挿入)の効率用の対照として使用された。データは4つ一組で実施された2つの実験の平均を示している。

【0128】

図12はc-MYCのプロモーター活性がGSE24.2ペプチドによって誘導されることを示している。(A) 実験に使用された種々の構造体を示しているc-MYCプロモーターの概略図を示す。(B) 293T細胞が特定のプラスミド(百万個の細胞あたり10 μ g/DNA)およびp x 3.2 c-MYCリポーター(百万個の細胞あたり1 μ g)により同時にトランスフェクト(核酸挿入)された。(C) 特定の細胞系がp x 3.2 c-MYCリポーター(百万個の細胞あたり1 μ g)によりトランスフェクトされた。(D) 特定の細胞系がp x 3.2 c-MYCリポーター(百万個の細胞あたり1 μ g)の種々の構造によりトランスフェクトされた。トランスフェクト(核酸挿入)の24時間後、ルシフェラーゼ活性が上述されたように分析された。CMV-Renilla(百万個の細胞あたり0.1 μ g/ml)がトランスフェクト(核酸挿入)の効率用の対照として使用された。データは4つ一組で実施された2つの実験の平均を示している。

【0129】

図13はGSE24.2ペプチドによって誘導されたc-MYCのプロモーターの活性がNHEII素子に依存していることを示している。(A) NHEII素子中に発生された突然変異の概略図を示す。(B) 293T細胞が種々の構造(百万個の細胞あたり10 μ g/DNA)およびp x 3.2 c-MYCリポータープラスミド(百万個の細胞あたり1 μ g)により同時にトランスフェクトされた。(C) 図に特定された細胞系がp x 3.2 c-MYCリポーター(百万個の細胞あたり1 μ g)の種々の突然変異によりトランスフェクトされた。トランスフェクトの24時間後、ルシフェラーゼ活性が上述されたように分析された。CMV-Renilla(百万個の細胞あたり0.1 μ g/ml)がトランスフェクト効率用の対照として使用された。データは4つ一組で実施された2つの実験の平均を示している。

【実施例】

【0130】

実施例1 GSE24.2配列の識別および生物学的活性

1.1. 24.2と呼ばれるGSE配列の識別

化学療法に対する抵抗はガンの治療における最大の制限の1つである。シスプラチンに対する抵抗のメカニズムを研究するために、シスプラチンに対する耐性を付与するcDNAライブラリー配列は遺伝子抑制素子を追跡することによって分離された。従前に記載さ

れたこの原理体系（ロニンソン等、1995「*Robinson et al.*, 1995」）は遺伝子発現における存在度（*abundance*）を平均化するために標準化されたヒト胎盤ライブラリーからのcDNA構造の発現からなっている。シスプラチンに対する耐性を付与する100個に近い異なるクローンが分離された。cDNAインサートを増幅した後、それらはpLNCXプラスミドにサブクローン化されそしてそれらが耐性を付与するのを確実にするために再びトランスフェクトされた。これらのGSEの1つはヒトジスケリンの内部配列に対応する24.2（SEQ ID NO1参照）と呼ばれる165 - pb断片であった。

【0131】

1.2. シスプラチンに関する293T細胞系、すなわちpLNCXおよび24.2の生存能力および細胞死亡進路を実現しているJNKおよびp38の活性

同一名のGSEを包含しているpLNCX24.2プラスミドが安定した方法において293T細胞中でトランスフェクトされそして対照として、pLNCXのないベクターがトランスフェクトされた。24.2細胞系がこのインサート（データを図示せず）を含有するPCRによって確認した後、シスプラチンに対する応答が研究され、この薬剤による生存能力曲線を形成した。図2aは72時間後のシスプラチンの種々の投与に反応して2つの細胞系に関する生存能力曲線を示している。そこで、安定した方法においてGSE24.2を発現する細胞がGSE選択投与に近い低い投与において空のベクターを発現する細胞に比してシスプラチンに反応して大きな生存能力を有することを観察することができる。JNKおよびp38は遺伝子毒作用剤（サンチェス・ペレス、1998「*Sanchez-Perez et al.*, 1998」）に反応して活性化されるMAPKsである。シスプラチンに反応してこれら2つのタンパク質の活性動力学は細胞死を誘導するような能力に関連しており、このため、2つの細胞系のこれらのキナーゼの活性が研究され（図2b）そしてシスプラチンの大きな投与量が安定した方法においてGSE24.2を発現する細胞中の両方のキナーゼを活性化するために必要であったことが観察され、かくしてGSE24.2の発現が両方のキナーゼを活性化する細胞損傷信号を減衰することを示唆している。

【0132】

1.3. シスプラチンに反応しての293T細胞系、すなわち、pLNCX, DSK（遺伝子バンクNM001363.2）, DSK-5'および24.2の生存能力

ジスケリンの過発現がGSE24.2により誘導されたシスプラチンに反応して細胞生存能力の増加を再生することができるかどうかを研究するために、安定した方法において、ジスケリン（pLNCX DSK）の完全なcDNAを過発現する細胞系が発現された。その作用が24.2に包含される領域またはジスケリン（pLNCX DSK-5'）の大きい領域を除いているかどうかを研究するために、GSE24.2配列を含む図3a）に記載されたジスケリンの断片を包含する構造もトランスフェクトされた。図4はシスプラチンの種々の投与量に反応する4つの細胞系についてその能力曲線を示す。そこで安定した方法において24.2構造（SEQ ID NO1）を発現する細胞が空のベクター、完全なジスケリン（DSK）またはジスケリン（SEQ ID NO3）の5'断片を発現する細胞に比してシスプラチンに反応して大きな生存能力を有することが観察された。それゆえ、シスプラチンに反応して増加した生存能力がGSE24.2断片に含有されるcDNA配列に制限される。

【0133】

1.4. シスプラチンで処理されたpLNCXおよび24.2細胞系のテロメラーゼ活性

上記で議論されたように、シスプラチンはさらに特定されるメカニズムによってテロメラーゼ活性を抑制する。GSE24.2がジスケリンの内部配列に対応しそしてジスケリンの内部配列がテロメラーゼのリボヌクレオタンパク質複合体の一部であるので、テロメラーゼ活性についてのシスプラチンの作用はGSE24.2を発現する細胞系において研究され、同様にこの作用が空のベクターを発現する細胞系に関して変化したかどうか研

