

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-505276

(P2005-505276A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/513</b>	A 6 1 K 31/513	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 38/45</b>	A 6 1 K 48/00	4 B O 5 0
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 35/00</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-532626 (P2003-532626)	(71) 出願人	390023526
(86) (22) 出願日	平成14年9月25日 (2002. 9. 25)		メルク エンド カムパニー インコーポ レーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月25日 (2004. 3. 25)		MERCK & COMPANY INC OPERATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/030435		アメリカ合衆国、ニュージャージー、ロー ウエイ、イースト リンカーン アヴェニ ュー 1 2 6
(87) 国際公開番号	W02003/029407	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成15年4月10日 (2003. 4. 10)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/325, 128	(74) 代理人	100113332
(32) 優先日	平成13年9月26日 (2001. 9. 26)		弁理士 一入 章夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), CA, JP, U S		弁理士 小野 誠
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌ウラシル輸送体蛋白質及び細菌ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素をコードする単離核酸分子、前記核酸分子で形質転換した細胞とその使用

(57) 【要約】

本発明は各々ネズミチフス菌に由来するウラシル輸送体蛋白質とウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼの一方をコードする新規ポリヌクレオチドに関する。本発明のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質はヒト癌細胞を5 - フルオロウラシル等の抗癌剤治療に対して感作するのに有用である。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細菌源に由来するウラシル輸送体蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子であって、ヌクレオチド配列が、

(a) 配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列を含むウラシル輸送体蛋白質をコードするヌクレオチド配列、

(b) ウラシル輸送体蛋白質をコードし、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列の相補体と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし、DNA である場合にはその単離源である細菌株に内在する mRNA と完全に相補的であり、RNA である場合にはこれに一致するヌクレオチド配列、

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をもつ蛋白質をコードするヌクレオチド配列、

(d) (a)、(b) 又は (c) のウラシル輸送体蛋白質をコードする配列に対するヌクレオチド縮重配列から構成される群から選択される前記単離核酸分子。

10

**【請求項 2】**

細菌源に由来するウラシル輸送体蛋白質のスプライス変異体をコードするコーディング領域を含む単離核酸分子であって、ウラシル輸送体蛋白質が配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列によりコードされる前記単離核酸分子。

**【請求項 3】**

単離核酸分子がゲノム DNA である請求項 1 に記載の単離核酸分子。

**【請求項 4】**

前記単離核酸分子が mRNA である請求項 1 に記載の単離核酸分子。

20

**【請求項 5】**

前記単離核酸分子が cDNA である請求項 1 に記載の単離核酸分子。

**【請求項 6】**

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列をもつウラシル輸送体蛋白質をコードする単離核酸分子。

**【請求項 7】**

細菌源に由来するウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子であって、ヌクレオチド配列が、

(a) 配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列を含むウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質をコードするヌクレオチド配列又はそのコーディング部分、

(b) ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質をコードし、配列番号 1 に記載のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするコーディング領域により規定されるヌクレオチド配列の相補体と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし、DNA である場合にはその単離源である細菌株に内在する mRNA と完全に相補的であり、RNA である場合にはこれに一致するヌクレオチド配列、

(c) 配列番号 2 に記載の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、

(d) (a)、(b) 又は (c) のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質をコードする配列に対するヌクレオチド縮重配列から構成される群から選択される前記単離核酸分子。

30

40

**【請求項 8】**

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含むウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質をコードする単離核酸分子のスプライス変異体であるヌクレオチド配列によりコードされる実質的に純粋なポリペプチド。

**【請求項 9】**

配列番号 2 又は 3 の一方に記載のアミノ酸配列を含む実質的に純粋なポリペプチド。

**【請求項 10】**

前記ポリペプチドが配列番号 2 に記載のアミノ酸配列から構成される請求項 9 に記載のポリペプチド。

50

## 【請求項 1 1】

前記ポリペプチドが配列番号 3 に記載のアミノ酸配列から構成される請求項 9 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 1 2】

宿主細胞における核酸分子の発現を調節する調節ヌクレオチド配列に機能的に連結した請求項 1 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

## 【請求項 1 3】

宿主細胞における核酸分子の発現を調節する調節ヌクレオチド配列に機能的に連結した請求項 7 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 に記載の核酸分子で形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞。

10

## 【請求項 1 5】

請求項 7 に記載の核酸分子で形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞。

## 【請求項 1 6】

細菌由来ウラシル輸送体蛋白質をコードする DNA 配列の同定方法であって、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列を含む標識プローブで cDNA ライブラリー又はゲノムライブラリーを探索する段階と、プローブに対して有意相同度をもつ配列をライブラリーから回収する段階を含む前記方法。

## 【請求項 1 7】

細菌由来ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質をコードする DNA 配列の同定方法であって、配列番号 2 の蛋白質をコードするコーディング領域により規定されるヌクレオチド配列を含む標識プローブで cDNA ライブラリー又はゲノムライブラリーを探索する段階と、プローブに対して有意相同度をもつ配列をライブラリーから回収する段階を含む前記方法。

20

## 【請求項 1 8】

ウラシル輸送体蛋白質の同定方法であって、

- (a) 請求項 1 に記載の核酸分子を真核細胞に導入する段階と、
- (b) 導入した核酸分子によりコードされるポリペプチドにより媒介されるヌクレオチド輸送体活性を段階 (a) の細胞で検出する段階を含む前記方法。

## 【請求項 1 9】

生体試料中のウラシル輸送体蛋白質メッセンジャー RNA の検出方法であって、

- (a) 配列番号 1 に記載の核酸配列と前記メッセンジャー RNA の複合体を形成させる条件下で前記核酸配列の全部又は一部を生体試料と接触させる段階と、
- (b) 前記複合体を検出する段階と、
- (c) 前記メッセンジャー RNA のレベルを測定する段階を含む前記方法。

30

## 【請求項 2 0】

生体試料中のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質メッセンジャー RNA の検出方法であって、