究された。

【0134】

このため、テロメラーゼ活性のアッセイが p L N C X および p L N C X 2 4 . 2 細胞系により T R A P 法を使用して行なわれ、それらを 0 . 5 μ g / m l のシスプラチンにより 3 日間予備処理し、続いてそれらは 3 日および 7 日間 3 μ g / m l のシスプラチンにより処理された。テロメラーゼの特別な阻害物質が酵素の効果的な抑止のためこの時間中に作動する必要があると記載されている (キム等、2003; ベドナレク等、1999; ゴワン等、2002「Kim et al., 2003; Bednarek et al., 1999; Gowan et al., 2002」) ため 3 日間の処理が実施された。293Tp L N C X 細胞の 7 日間の処理はテロメラーゼ活性の抑制を発生し、ところがこの時間中に 24 . 2 細胞系について抑制は観察されなかった (図 4)。結論として、G S E 24 . 2 の発現がシスプラチンにより発生されたテロメラーゼ活性の抑制に対して抵抗を付与しそしてこの抑制が薬剤に応答してこれらの細胞の大きな生き残り能力についての原因である。

10

【0135】

1 . 5 . p L N C X および 24 . 2 細胞におけるテロメラーゼ I の阻害物質の作用
テロメラーゼ I の阻害物質はテロメラーゼ中に G - クアドルプレックス (G - q u a d r u p l e x e s) を形成する化合物であり、それによりテロメラーゼ活性を抑制する (トンプソン等、1997「Thompson et al., 1997」)。テロメラーゼ I の阻害物質に反応して G S E 24 . 2 の作用を研究した。このため、能力曲線が実施され、p L N C X および 24 . 2 細胞系が 72 時間テロメラーゼ I の阻害物質 (0 - 20 μ M) の濃度を増大させることにより処理された。図 6 a) は 24 . 2 細胞が親細胞よりテロメラーゼ I の阻害物質に対して多く抵抗することを示している。この保護がテロメラーゼ活性の感度の変化により伴うかどうかを確認するために、該活性は 3 日間テロメラーゼ I の阻害物質の異なる投与量で処理された p L N C X および p L N C X 24 . 2 細胞において研究された (図 6 b)。p L N C X 細胞系のテロメラーゼ活性の抑制が p L N C X 24 . 2 細胞におけるよりも大きいことを観察された。テロメラーゼ活性はまた 1 投与量 (5 μ M) によりかつ数時間 (0 - 5 日。図 6 c) で p L N C X および p L N C X 24 . 2 細胞を処理することによって研究された。この場合に、p L N C X 24 . 2 細胞はテロメラーゼ活性を減少するために阻害物質に対して多くの露出を必要とすることが確認された。それゆえ、テロメラーゼ活性および両方の細胞系における生き残りの細胞に関して観察された作用はシスプラチンおよびテロメラーゼ I の阻害物質に関して共通であり、かくして G S E 24 . 2 断片がテロメラーゼ I の阻害物質によって発生された抑制を防止することができるので、少なくとも部分的にテロメラーゼ構造の維持において顕著な役割を有することを示唆している。

20

30

【0136】

1 . 6 . p L N C X および 24 . 2 細胞系における h T R , h T E R T およびジスケリンの発現レベルについてのシスプラチンの作用

シスプラチンに対する p L N C X 24 . 2 細胞の低い感度に関する説明の 1 つはテロメラーゼ複合体の成分の幾つかのレベルの変化である。それゆえ、テロメラーゼ複合体に含まれる種々の遺伝子の発現レベルおよびシスプラチンがそれらの発現を有する作用が研究された。このため、p L N C X および p L N C X 24 . 2 細胞が 0 . 5 μ g / m l で予備処理されそして 3 日および 7 日間 3 μ g / m l のシスプラチンで処理された。h T R , h T E R T およびジスケリンに特有なオリゴを使用して、これらの遺伝子の発現レベルおよび前記発現についてのシスプラチンの作用が研究された。シスプラチンがジスケリンおよび h T R の発現について影響を及ぼさない (図 7) ことが確認され、これに反して、3 日間の処理に続いて、p L N C X 細胞中の h T E R T における発現の減少があり、他方で 7 日間の処理まで p L N C X 24 . 2 細胞における発現の減少はない。それゆえ、p L N C X 24 . 2 細胞は h T E R T の発現の抑制を有するためにシスプラチンの多くの露出を必要とする。シスプラチンに対する感度のこの変化は少なくとも部分的にテロメラーゼ活

40

50

性アッセイにおける感度の差異を説明することができる。

【0137】

1.7. hTERTプロモーターの活性についての安定した方法および一時的な方法の両方におけるGSE24.2およびTrubIおよびTrubIIの発現の作用

シスプラチンに反応してGSE24.2ペプチドを発現したそれらの細胞におけるhTERTの発現レベルに変化が観察されたので、GSE24.2配列および-TrubI (SEQ ID NO11)およびTrubII (SEQ ID NO13)ドメインを含んでいる-その断片の配列の発現がhTERTプロモーターの活性についてどのようなを有するかを研究することを決めた。ジスケリンのプロドウリジン合成酵素TRUBドメインが2つの構造的サブドメイン、すなわち、TrubIおよびIIモチーフを含んでいる (ズッチー二等、2003)。これらの2つドメインはジスケリンのグローバルタンパク質を維持するのに重要である。そのうえ、モチーフIIは酵素活性に必須である少なくとも1つの残留物 (asp125)を含んでいる。このため、ヒトhTERTプロモーターの3,402-pb配列 (ソン等、1999)を含んでいるhTERT-lucリポーターベクターが細胞系、すなわち、pLNCX24.2およびpLNCXにおいてトランスフェクトされた。図8a)はpLNCX24.2細胞系において、hTERTプロモーターが空のベクター (pLNCX)を発現する細胞中よりも多いことを示している。同一の実験が293T細胞中にGSE24.2を一時的に発現することによって行われ (図8b)そしてGSE24.2の一時的発現がまた空のベクターによりトランスフェクトされた細胞に比してhTERTプロモーターの活性を増加することが観察された。他方で、この実験はGSE24.2断片 (図8c)の活性と同じ活性を有する最小の配列を識別するために、それぞれ、TrubI (SEQ ID NO11)およびTrubII (SEQ ID NO13)ドメインの各々を含んでいるGSE24.2の2つの断片により実施された。結果はGSE24.2に含まれる配列、Trubドメインを有する配列がhTERTプロモーターの発現を活性化することにより作用することを示している。