- (a) 配列番号 1 に記載の核酸配列と前記メッセンジャー RNA の複合体を形成させる条件下で前記核酸配列の全部又は一部を生体試料と接触させる段階と、
- (b) 前記複合体を検出する段階と、
- (c) 前記メッセンジャー RNA のレベルを測定する段階を含む前記方法。

40

## 【請求項 2 1】

段階 1 の核酸配列が配列番号 1 のヌクレオチド 2 1 5 ~ 8 4 1 の領域をコードするウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質により規定される請求項 2 0 に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

生体試料中のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質の検出方法であって、(i) プローブ/遺伝子産物複合体の形成を助長する条件下で請求項 7 に記載の単離核酸分子の遺伝子産物に特異的な検出可能なプローブと前記蛋白質を含む疑いのある試料を接触させる段階と、(ii) 前記複合体を検出する段階を含む前記方法。

50

## 【請求項 23】

プローブが抗体である請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記抗体が放射性ラベル又は酵素で標識されている請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列に相補的なアンチセンス配列をコードし、細胞における前記ヌクレオチド配列の遺伝子産物の翻訳を阻害するオリゴヌクレオチドであって、遺伝子産物が配列番号 3 に記載のウラシル輸送体蛋白質又は配列番号 2 に記載のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼの一方である前記オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 26】

抗癌剤の治療効力の改善方法であって、前記抗癌剤治療に対して前記細胞を感作するために十分な治療的に有効な量の請求項 7 に記載の核酸分子を前記抗癌剤治療に反応性の細胞にトランスフェクトする段階を含む前記方法。

## 【請求項 27】

前記抗癌剤が 5 - フルオロウラシルである請求項 26 に記載の方法。

## 【請求項 28】

5 - フルオロウラシル治療に反応性の病態を緩和するように設計された治療計画の進行の追跡方法であって、

(a) 請求項 7 に記載の核酸分子の遺伝子産物である 5 - フルオロウラシル変換酵素による治療後に対象からの細胞試料をアッセイし、前記遺伝子産物による前記 5 - フルオロウラシルの活性化に起因する 5 - フルオロウリジン 5' - リン酸のレベルを第 1 の時点で定量する段階と、

(b) 5 - フルオロウリジン 5' - リン酸のレベルを第 2 の時点で定量する段階と、

(c) 治療計画の効果の判定として (a) で測定したレベルと第 2 の時点の前記レベルを比較する段階を含む前記方法。

## 【請求項 29】

請求項 1 に記載の核酸分子又はその相補鎖を含むプローブ。

## 【請求項 30】

検出可能なマーカーで標識した請求項 29 に記載のプローブ。

## 【請求項 31】

請求項 1 に記載の核酸分子の遺伝子産物と結合することが可能な化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 組換え核酸から配列番号 2 に記載のアミノ酸を含むポリペプチドを発現させる段階と、

(b) 1 種以上の試験化合物を含む試験調製物を前記ポリペプチドに加える段階と、

(c) 前記試験調製物が前記ポリペプチドに結合する能力を測定する段階を含む前記方法。

## 【請求項 32】

前記段階 (b) 及び (c) を *in vitro* で実施する請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 33】

全細胞を使用して前記段階 (a)、(b) 及び (c) を実施する請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 34】

請求項 1 又は 7 に記載の核酸分子の遺伝子産物に対して免疫反応性の抗体。

## 【請求項 35】

ポリクローナルである請求項 34 に記載の抗体。

## 【請求項 36】

モノクローナルである請求項 34 に記載の抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【0001】

本発明は新規に同定されたポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、前記ポリヌクレオチド及びポリペプチドの使用、並びに前記ポリヌクレオチド及びポリペプチドの生産に関する。より特定的には、本発明のポリペプチドは細菌由来であり、即ちネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) から単離される。特に、本発明はウラシル輸送体蛋白質及びウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするDNA及びRNA等の単離核酸分子とその使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

殆どの生物ではホスホリボシルトランスフェラーゼ (PRTアーゼ) として知られる10種の酵素からなる群がプリン、ピリミジン及びピリジンのヌクレオチドと芳香族アミノ酸であるヒスチジン及びトリプトファン<sup>10</sup>の生合成に関与している。これらの酵素は各々一般に芳香族である窒素性塩基、2価金属イオン及び -D-5-ホスホリボシル1-ピロリン酸 (PRPP) に高度に特異的である。いずれの場合も、PRPPのピロリン酸部分の開裂はリボフラノース環のアノマー反転により行われ、 -Nリボシドールン酸となる。脊椎動物では、数種のPRTアーゼが顕著な臓器特異性を示すが、その他は殆どの組織に種々のレベルで存在する。全生物でPRTアーゼは細胞内では可溶性細胞質フラクションに限定される。哺乳動物では、単一酵素オロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (OPRTアーゼ) がピリミジン塩基のサルベージに関与している。他方、細菌、酵母及び植物細胞にはウラシル特異的酵素であるウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼも存在する。 20

## 【0003】

細菌由来ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼはウラシルと5-ホスホリボシル-1-ピロリン酸 (PRib-PP) からウリジン-5'-ーリン酸 (UMP) 及びPPiへの変換を触媒する。Neuhardら, *Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms* (Munich-Petersen A. 編) Academic Press, New York, 95-148参照。重要な点として、細菌ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼは哺乳動物細菌には存在しないが、哺乳動物細胞のオロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ又はウリジン-5'-ーリン酸シンターゼと機能的に等価であり、ピリミジンの分解により形成される内生ウラシルの利用とピリミジン合成における外生ウラシル、シトシン及びウリジンの利用に根本的な重要性をもつ。これは後述するように *Saccharomyces cerevisiae* で立証されている。 30

## 【0004】

大腸菌由来UPP遺伝子は酵素ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードし、Andersonら, *Eur J. Biochem*, 204:51-56 (1992) (Andersonら, 1992) により単離されている。酵素ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼを欠失するが無傷のウラシル輸送体系をもつ大腸菌突然変異体はピリミジン源としてウラシルで増殖できず、培地にウラシルを分泌する。Malloy Aら, *FEBS Letts.*, 5:211-213 (1969) 参照。更に、20 $\mu$ M 5-フルオロウラシルに耐性であり、これはUPP突然変異体の選択に使用された表現型である。 40

## 【0005】

内生的に形成されたウラシルのサルベージと外生ウラシル及びシトシンの利用におけるウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼの役割は大腸菌を含む数種の微生物で立証されている。ピリミジンサルベージ酵素は増殖培地又は細胞核酸の分解産物から予め形成されたヌクレオ塩基とヌクレオシドを細胞に利用させる。

## 【0006】

*Saccharomyces cerevisiae* に由来するURPTアーゼをコード 50

する遺伝子のヌクレオチド配列が最近発表された。Kernら, Gene, 88:149-157 (1990) 参照。この遺伝子は28.7 kDa蛋白質をコードする。大腸菌と *Saccharomyces cerevisiae* に由来するウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼの推定アミノ酸配列を比較すると、全体の一致度は32%であるが、個別領域に多少の類似性があることが判明した。

#### 【0007】

天然ヌクレオシド及びヌクレオ塩基は重要な代謝産物であり、多数の臓器、系及び種に無数の生理的作用をもつ。ヌクレオシド及びヌクレオ塩基は代謝結果が多様であり核酸代謝に主要な役割を果たすことから、臨床的に有用な薬剤を開発する目的で過去40年にわたってこれらの化合物の多数の類似体が合成されている。合成ヌクレオシドは白血病の化学療法や、抗ウイルス剤（例えばシトシンアラビノシド (araC)、アシクロビル、アジドチミジン、5-フルオロデオキシウリジン及び5-フルオロウラシル）として重要な用途がある。代謝拮抗剤及び抗生物質として作用するヌクレオ塩基及びヌクレオシドの新規類似体も治療用途を期待して合成と評価が続けられている。ヌクレオシドとヌクレオ塩基には *de novo* ピリミジン及びプリン合成の特定阻害剤（例えばメトトレキセート、5-フルオロウラシル及びN-ホスホノアセチル-L-アスパラギン酸）の効果を逆転させるものもあるらしい。

10

#### 【0008】

細菌ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼは哺乳動物細胞のオロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ又はウリジン-5'-リン酸シターゼと機能的に等価である。これらの酵素は5-フルオロウラシル (5-FU) (注: 5-FUはFDAにより癌治療に認可されている。しかし、患者に比較的毒性である。そのため、その用量は副作用を避けるように最少にする必要がある。Pinedoら, J. Clin. Oncol., 6:1663-1664 (1988) 参照。) から5-フルオロウリジン5'-リン酸 (5-FUMP) への変換を媒介する。その後、5-フルオロウリジン5'-リン酸は哺乳動物 *de novo* ピリミジン経路で5-FdUDPと5-FdUMPに変換される。各5-FdUMPはチミジル酸シターゼ (Thy-A) の不可逆阻害剤であり、dTTP飢餓とそれに続くアポトーシスをもたらす。この変換は5-フルオロウラシルの細胞毒性作用を行うために必要な経路の一つである。細菌由来ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼが哺乳動物オロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼと同様に5-フルオロウラシルを活性代謝産物である5-フルオロウリジン-5'-リン酸に変換できるという上記結論はKawamura, Kら, Cancer Gene Ther., 7:637-43 (2000) のデータにより裏付けられる。哺乳動物に存在しない細菌ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を腫瘍細胞で発現させると、導入した細胞で5-フルオロウラシルの細胞毒性作用を有効に強化できることが示唆されている。

20

30

#### 【0009】

データは5-フルオロウラシルと併用したウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子治療が5-フルオロウラシルの抗腫瘍作用を増強できることを示唆している。従って、このアプローチは癌遺伝子治療の新規化学増強ストラテジーであり、より実現性の高い膀胱癌治療法である。

40

#### 【0010】

ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする大腸菌遺伝子を担持させたアデノウイルスをヒト結腸癌細胞に感染させると、5-フルオロウラシル治療に対して感受性が著しく増すことも研究者らに報告されている。大腸菌UPP遺伝子をアデノウイルスにより導入すると、DNAとRNAの両者による5-フルオロウラシルの同化の活性化が増進し、ヒト結腸癌細胞が5-FU治療に対して感作されることはデータが立証しており、「UPRT/5-フルオロウラシル系を結腸直腸癌治療の新規生化学フルオロウラシル療法とみなすことができる」ことを示唆している。Koyama, Fら, Eur J Cancer, 36:2403-2410 (2000) 参照。

#### 【0011】

50

更に、Sunamura, M.ら, Nippon Rinsho, 59:98-103 (2001)は、細菌UPP遺伝子を膵細胞に導入すると5-フルオロウラシルに対する膵細胞の感受性が有意に変化したと報告している。Adachi, Y.ら, Hum. Gene Ther., 11:77-89 (2000)も参照。同様の結果がInaba Mら, Jpn J Cancer Res, 90:349-354 (1999)によりヒト胃癌細胞系で報告されている。更に、Kanaiら, Cancer Res, 58:1946-51 (1998)は大腸菌ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をアデノウイルスにより導入すると、結腸、胃及び膵臓癌細胞系が著しく感作されたと報告している。更に、細菌ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を導入したヌードマウスにヒト肝臓癌又は胃癌を異種移植して5-フルオロウラシル治療すると、有意な*in vivo*抗腫瘍作用を生じた。 10

【0012】

ヌクレオシドとヌクレオ塩基の輸送は多種多様の生物で共通しており、多種多様の生理作用がある(GriffithとJarvis 1996)。生体ヌクレオシド及びヌクレオ塩基と大半のヌクレオシド類似体は親水性であり、細胞内外への移動には特殊な輸送体系が必要である。細胞及び生物にヌクレオシド及びヌクレオ塩基輸送体が存在するか否かは薬物動態と生体化合物並びにヌクレオシド及びヌクレオ塩基薬剤の配置及び*in vivo*生体活性に重要な影響がある。