【0138】

加えて、イースト、S.セレビシアCBF5 (yeast, S.cerevisiae CBF5)のCBF5遺伝子の配列、GSE24.2の配列に等しい配列 (図3b)がpLNCXベクターにおいてサブクロニングされ、そして前記構造の発現がhTERTの活性を増加するが、hTRプロモーターの活性を増加しない (データは図示せず)ことが観察され、このジスケリンのドメインの活性における高度な機能的保全を示している。

【0139】

1.8. シスプラチンにより処理された細胞中のhTERTプロモーターについてのGSE24.2の発現の作用

GSE24.2の発現がシスプラチンにより誘導されたhTERTの発現の抑制を遅延したことを観察した後、シスプラチンによる処理が前記遺伝子のプロモーターについてのあらゆる効果を有するかどうかおよびGSE24.2の発現が前記遺伝子に影響を及ぼすかどうか研究された。このため、pLNCXおよびpLNCX24.2細胞がhTERT-lucリポーターベクターによりトランスフェクトされた。トランスフェクトの24時間後、それらは8時間3μg/mlのシスプラチンにより処理されそしてテロメラーゼ活性がアッセイされた (図9a)。pLNCX24.2細胞において、プロモーターの活性の誘導はシスプラチンによる処理に続いてpLNCX細胞におけるよりも4倍大きいことが観察され得る。同一の実験がGSE24.2を一時的に発現しかつそれらをpLNCXのないベクターによりトランスフェクト (核酸挿入)された293T細胞に比べることにより行われた。この場合に、GSE24.2を発現する細胞の活性はシスプラチンによる処理に続いて基準活性より大きかった。

【0140】

実施例2 cMYC遺伝子のプロモーターのNH2II断片はGSE24.2ペプチドのターゲットである。

h T E R T プロモーターは2つのE - b o x 領域 (C A C G T G)、m y c / m a x ヘテロダイマーに対する結合場所 (オー等、1999; ウー等、1999)、ならびに5つのs p 1 領域を含んでいる。G S E 2 4 . 2 ペプチドによるh T E R T プロモーターの活性がこのE - b o x を通って行われるかどうかを研究するために、c - m y c D N A に対するこの結合領域 (ドメイン) および激しい転写促進領域を含んでいるハイブリッド分子がトランスフェクトされ、このハイブリッド分子はc - m y c の従属転写を抑制しているこのE - b o x への結合を禁止することができた。対照細胞およびジスケリンタンパク質 (D K C) およびG S E 2 4 . 2 ペプチドを発現する細胞は前記ハイブリッド分子の増加量によりトランスフェクトされた。m a d / m y c 溶融タンパク質の発現は対照グループおよびD K C 細胞の両方において、投与量依存の方法で、h T E R T プロモーターの基準活性を抑制した。そのうえ、m a d / m y c 溶融タンパク質の発現はG S E 2 4 . 2 細胞中のG S E 2 4 . 2 ペプチド - 介在転写をブロックすることができ、かくしてG S E 2 4 . 2 によって誘導されたh T E R T 転写の活性がc - m y c に依存していることを示唆している (図11b)。N F k B - 依存プロモーター (H I V L u c) と結合するm y c / m a d 構造のトランスフェクトが細胞系のいずれにおいてもT N F による刺激に続いて転写に影響を及ぼさない (図11c) ので、この抑制は特別であった。

【0141】

c - m y c 遺伝子の転写は2つの異なるプロモーターによって制御されそしてP 0 とP 1 プロモーター (N H E I I I) との間に置かれたD N A s e に対して過敏性の領域 (ドメイン) によって抑制されると思われる。かくして、ルシフェラーゼ遺伝子に結合されたc - m y c の転写開始点の3 . 2 k b を含んだ (図12a)、4つの異なる構造が使用された。このプラスミド (p x 3 . 2 m y c) が対照細胞およびG S E 2 4 . 2 細胞にトランスフェクトされ、そして活性の3倍の増加が最後のグループの細胞に観察された (図12b)。細胞がp L N C X ベクターによりまたはp x 3 . 2 m y c リポーター (図12c) と結合してG S E 2 4 . 2 ペプチドを発現するプラスミドにより293T細胞中にトランスフェクトされるとき、同様の結果が得られた。

【0142】

両方の結果はジスケリン (G S E 2 4 . 2) のこの内部断片がc - m y c 遺伝子の転写を活性化することができることを示した。この転写因子、c - m y c は、それゆえ、h T E R T の転写を活性化する。かくして、c - m y c プロモーターにおいて欠失された3つの突然変異がその誘導活性を行うためにG S E 2 4 . 2 ペプチドに必要な領域を特定するのに使用された。使用されるすべての突然変異に関して、N H E I I I ドメインを含むプロモーターP 1 およびP 0 の末端領域 (r e g i o n) に含まれる突然変異のみがG S E 2 4 . 2 細胞における転写を維持することができるが、対照細胞 (図12d) においては維持できず、かくしてプロモーターP 2 の基部の領域 (r e g i o n) がG S E 2 4 . 2 ペプチドの活性に必要なことを示している。

【0143】

N H E I I I 領域 (r e g i o n) がc - m y c の転写の阻害物質として記載されたので、N H E I I I 領域の幾つかの突然変異がプリンの豊富な領域 (r e g i o n) のグアニン変性によって構成された。N H E I I I 領域 (r e g i o n) に存在する27グアニン (G u a n i n e s) はプリンの豊富な領域 (P u 2 7) のG - クアドルプレックスの2次的構造を維持するのに伴われる。以下が、すなわち、第2クアルテットの第2グアニンに配置されたG 1 2 A ; グアニンの第2トリプレットに配置されたG 1 7 A ; および最後にプリンの豊富な領域の端部での連続するグアニン (G 2 6 A / G 2 7 A) が突然変異させられた (図13a)。これらのプロモーター構造は空のベクター、またはD K C タンパク質またはG S E 2 4 . 2 ペプチドを含んでいるベクターを発現する細胞にトランスフェクトされた。結果はW T p x 3 . 2 m y c プロモーターのみがG S E 2 4 . 2 にトランスフェクトされるとき活性化することが可能であることを示している。P u 2 7 領域における3つの突然変異は非常に低いレベルではあるがG S E 2 4 . 2 によって活性化された (図13b)。

【0144】

興味深いことには、対照細胞またはDKCを発現する細胞中のGの二重突然変異のトランスフェクト（核酸挿入）はプロモーター中の増加した活性を示すことができ、この領域がプロモーターを抑制する構造を維持するのに重要であることを示している。同様な結果は種々の突然変異体が空のベクター、DKCタンパク質またはGSE24.2ペプチドによりトランスフェクトされるとき（図13c）293T細胞における一時的なトランスフェクトアッセイにおいて得られた。全体的に、これらの結果はGSE24.2ペプチドが活性の構造に対してPu27領域の2次的構造を変性することができ、かくしてc-myc遺伝子の転写を可能にすることを示唆している。