【0013】

ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ活性が高い条件下でも外生ウラシル濃度が低い場合のウラシル取込みにはウラシル輸送体蛋白質が必要であることは数種の文献が記載している。ウラシルは膜に結合したウラシル輸送体蛋白質により助長されて細胞膜を通過して細胞質に入ることが研究者らにより示唆されている。 20

【0014】

しかし、ウラシル輸送体蛋白質又はこの蛋白質をコードする遺伝子であるuraA又はウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするUPP遺伝子をネズミチフス菌から単離したという記載はどの従来技術文献にも見当たらない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本明細書では上記のように従来技術に記載されていない単離核酸分子を開示するものであり、このような単離核酸分子が入手可能になれば、他の資源からの予想に基づいて核酸分子によりコードされる蛋白質の構造と機能の詳細な情報を入手できよう。 30

【0016】

更に、本明細書に開示する単離核酸分子が入手可能になれば、現行癌治療プロトコールの治療効力を改善すると共に、従来の抗腫瘍薬等の治療に対して癌細胞を感作することが可能な治療候補を開発できよう。

【0017】

更に、本明細書に開示する核酸分子によりコードされる蛋白質が同定されることにより、多数の化合物を迅速にスクリーニングし、治療用途の更に詳細な研究に適した候補を同定できよう。 40

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明はネズミチフス菌に由来する単離核酸分子、コードされる蛋白質(mRNA、DNA、cDNA、ゲノムDNAを含む)、及びそのアンチセンス類似体を提供する。生物学的に活性で診断又は治療に有用なそのフラグメントと、本明細書に開示する蛋白質に対して免疫反応性の抗体も提供する。

【0019】

本発明のペプチドをコードするDNAを含むプラスミドも提供する。上記DNA、mRNA又はプラスミドを含む組換え細胞も提供する。 50

## 【0020】

本発明の核酸分子を含むベクターと、組換え技術により本発明のペプチドを生産する方法も提供する。この方法は本発明のペプチドの発現を助長する条件下で本発明のペプチドをコードする核酸配列を含む形質転換原核及び/又は真核宿主細胞を培養した後、ポリペプチドを回収する。

## 【0021】

本発明の更に別の側面によると、本発明のポリヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズする十分な長さの核酸分子を含む一本鎖核酸プローブも提供する。

## 【0022】

本発明により提供される一本鎖核酸プローブとその混合物により、遺伝子工学の当業者は任意種に由来する類似ポリヌクレオチドとコードされるポリペプチドを同定及びクローニングすることができ、こうして本発明の配列の効用を更に拡大することができる。

## 【0023】

プローブは本発明のペプチドをコードする核酸分子の全長又はそのフラグメントとすることができる。一般に、プローブはコーディング配列に相補的であるが、イントロンのプローブも予想される。

## 【0024】

プローブはApplied Biosystems Model 392m DNA/RNA合成機等のオリゴヌクレオチド合成機を使用して合成することができ、検出可能なマーカーで標識することができる。核酸の種々の領域に対応する2種以上の標識プローブの組合せをキットに加え、ハイブリダイゼーションにより遺伝子を検出及び/又は分析できるようにしてもよい。

## 【0025】

別の側面では、本発明は本発明のペプチドを検出するためのアッセイに関する。

## 【0026】

別の側面では、本発明は本発明のペプチドをコードする核酸配列の突然変異に関連する疾患を検出し、コードされるポリペプチドの濃度変化を検出するための診断アッセイを提供する。

## 【0027】

本発明の更に別の側面によると、DNA合成及びDNAベクター製造等のin vitro目的のために本発明のペプチド又は前記ポリペプチドをコードする核酸分子を利用する方法が提供される。

## 【0028】

本発明のペプチドを発現する細胞の同定方法も提供される。

## 【0029】

本発明のポリペプチドに特異的な抗体が入手可能になれば、(例えば正常対疾患脳組織における)本発明のペプチドの分布と発現密度を監視するために免疫組織化学技術を利用することが可能になる。このような抗体を診断及び治療用途に利用することもできる。この抗体はウラシル輸送体蛋白質又はウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼの生物活性を中和できることが好ましい。

## 【0030】

本発明のペプチドの一方又は両方を種々の潜在的アゴニスト又はアンタゴニストで試験できるならば、本発明のペプチドの一方又は両方の機能と活性に関する更なる情報が得られ、本発明のペプチドのヒト対応物があるならば、これと非常に特異的に相互作用することが可能な化合物を同定及び設計できよう。

## 【0031】

更に、種々の疾患状態の薬剤開発と治療処置に関連して本発明のペプチドをコードするDNAを入手できるならば、従来未知の所定機能の存在と相関し得る前記遺伝子の任意変異(例えば突然変異)の識別が可能になる。

## 【0032】

10

20

30

40

50

上述のように、5 - フルオロウラシルは癌治療に認可されている。しかし、その使用に伴う大きな欠点は比較的毒性であるという点である。本発明の更に別の態様によると、5 - フルオロウラシルの治療効力を改善するために十分な量のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする本発明の核酸を5 - フルオロウラシル治療に反応性の宿主細胞に投与方法が提供される。この効果はウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼが5 - フルオロウラシルをその非毒性代謝産物である5 - フルオロウラシル5' - リン酸に変換できるという性質により得られる。従って、本発明のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする新規遺伝子はより実現性の高いヒト癌の治療法に道を開くと考えられる。

【0033】

10

以下、本発明を詳細に説明するが、以下の説明は本発明を理解し易くすることを目的とし、特許請求の範囲に記載する発明を制限するものではない。明細書と特許請求の範囲を更に熟考することにより本発明の他の特徴と利点も当業者に自明である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

本明細書及び特許請求の範囲において使用する単数形はそうでないことが文脈から明白に読み取れる場合を除いて複数形も含むことに留意すべきである。従って、例えば「宿主細胞」と言う場合には複数のこのような宿主細胞を含み、「抗体」と言う場合には1種以上の抗体と当業者に公知のその等価物を含み、その他も同様である。

【0035】

20

特に定義しない限り、本明細書で使用する全技術及び科学用語は本発明が属する分野の当業者に一般に理解されている通りの意味をもつ。本発明の実施又は試験には本明細書に記載するものと類似又は等価の任意方法及び材料を使用することができるが、好適方法、装置及び材料は本明細書に記載するものである。

【0036】

本明細書に引用した全刊行物はこれらの刊行物に報告されている方法、ベクター等で本発明に関連して使用可能なものを記載及び開示する目的で参考資料として本明細書に組み込む。本明細書中の如何なる記載も本発明が先発明の理由でこれらの開示に既に記載されていると認めるものではない。

【0037】

30

以下の記載では、組換えDNA技術の分野で使用されている多数の用語を広く使用する。これらの用語の範囲を含めて本明細書及び特許請求の範囲をより明瞭且つ矛盾なく理解できるように、以下に定義を示す。

【0038】

本発明は各々ネズミチフス菌に由来する新規ウラシル輸送体蛋白質とウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする単離核酸分子を提供する。具体的には、本発明のペプチドをコードする単離DNAと組換えメッセンジャーRNA (mRNA) を記載する。単離DNAのスプライス変異体も記載する。

【0039】

「本発明の核酸」と「核酸分子」は同義に使用し、本発明のペプチドをコードする本発明の核酸分子を意味する。

40

【0040】

「ポリペプチド」又は「ペプチド」又は「蛋白質」とはアミノ酸残基のポリマーとその変異体及び合成類似体を意味し、本明細書では同義に使用する。従って、これらの用語は1個以上のアミノ酸残基が合成非天然アミノ酸(例えば対応する天然アミノ酸の化学的類似体)であるアミノ酸ポリマーと、天然アミノ酸ポリマーを意味する。好適ポリペプチドは本発明のペプチドである。

【0041】

本明細書で使用する「アミノ酸配列」なる用語はオリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド又は蛋白質配列及びそのフラグメント又は部分と、天然又は合成分子を意味する。

50

## 【0042】

「本発明のペプチド」なる用語は本発明の核酸分子によりコードされるポリペプチドを意味する。変異体とフラグメントも含む。

## 【0043】

本明細書で使用する「ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子」又は「UPP」とは配列番号1の核酸分子によりコードされるネズミチフス菌に由来するウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を意味する。本明細書に開示する核酸配列に高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする核酸分子も含む。このような核酸分子は多数の方法で特徴付けることができ、例えばDNAが配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードする場合や、DNAが配列番号1に記載のヌクレオチド配列を含む場合がある。UPPのコーディング配列は配列番号2の蛋白質をコードする図1に示すヌクレオチド929~2218(1290塩基対によりコードされる429アミノ酸)に由来する。

10

## 【0044】

一般に、UPP遺伝子がスプライス変異体の場合を除き、開示するUPPDNAは本明細書に記載するUPP遺伝子と実質的配列相同性(即ち>約90%)をもつ。スプライス変異体をコードするDNA又はRNAは本明細書に記載するDNA又はRNAとの総体配列相同性が90%未満の場合もあるが、このようなスプライス変異体でも開示DNAとほぼ100%相同の領域を含む。

## 【0045】

本明細書で使用する「ウラシル輸送遺伝子」又は「uraA」とは配列番号1の核酸分子又は配列番号1のヌクレオチド配列に高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする核酸分子によりコードされるネズミチフス菌に由来するウラシル輸送体蛋白質をコードする遺伝子を意味する。このような核酸分子は多数の方法で特徴付けることができ、例えばDNAが配列番号3に記載のアミノ酸配列をコードする場合や、DNAが配列番号1に記載のヌクレオチド配列を含む場合がある。一般に開始及び停止コドンは図1に示す通りである。完全配列の任意番号はヌクレオチド1~2520であり、208アミノ酸蛋白質をコードする合計627塩基対のヌクレオチド215~841により規定される配列番号2のウラシル輸送体蛋白質のコーディング配列である。

20

## 【0046】

本明細書に記載する核酸分子は当業者に公知の種々の蛋白質発現系にこのような核酸を組み込んで本発明のペプチドを生産するのに有用である。更に、このような核酸分子又はそのフラグメントを容易に検出可能な置換基で標識し、所定試料中におけるUPP又はuraAをコードする遺伝子又はmRNA転写産物の存在及び/又は量をアッセイするためのハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。

30

## 【0047】

本明細書に記載する核酸分子とそのフラグメントは本明細書に記載する本発明のペプチドをコードする遺伝子を増幅するためのPCR反応でプライマー及び/又は鋳型としても有用である。

## 【0048】

「遺伝子」とはそのヌクレオチド配列がポリペプチド分子をコードする核酸分子を意味する。遺伝子は連続ヌクレオチド配列でもよいし、イントロン、プロモーター領域、スプライス部位及び反復配列等の介在セグメントを含んでいてもよい。遺伝子はRNAでもDNAでもよい。好適遺伝子は本発明のペプチドをコードする遺伝子である。

40

## 【0049】

「核酸」又は「核酸分子」なる用語はリボ核酸(RNA)又はデオキシリボ核酸(DNA)、プローブ、オリゴヌクレオチド、そのフラグメント又は部分、及びプライマーを対象とする。DNAは相補的DNA(cDNA)でもよいし、ゲノムDNAでもよく、例えば本発明のペプチドをコードする遺伝子である。

## 【0050】

特に指定しない限り、ヌクレオチドとは糖部分(ペントース)、リン酸基、及び窒素性複

50

素環塩基から構成されるDNA又はRNAのモノマー単位を意味する。塩基はグリコシド炭素（ペントースの1'炭素）を介して糖部分に結合しており、この塩基と糖の組合せがヌクレオシドである。ヌクレオシドがペントースの3'又は5'位に結合したリン酸基を含む場合にはヌクレオチドと言う。機能的に連結したヌクレオチドの配列を一般に「塩基配列」又は「ヌクレオチド配列」等と言い、本明細書では一般原則に従って左から右に向かって5'末端から3'末端を示す式により表す。