【0145】

実施例3. X-染色体連鎖型先天性角化異常症を有する患者の細胞およびVA13細胞におけるGSE24.2の発現

X-染色体連鎖型先天性角化異常症において低レベルのテロメラーゼRNAはテロメラーゼ活性に欠乏があるので、このGSE24.2の発現の作用が先天性角化異常症に罹っている患者の細胞において試験された。このため、先天性角化異常症に罹っている患者の細胞（DC-1, DC-2, DC-3）および市場で入手可能なキャリヤーマザー細胞（DC-C）がGSE24.2ベクターまたは空のベクターによりトランスフェクトされた。これらの細胞は致命的であってかつ培養において通常老化する。トランスフェクト後24時間にテロメラーゼ活性が測定されそしてGSE24.2断片が発現されたときキャリヤーマザー細胞および先天性角化異常症に罹っている患者の細胞の両方においてテロメラーゼ活性の増加が観察された（図10a）。奇妙にも、テロメラーゼ活性の増加は完全なジスケリンの発現では観察されなかった（データは図示せず）。他方において、hTRのレベルはジスケリン遺伝子の突然変異された形状を発現するDC細胞において低い（モチヅキ等、2004「Mochizuki et al., 2004」）。この活性の増加がテロメラーゼ複合体、hTERTおよびhTRの成分のいずれかの発現の増加の結果だったかどうか調査された。このため、RT-PCRアッセイがトランスフェクト後24時間にhTERTおよびhTRに特有のオリゴを使用して実施され（図10b）、そして両方の場合において発現レベルの増加がGSE24.2の発現につづいて観察された。

【0146】

そのうえ、VA13テロメラーゼ-欠乏の細胞系（セザールおよびグリフィス、2004「cesara and Griffith, 2004」）における本発明のGSE24.2ペプチドの発現はテロメラーゼ活性（図10c）、およびhTERTおよびhTR RNAs（図10d）の発現を回復することが可能になった。この細胞系において、GSE24.2ペプチド（より低い効率により）およびイースト（yeast）のCBF5遺伝子の断片のモチーフ1の発現はhTERTプロモーター（図10e）を付加的に活性化した。全体的に、その結果はGSE24.2ペプチドの発現が両方の細胞系においてテロメラーゼ活性を回復することができたことを示している。

【0147】

物質および方法

構造および細胞系。X-染色体連鎖型先天性角化異常症に罹っている患者の細胞系はコリエル細胞貯蔵所（Corriel Cell Repository）から得られかつRPMI20%FBSに保持された。VA13細胞系はドクター・エム・セラノ（Dr. M. Serrano）から得られた。DKCファミリーは臨床的に記載され（シリナビン等、1975；トロブリッジ等、1977「Sirinavin et al., 1975；Trowbridge et al., 1997」）そして影響を及ぼされた個体はT66Aアミノ酸（データは図示せず）（DC-1, DC-2, DC-3）の置換を有する。キャリヤーマザー細胞系（DC-C）は突然変異なし（データは図示せず）にメッセンジャーRNAを発現する。これらの細胞は20%の胎児の牛の漿液（Gibco）および2mMのグルタミンで補充されたRPMI（Gibco）中で成長させた。

【0148】

DSK構造はヒトジスケリンの完全なcDNAを含みそしてDSK5'構造(SEQ ID NO5)はヒトジスケリンの最初の500ヌクレオチドを含んでいる。GSE24.2(SEQ ID NO1)のような両方の構造はpLNCXプラスミドのClaI位置においてクローン化された(BD Bioscience Clontech)。

【0149】

DC(先天性角化異常症)に罹っている患者から得られた細胞およびそれらの対照は百万個の細胞あたり3μgのpLNCXまたはpLNCX24.2構造によって一時的にトランスフェクトされた。

【0150】

293T細胞系はアメリカ型培養コレクション(American Type Culture Collection)から得られそしてその細胞は10%の胎児の牛の漿液(Gibco)および2mMのグルタミンで補充されたDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(Gibco)中で成長させた。この細胞系は塩化カルシウム方法、即ち百万個の細胞あたり10μgのプラスミドを使用する安定した方法においてトランスフェクトされた。これらの細胞はpBABEpur、即ち百万個の細胞あたり1μgのベクターにより同時にトランスフェクトされた。トランスフェクト後24時間でその細胞は安定したクローンを選択するためにピューロマイシン(puromycin)により処理された。その細胞がゲノムDNAのPCRによって安定した方法においてGSE24.2断片を発現したことが確認された(データは図示せず)。

【0151】

hTERT-luc構造がpGL3基本プラスミド(promega)においてクローン化されそしてタエ・クック・キム(キム等、1999「Tae Kook Kim(Kim et al., 1999)」)によって提供された。

【0152】

薬剤。シスプラチンおよびテロメラーゼIの阻害物質の両方がカルビオケム(Calbiochem)から得られそして各図に特定された投与量で使用された。

【0153】

TRAP方法に基づいたテロメラーゼ活性アッセイ(ライト等、1995「Wright et al., 1995」)。テロメラーゼ活性は指示マニュアルに従ってTRAPezeテロメラーゼ検出キット(Intergen)を使用して測定された。各抽出のタンパク質濃度はBIO RAD試薬を使用してブラッドフォード方法(Bradford method)によって定量化され、そして指示マニュアルに従ってPCRを実施した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動が非変性条件下で反応生成物により実施され、続いてそれは30分間臭化エチジウムにより色付けされた。

【0154】

合計タンパク質抽出。その細胞は媒体から残留物を除去するためにPBSにより洗浄された後に溶解させた。溶解バッファは標準のプロトコルに従って調製されそしてタンパク質阻害物質、すなわち、ABSF、オルソバナデート(orthovanadate)、ロイペプチン(Leupeptin)、ペプスタチンA(pepstatin A)、アプロチニン(aprotinin)およびDTT(Sigma)が添加された。続いて抽出物は4°Cで10分間14,000rpmで遠心分離されそして浮遊物が回収された。合計タンパク質含有量がBIO RAD試薬を使用してブラッドフォード方法(Bradford method)によって測定された。

【0155】

ウエスタンブロット法および抗体。20μgのタンパク質がSDS-ポリアクリルアミドゲル中で分離され、その後それらは多湿転移によってイモビロン-P膜(Millipore)にトランスフェクトされた。膜は5%BSA溶液中またはTBS(20mM Tris-HCL, pH7.5, 150mM NaCl)0.1%Tween-20(シグマ)における5%スキムミルク中でブロックされた。膜は対応する抗体により培養された。使

10

20

30

40

50

用した2次抗体はペロキシダーゼと直接結合されたアンチ - マウスノラビット (B i o r a d) であった。検出は指示マニュアルに特定された通り E C L 方法 (P h a r m a c i a) によって実施された。

【 0 1 5 6 】

アッセイに使用された抗体はアンチ - p J N K (V 7 3 9 1 , P r o m e g a) 、アンチ - p J N K (C - 1 7 , S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g i e s) 、アンチ p 3 8 (C 2 0 , S a n t a C r u z T e c h n o l o g i e s) であった。

【 0 1 5 7 】

R T - P C R による遺伝子の発現。細胞からの合計 R N A 抽出は製造業者の指示に従ってトリゾル試薬 (L i f e T e c h n o l o g i e s) を使用して実施された。各反応において、2 μ g の合計 R N A が M - M I v 逆トランスクリプターゼ (P r o m e g a) を使用して c D N A に転写された。

【 0 1 5 8 】

以下のオリゴが使用された。

オリゴ A : h T E R T に関して 5 ' - C G G A A G A G T G T C T G G A G C A A - 3 ' (S E Q I D N O 5)

オリゴ B : h T E R T に関して 5 ' - G G A T G A A G A G G A G T C G G A - 3 ' (S E Q I D N O 6) ;

オリゴ C : h T R に関して 5 ' - T C T A A C C C T A A C T G A G A A G G G C G T A G - 3 ' (S E Q I D N O 7)

オリゴ D : h T R に関して 5 ' - G T T T G C T C T A G A A T G A A C G G T G G A A G - 3 ' (S E Q I D N O 8)

オリゴ E : ジスケリンに関して 5 ' - A T G G C G G A T G C G G A A G T A A T T - 3 ' (S E Q I D N O 9)

オリゴ F : シスケリンに関して 5 ' - C C C C T T C A A T A G C A T T G T G C - 3 ' (S E Q I D N O 1 0)

【 0 1 5 9 】

h T E R T の増幅に関する P C R 条件は以下の通り、すなわち、31 サイクルに関して 9 4 ° C , 4 5 s ; 6 0 ° C , 4 5 s ; 7 2 ° C , 9 0 s であった。h R T に関する P C R 条件は 2 8 サイクルに関して 9 4 ° C , 4 5 秒 ; 5 5 ° C , 4 5 秒 ; 7 2 ° C , 9 0 秒 であった。ジスケリンに関する条件は 2 8 サイクルに関して 9 4 ° C , 4 0 秒 ; 6 0 ° C , 6 0 秒 ; 7 2 ° C , 1 2 0 秒であった (チャン等、2 0 0 2 「 Z h a n g e t a l . , 2 0 0 2 」) 。

【 0 1 6 0 】

ルシフェラーゼアッセイ (L u c i f e r a s e a s s a y) 。 h T E R T の転写調整は h T E R T プロモーターの 3 , 4 0 2 - p b 配列によって先行されるルシフェラーゼリポーター遺伝子によって測定された。トランスフェクトの 2 4 時間後、細胞は市販用のリポーター溶解バッファ (P r o m e g a) により溶解された。細胞溶菌液は遠心分離されそしてルシフェラーゼの発現がバートホールド・ルミノメーター (B e r t h o l d I u m i n o m e t e r) を使用して浮遊物からの 1 0 μ g のタンパク質で定量化された。レニラ (r e n i l l a) 遺伝子に続く C M V プロモーターの構造がトランスフェクト対照として使用された。ルシフェラーゼ活性はタンパク質のマイクログラムごとに発現されそして同一抽出物中のレニラの発光を使用して標準化された。

【 0 1 6 1 】

成長曲線。細胞の生存能力がクリスタル・バイオレット技術によって研究された。細胞は 2 4 穴のプレート中に植え付けられそして各図に特定された対応する薬剤の異なる濃度により処理された。培養の 7 2 時間後、細胞は 1 5 分間 1 % グルタルデヒドにより定着されそして P B S により洗浄された後に、それらは 1 % のクリスタル・バイオレット着色剤により色付けされた。細胞と関連する着色剤は 1 0 % 酢酸溶液により除去された。細胞の数は 5 9 5 n m で吸光度を評価することによって測定された。図は処理を受けない細胞に

10

20

30

40

50

関連して%生存能力を示しかつ対応する偏差により4つ一組で実施された2の実験の平均を示している。

【0162】

直系突然変異生成。c-myc遺伝子プロモーター、p x 3.2のNH₂II領域におけるグアニンの特殊な突然変異が、製造者の指示に従って早変わりX-L直系突然変異生成キット(Quickchange X-L directed mutagenesis kit)(Stratagene)を使用して行われた。

【図面の簡単な説明】

【0163】

【図1】テロメラーゼ複合体の概略構成を示す図である。

10

【図2A】293T細胞系のJNKおよびp38死亡進路の細胞の生存能力を示す図である。

【図2B】293T細胞系のJNKおよびp38死亡進路の細胞の活性を示す図である。

【図3A】使用された構造に含まれるDSK配列およびDSKと同族の遺伝子の配列を示す図である。

【図3B】他の有機体からのプソイドウリジン合成酵素配列に対するGSE24.2アミノ酸の比較配列を示す図である。

【図4】293T細胞系、すなわち、シスプラチンで処理されたpLNCX, 24.2, DSK5'およびDSKの生存能力を示す図である。

【図5】293T細胞系、すなわち、シスプラチンによる処理に続くpLNCXおよび24.2のテロメラーゼ活性を示す図である。

20

【図6A】293T細胞系、すなわち、テロメラーゼIの阻害物質により処理されたpLNCXおよび24.2の生存能力を示す図である。

【図6B】テロメラーゼIの阻害物質の種々の投与量でのテロメラーゼ活性を示す図である。

【図6C】テロメラーゼIの阻害物質による種々の処理時間でのテロメラーゼ活性を示す図である。

【図7】293T細胞、すなわち、シスプラチンによる処理に続くpLNCXおよび24.2中のテロメラーゼに関連する種々の遺伝子の発現レベルを示す図である。

【図8A】pLNCXおよび24.2細胞がhTERT-lucリポーターベクターにより一時的にトランスフェクトされた293T細胞におけるhTERTプロモーターの活性を示す図である。