【0051】

本明細書に記載する各「ヌクレオチド配列」はデオキシリボヌクレオチド（略字A、G、C及びT）の配列として表す。但し、核酸分子の「ヌクレオチド配列」はDNA分子又はポリヌクレオチドについてはデオキシリボヌクレオチド配列を含み、RNA分子又はポリヌクレオチドについては特定デオキシリボヌクレオチド配列中の各チミジンデオキシリボヌクレオチド（T）をリボヌクレオチドウリジン（U）で置換した対応リボヌクレオチド（A、G、C及びU）配列を含む。例えば、デオキシリボヌクレオチド略字を使用して記載した配列番号1の配列をもつRNA分子と言う場合には、配列番号1の各デオキシリボヌクレオチドA、G又はCを対応するリボヌクレオチドA、G又はCで置換し、各デオキシリボヌクレオチドTをリボヌクレオチドUで置換した配列をもつRNA分子を意味する。

10

【0052】

本明細書及び特許請求の範囲においてDNA、RNA、ポリペプチド又は蛋白質の修飾語として「単離」及び/又は「精製」なる用語を使用する場合には、指定するDNA、RNA、ポリペプチド又は蛋白質が人工的に指定形態で生産されており、従ってその天然*in vivo*細胞環境から分離されていることを意味する。この人的介入の結果として、本発明の組換えDNA、RNA、ポリペプチド及び蛋白質は天然状態のこれらのDNA、RNA、ポリペプチド又は蛋白質では得られない本明細書に記載する種々の点で有用である。

20

【0053】

同様に、本明細書でDNA、RNA、ポリペプチド又は蛋白質の修飾語として使用する「組換え」とは、指定するDNA、RNA、ポリペプチド又は蛋白質が例えばクローニング、組換え発現等により人工的に作製されていることを意味する。従って、例えば本明細書で使用する組換え蛋白質とは、人工的に宿主に加えられたDNAを発現する組換え宿主により生産された蛋白質を意味する。

30

【0054】

核酸配列の定義においては、実質的に類似するアミノ酸配列をコードすることが可能な全該当核酸配列を本明細書に開示する参照核酸配列に実質的に類似するか又は実質的に同一のヌクレオチド配列を含むとみなす。

【0055】

実際に、「実質的に同一配列」なる用語は2種の蛋白質をコードするDNA又はRNAが中等ストリンジェント条件下でハイブリダイズし、同一アミノ酸配列をもつか又はその構造もしくは機能を変えない配列変異をもつ蛋白質をコードすることを意味する。

【0056】

ヌクレオチド配列「類似性」は2種のポリヌクレオチド配列が（適宜ヌクレオチド挿入又は欠失により）最適に整列させた場合にその配列の対応位置に同一ヌクレオチド塩基をもつ程度の尺度である。配列類似性又は類似性百分率は例えばウイスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ（UWCG）から入手可能なGAPコンピュータープログラム、バージョン6等の配列分析ソフトウェアを使用して配列情報を比較することにより決定することができる。GAPプログラムはSmithとWaterman（Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981）の修正によるNeedlemanとWunsch（J. Mol. Biol. 48: 443, 1970）のアラインメント法を利用している。

40

【0057】

本明細書で使用する場合、「実質的に一致するヌクレオチド配列」は一致度が少なくとも

50

約90%であり、実質的に一致するアミノ酸配列はアミノ酸一致度が95%を上回る。但し、スプライス変異体として上記相同性レベルを下回るか又は保存アミノ酸置換（又は縮重コドンの置換）により変異した蛋白質（及び前記蛋白質をコードするDNA又はmRNA）も本発明の範囲に含むものとする。

【0058】

本発明は配列番号1に記載の核酸と異なるが同一表現型をもつ核酸も含む。類似表現型の核酸を「機能的に等価の核酸」とも言う。

【0059】

本明細書で使用する「機能的に等価の核酸」なる用語は重要でない僅少な配列変異をもつが、本明細書に開示する核酸と実質的に同様に機能して同一蛋白質産物を生産する核酸も含む。

10

【0060】

機能的に等価の配列は本明細書及び特許請求の範囲に開示する核酸及びアミノ酸組成物と実質的に同様に機能して実質的に同一の組成物を生産する。特に、機能的に等価のDNAは本明細書に開示すると同一であるか又は非極性残基を別の非極性残基もしくは電荷をもつ残基を同一電荷をもつ残基で置換する等の保存アミノ酸変異をもつ蛋白質をコードする。これらの変異としては蛋白質の三次構造を実質的に変えない変異として当業者に認められているものが挙げられる。

【0061】

特に、機能的に等価の核酸は本明細書に開示すると同一であるか又は保存アミノ酸変異をもつか又は配列番号2又は3に記載のアミノ酸配列をもつものと実質的に類似するポリペプチドをコードする。

20

【0062】

例えば、保存変異としては非極性残基を別の非極性残基で置換したり、電荷をもつ残基を同一電荷をもつ残基で置換することが挙げられる。これらの変異としては蛋白質の三次構造を実質的に変えない変異として当業者に認められているものが挙げられる。

【0063】

遺伝コードの縮重により特定ハイブリダイゼーション条件下で本発明の核酸と必ずしもハイブリダイズしない本発明のポリペプチドをコードする核酸も提供される。本発明のポリペプチドをコードする好適核酸は配列番号2又は3に記載の実質的に同一のアミノ酸配列をコードするヌクレオチドから構成される。

30

【0064】

本発明のポリペプチドをコードする核酸の1例は、

(a) 配列番号2又は3に記載のアミノ酸配列をコードするDNA、

(b) 中等ストリンジェント条件下で(a)のDNAとハイブリダイズし、本発明の生物学的に活性なウラシル輸送体蛋白質又は本発明のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素をコードするDNA、あるいは

(c) 上記(a)又は(b)に関して縮重のDNAから選択することができる。

【0065】

本明細書で使用する「縮重」なる用語は配列番号1と少なくとも1個のヌクレオチドが異なるが、配列番号2又は3と同一アミノ酸をコードするコドンの意味する。例えば、トリプレット「UCU」、「UCC」、「UCA」及び「UCG」で表す4種のコドンはいずれもアミノ酸セリンをコードするので相互に縮重である。