30

【図8B】293T細胞がpLNCXベクターおよび24.2プラスミドによりトランスフェクトされた293T細胞におけるhTERTプロモーターの活性を示す図である。

【図8C】293T細胞がGSE24.2、DSK、TRUBI、TRUBII構造およびpLNCXのないプラスミドによりトランスフェクトされた293T細胞とにおけるhTERTプロモーターの活性を示す図である。

【図9A】pLNCX細胞および24.2細胞がhTERT-lucリポーターベクターにより一時的にトランスフェクトされたシスプラチンによる処理に続くhTERTプロモーターの活性を示す図である。

40

【図9B】pLNCX細胞および24.2細胞がCMC-Renillaリポーターベクターにより一時的にトランスフェクトされたシスプラチンによる処理に続くhTERTプロモーターの活性を示す図である。

【図10A】先天性角化異常症に罹っている患者の細胞を示す図である。

【図10B】24.2プラスミドまたはpLNCXがないベクターにより一時的にトランスフェクトされた先天性角化異常症に罹っている患者の1人、DC3の細胞を示す図である。

【図10C】VA13細胞とにおけるテロメラーゼ活性を示す図である。

【図10D】種々の構造によりトランスフェクトされたVA13細胞におけるhTERTおよびhTRの発現レベルを示す図である。

50

【図10E】VA13細胞におけるhTERTプロモーターの活性を示す図である。

【図11A】hTERT-1ucリポーターおよびMad/myc発現ベクターにより同時にトランスフェクトされたGSE24.2ペプチドがc-MYCによって調整されたhTERTプロモーターの活性を増加することを示す図である。

【図11B】HIV-1ucリポーターおよびMad/myc発現ベクターにより同時にトランスフェクトされたGSE24.2ペプチドがc-MYCによって調整されたhTERTプロモーターの活性を増加することを示す図である。

【図12A】c-MYCのプロモーターの概略図である。

【図12B】プラスミドおよびp×3.2c-GSE24.2ペプチドによって誘導されるc-MYCのプロモーターの活性を示す図である。

【図12C】p×3.2c-MYCリポーターによりトランスフェクトされたGSE24.2ペプチドによって誘導されたc-MYCのプロモーターの活性を示す図である。

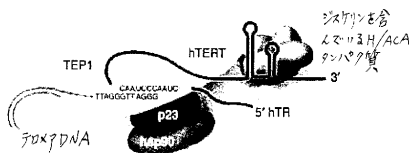
【図12D】p×3.2c-MYCリポーターの種々の構造によりトランスフェクトされたGSE24.2ペプチドによって誘導されたc-MYCのプロモーターの活性を示す図である。

【図13A】NHEIIに発生された突然変異の概略図である。

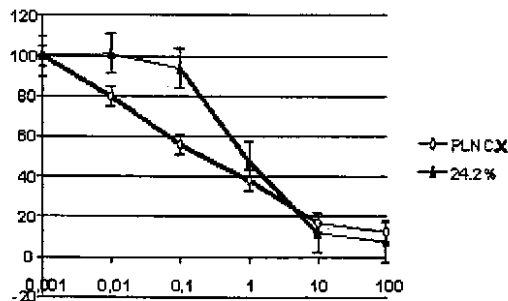
【図13B】p×3.2c-MYCリポータープラスミドによりトランスフェクトされたGSE24.2ペプチドによって誘導されたc-MYCのプロモーターの活性がNHEIIに依存していることを示す図である。

【図13C】p×3.2cリポーターの種々の突然変異によりトランスフェクトされたGSE24.2ペプチドによって誘導されたc-MYCのプロモーターの活性がNHEIIに依存していることを示す図である。

【図1】

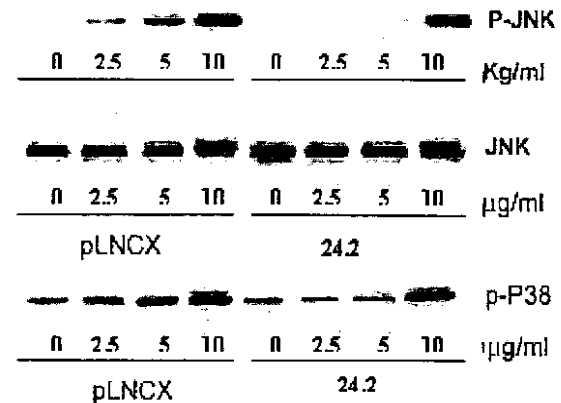


【図2A】

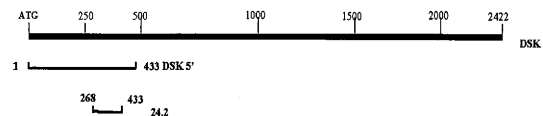


スプラグの投与量

【図2B】



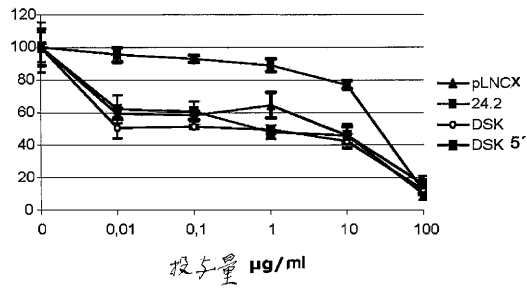
【図3A】



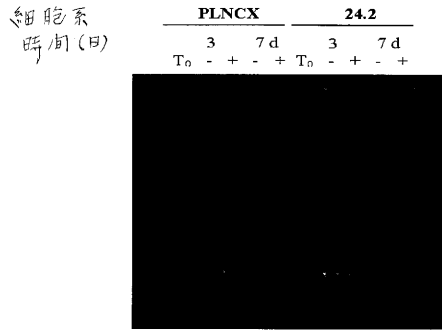
【図3B】

	TruB	TruB
ヒト	90	143
マウス	90	144
ドナベズ	91	145
キリンシロシバエ	88	141
タニオ	85	139
サッカロミセス	59	113