40

【0066】

本明細書において配列番号1のヌクレオチド配列と言う場合には、一般に本発明のペプチドの各々又は一方をコードするコーディング配列を意味する。

【0067】

核酸分子又はヌクレオチド配列の「フラグメント」は全長よりも短く、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で配列番号1のヌクレオチド配列、好ましくは本明細書に開示するコーディング配列の一方又は両方と特異的にハイブリダイズすることが可能な少

50

なくとも最小長を含む核酸部分である。このようなフラグメントの長さは15～17ヌクレオチド以上が好ましい。

【0068】

「変異体」核酸分子又はDNA分子とは本発明のポリペプチドをコードする天然ヌクレオチド配列（コーディング部分）に小変異、即ち好ましくは天然核酸分子の生物活性を実質的に維持しながら天然配列の1個以上のヌクレオチドを欠失、付加及び/又は置換する変異を含むDNA分子を意味し、当然のことながらこのような変異は配列番号1に指定するコーディング領域の一方又は両方に位置する。変異体DNA分子は例えば標準DNA突然変異誘発技術又は変異体DNA分子もしくはその一部の化学合成により生産することができる。一般に、変異は参照ヌクレオチド配列と変異体が全体で密接に類似し、多くの領域が一致するように限定される。

10

【0069】

変異体ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列変異はサイレントでもよい。即ち、ポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸を変異させないものとしてすることができる。変異がこのようなサイレント変異に限定される場合には、変異体は参照と同一のアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする。

【0070】

あるいは、変異は「保存」性でもよい。保存変異は参照ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変えるヌクレオチド配列（コーディング領域又は配列/蛋白質コーディング領域の一方又は両方）の変異である。このようなヌクレオチド変異の結果、参照配列によりコードされるポリペプチドにアミノ酸置換、付加、欠失、融合及び短縮が生じ得る。即ち、保存変異は核酸配列によりコードされるポリペプチドの1個以上のアミノ酸残基の保存変異即ちアミノ酸置換を生じる遺伝子の蛋白質コーディング領域の変異である。

20

【0071】

本明細書で使用する「挿入」又は「付加」とは天然分子に比較して夫々1個以上のアミノ酸又はヌクレオチド残基を付加するアミノ酸又はヌクレオチド配列の変異を意味する。

【0072】

本明細書で使用する「置換」とは1個以上のアミノ酸又はヌクレオチドを夫々別のアミノ酸又はヌクレオチドで置換することを意味する。

30

【0073】

好ましくは、好適核酸分子の変異体形は本発明のペプチドをコードする天然遺伝子とのヌクレオチド配列類似度が少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%である。

【0074】

「プライマー」又は「核酸ポリメラーゼプライマー」とは核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が開始される条件下即ち適当な緩衝液中で適当な温度で4種の異なるヌクレオチド三リン酸と重合剤（即ちDNAポリメラーゼ又は逆転写酵素）の存在下にDNA合成開始点として作用することが可能な天然又は合成オリゴヌクレオチドを意味する。プライマーの厳密な長さは多数の因子に依存するが、一般には15～25ヌクレオチドである。短いプライマー分子は鋳型と共に十分に安定なハイブリッド複合体を形成するためには一般により低温が必要である。プライマーは鋳型の厳密な配列を反映する必要はないが、鋳型とハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。プライマーは所望により標識してもよい。

40

【0075】

本発明のペプチドに関して「一致度」又は「相同度」とは最大相同百分率に達するように配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後に配列番号2又は4の一方における残基と一致する候補配列中のアミノ酸残基の百分率として本明細書では定義し、保存置換は配列一致とみなさない。N又はC末端伸長、欠失又は挿入はいずれも一致度又は相同度を低下するとみなさない。

50

## 【0076】

本明細書で使用する本発明のペプチドの「変異体」とは本発明のペプチドの配列に比較して1個以上のアミノ酸置換、挿入、及び/又は欠失を含むアミノ酸配列をもつポリペプチドを意味する。一般に、変異は参照配列(本発明のペプチド)と変異体が全体で密接に類似し、多くの領域が一致するように限定される。このような変異体は一般に生物学的に活性であり、必然的に着目ポリペプチドと配列一致度が100%未満である。

## 【0077】

1好適態様では、生物学的に活性な変異体は本発明のペプチドとのアミノ酸配列一致度が少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%、更に好ましくは少なくとも約85%、更に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%である。アミノ酸置換は単一アミノ酸残基の置換が好ましい。

10

## 【0078】

本発明のペプチド(参照蛋白質)の「フラグメント」とは野生型又は参照蛋白質の完全アミノ酸配列の一部を含む蛋白質分子を意味する。

## 【0079】

本発明により提供されるDNAから本発明のペプチドをコードする相補的DNAクローンを作製することもできる。本発明で提供される核酸クローンを使用し、本発明のペプチドをコードするゲノムクローンを単離したり、各種資源から作製したライブラリーのスクリーニングにより任意スプライス変異体を単離することができる。

## 【0080】

あるいは、ライブラリーを適当なプローブでスクリーニングすることもできる。従って、本発明のペプチドをコードする核酸の1単離手段は当分野で周知の方法を使用して天然又は人工的に設計した核酸プローブで細菌ゲノムライブラリーを探查する方法である。この目的には本発明のペプチドをコードする遺伝子に由来する核酸プローブが特に有用である。核酸の例は本発明のペプチドをコードするRNA、cDNA又は単離ゲノムDNAである。限定するものではないが、このような核酸としては配列番号1と実質的に同一のヌクレオチド配列をもつ核酸、好ましくは前記配列に含まれるコーディング領域又は配列番号2もしくは3に記載のアミノ酸配列をコードする核酸が挙げられる。