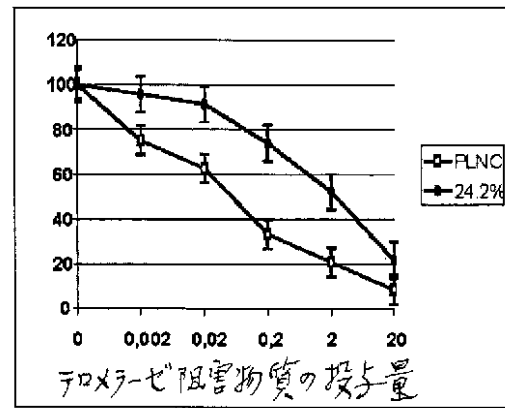
【図 4】



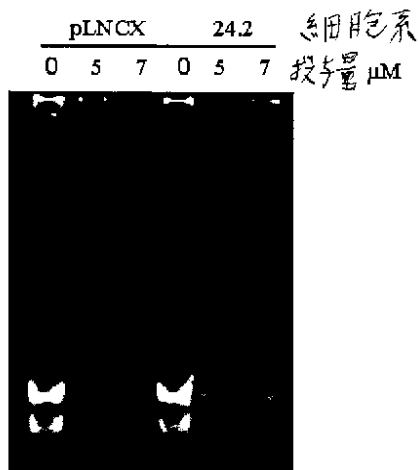
【図 5】



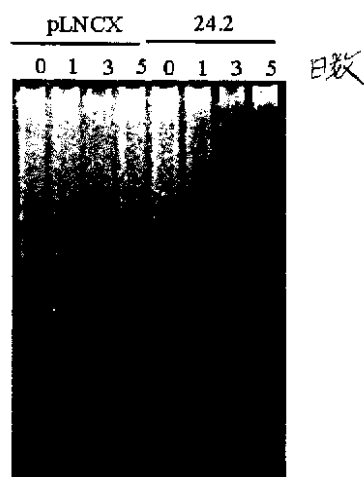
【図 6 A】



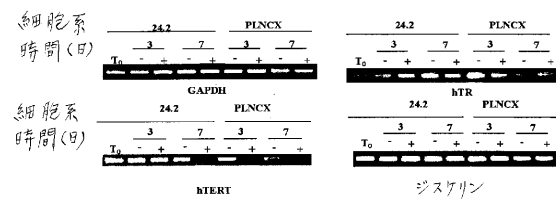
【図 6 B】



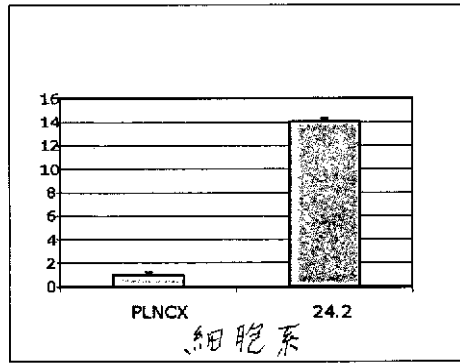
【図 6 C】



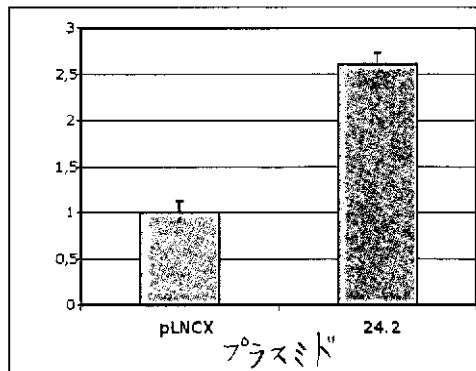
【図 7】



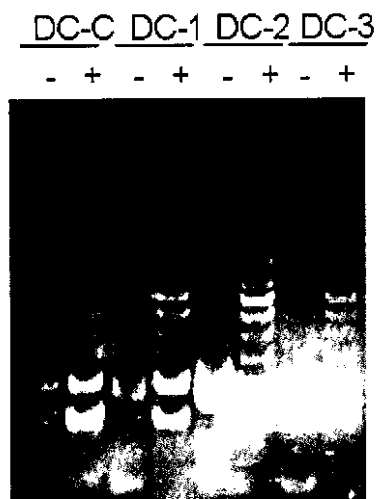
【図 8 A】



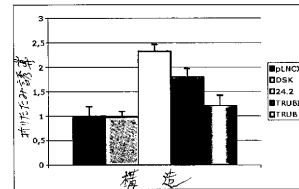
【図 8 B】



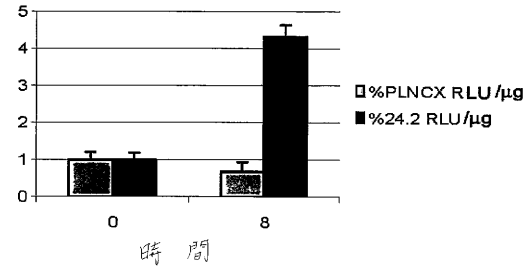
【図 10 A】



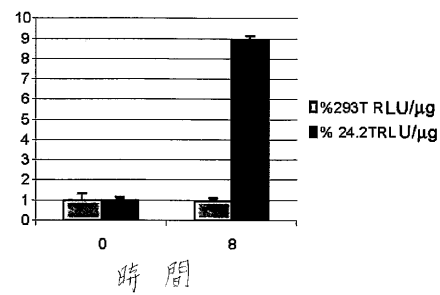
【図 8 C】



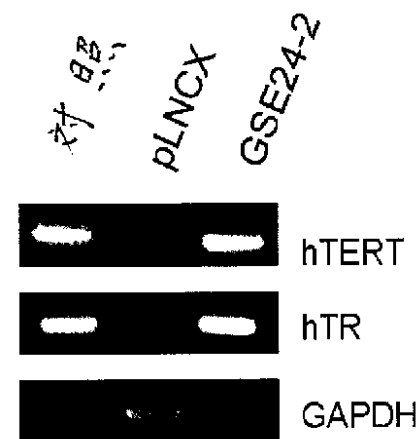
【図 9 A】



【図 9 B】



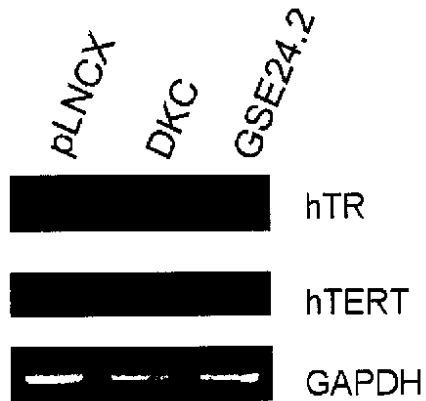
【図 10 B】



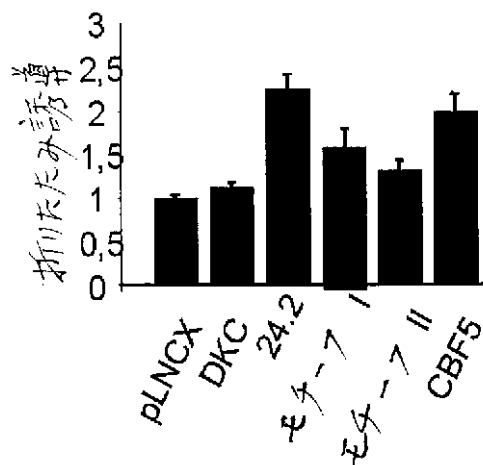
【図10C】



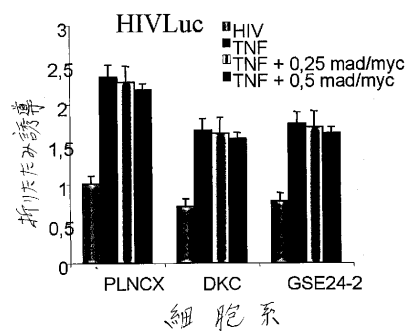
【図10D】



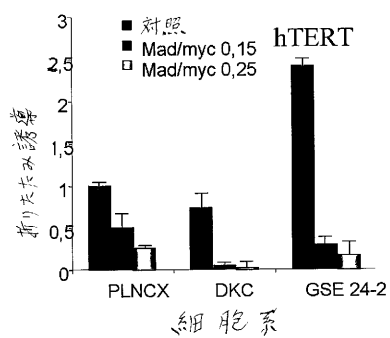
【図10E】



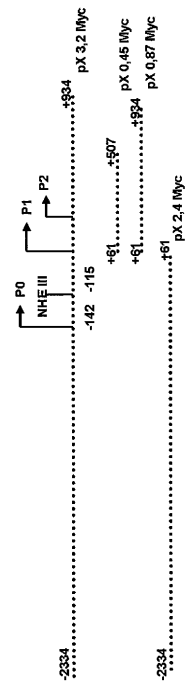
【図11B】



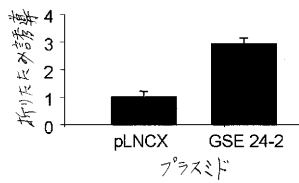
【図11A】



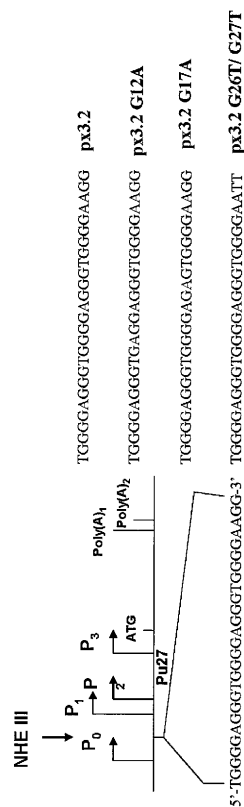
【図 1 2 A】



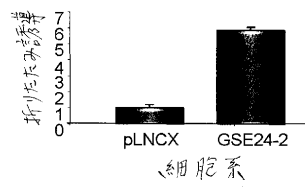
【図 1 2 B】



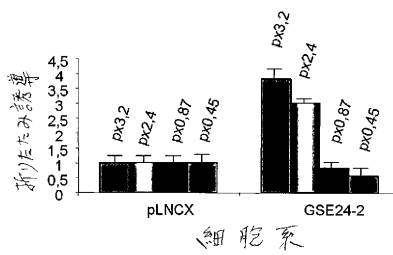
【図 1 3 A】



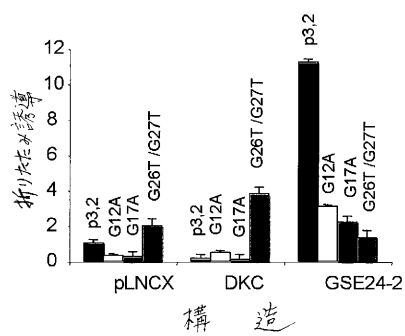
【図 1 2 C】



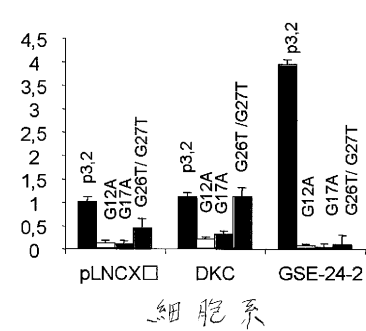
【図 1 2 D】



【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



【配列表】

0005560398000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16

(73)特許権者 506047835

ユニバーシダド ポリテクニカ デ バレンシア

スペイン国, イー - 4 6 0 2 2 バレンシア, カミノ デ ベラ エス/エヌ, シーテーター - エ
ディフィシオ 1 1 イエ 1 2

(74)代理人 100121496

弁理士 中島 重雄

(74)代理人 100074192

弁理士 江藤 剛

(72)発明者 ペロナ アベロン ロサリオ

スペイン国, イー - 2 8 0 2 9 マドリッド, シノアルトロ デペリエル 4, コンセジョ サペ
リオ デ インベスチガシオネス シエンチフィカス インスト デ インベスチガシオネス ビ
オメディカス

(72)発明者 マチャド ビニーラ ロサリオ

スペイン国, イー - 2 8 0 2 9 マドリッド, シノアルトロ デペリエル 4, コンセジョ サペ
リオ デ インベスチガシオネス シエンチフィカス インスト デ インベスチガシオネス ビ
オメディカス

(72)発明者 サストレ ガルゾン レアンドロ

スペイン国, イー - 2 8 0 2 9 マドリッド, シノアルトロ デペリエル 4, コンセジョ サペ
リオ デ インベスチガシオネス シエンチフィカス インスト デ インベスチガシオネス ビ
オメディカス

(72)発明者 サンチェス ペレス イサベル

スペイン国, イー - 2 8 0 4 7 マドリッド, (カントブランコ), パベロン シー - 2 プラン
タ, ケイエム 1 5, クトラ コルメナル ビエジョ, ユニバーシダド オウトノマ デ マドリ
ッド, ファンダシオン ゼネラル

(72)発明者 マルグイア イバネックス ホセ ラモン

スペイン国, イー - 4 6 0 2 2 バレンシア, カミノ デ ベラ エス/エヌ, シーテーター - エ
ディフィシオ 1 1 イエ 1 2, ユニバーシダド ポリテクニカ デ バレンシア

審査官 松岡 徹

(56)参考文献 Nature, 1999, 402(6761), p. 551-5

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

P u b M e d