20

## 【0081】

本発明のペプチドのスプライス変異体を位置決定するためには当分野で周知の核酸増幅技術を使用することができる。これはヒトRNA又はゲノムDNAを増幅するためのプライマーとして不一致配列の周囲のDNA配列に基づくオリゴヌクレオチドを利用することにより実施される。増幅産物の寸法と配列を決定するとスプライス変異体の存在を確認することができる。更に、ハイブリダイゼーションによりヒトゲノムDNA配列を単離すると、本発明のペプチドをコードする転写産物の種々のスプライス変異体に対応するイントロンにより分離された複数のエキソンを含むDNAが得られる。核酸操作技術は一般に例えばSambrookら(1989)やAusubelら(1987, 定期的に改訂)に記載されている。核酸の化学合成法は例えばBeaucageとCarruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-1862, 1981や、Matteucciら, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185, 1981に記載されている。核酸の化学合成は例えば市販自動オリゴヌクレオチド合成機で実施することができる。

30

40

## 【0082】

本明細書で使用する「スプライス変異体」とは2種以上のmRNAを生産するゲノムDNAの一次転写産物の異なったプロセッシングにより生産される本発明のペプチドをコードする核酸の変異体を意味する。異なってプロセッシングされた一次転写産物に由来するcDNAは完全アミノ酸一致領域と異なったアミノ酸配列をもつ領域をもつ本発明のペプチドをコードする。従って、同一ゲノム配列から複数の関連するmRNAと蛋白質を生産することができる。得られるmRNAと蛋白質の両者を本明細書では「スプライス変異体」と言う。

## 【0083】

50

本明細書で使用する核酸「プローブ」とは配列番号1のいずれかに記載の任意14以上の連続塩基、好ましくは前記配列に含まれるコーディング領域の相補体と同一又は前記相補体である少なくとも14、好ましくは少なくとも20、より好ましくは少なくとも50個の連続塩基を含むヌクレオチド配列をもつ1本鎖DNA又はRNA又はその類似体である。更に、本発明のポリペプチドの領域をコードする完全cDNA又は配列番号1に対応する完全配列をプローブとして使用してもよい。

【0084】

本発明のプローブによる好適スクリーニング条件は温度約37℃、ホルムアミド濃度約20%及び塩濃度約5倍標準クエン酸(SSC; 20×SSCはpH7.0で3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸ナトリウムを含む)を含む。このような条件により、完全な相同を必要とすることなしにプローブ配列と実質的類似度をもつ配列を同定することが可能になる。

10

【0085】

プローブとの相同度の低い配列に対して区別しながらプローブと少なくとも70%の相同度をもつ配列を同定できるようなハイブリダイゼーション条件を選択することが好ましい。その結果、配列番号1に記載のヌクレオチド配列と実質的に同一のヌクレオチド配列をもつ核酸が得られる。

【0086】

ライブラリーのスクリーニング後にハイブリダイゼーションシグナルを検出することにより陽性クローンを同定し、同定したクローンを制限酵素マッピング及び/又はDNA配列分析により特性決定した後、本明細書に記載する配列との比較により試験し、本発明の完全ペプチドをコードするDNAを含むか否かを確かめる。選択したクローンが不完全である場合には、これらのクローンを使用して同一又は別のライブラリーを再スクリーニングし、オーバーラップクローンを得ることができる。所望により、本発明の完全ペプチドをコードするオーバーラップクローンが得られるまでライブラリーを陽性クローンで再スクリーニングしてもよい。ライブラリーがcDNAライブラリーである場合には、オーバーラップクローンはオープンリーディングフレームを含む。ライブラリーがゲノムである場合には、オーバーラップクローンはエキソンとイントロンを含む可能性がある。いずれの場合にも、本明細書に記載するDNAとコードされる蛋白質との比較により完全クローンを同定することができる。

20

30

【0087】

従って、核酸プローブは種々の用途に有用である。他方、本発明の核酸分子の増幅用PCRプライマーとして使用することもできる。他方、例えばin-situハイブリダイゼーション又はノーザンブロットハイブリダイゼーションにより標的組織における本発明の分子の発現の検出用ツールとしても有用である。

【0088】

本発明のプローブは以下に記載するような当分野で周知の方法により標識し、種々の診断キットで使用することができる。

【0089】

「ラベル」とは化合物又は組成物と特異的に結合して検出を容易にする化合物又は組成物を意味し、標識化合物又は組成物を別の分子に特異的に結合できるようにする性質の付与も含む。「標識」とは一般に共有結合を介して特異的に結合した化合物又は組成物を意味するが、非共有相互作用を利用して化合物又は組成物をラベルで標識することもできる。従って、ラベルは直接検出可能なもの即ちラベルは放射性同位体(例えば<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I)又は蛍光もしくは燐光分子(例えばFITC、ローダミン、ランタニド燐光体)でもよいし、間接検出可能なもの即ち酵素活性(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)又は別の分子(例えばストレプトアビジン、ビオチン、抗原、エピトープ又は抗体)とのその結合能でもよい。ラベルの組込みは種々の手段により行うことができ、即ちポリメラーゼ媒介プライマー伸長反応で放射性標識又はビオチン化ヌクレオチドを使用した

40

50

り、組換え発現もしくは合成手段によるエピトープタグ法、又は抗体との結合により行うことができる。

【0090】

ラベルは直接結合してもよいし、立体障害を減らすように種々の長さのスペーサーアームを介して結合してもよい。本発明の目的には多様な標識試薬の任意のものを使用することができる。例えば、1種以上の標識ヌクレオシド三リン酸、プライマー、リンカー又はプローブを使用することができる。免疫蛍光分析技術については参考資料として本明細書に組込む De Luca, "Immunofluorescence Analysis", in Antibody Assay Tool, Marchalonicsら編, John Wiley & Sons, Ltd., pp. 189-231 (1982) に記載されている。

10

【0091】

ラベルなる用語は標識分子に特異的に結合できる「タグ」を意味する場合もある。例えば、ピオチンをタグとして使用する場合には、タグに結合するためにアビジン化又はストレプトアビジン化西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を使用し、発色基質 (例えばテトラメチルベンズアミン) を使用して HRP の存在を検出することができる。同様に、タグはエピトープ又は抗原 (例えばジゴキシゲニン) でもよいし、酵素、蛍光又は放射性標識抗体を使用してタグに結合してもよい。

【0092】

本発明の1態様では、本明細書に開示する本発明のペプチドをコードする cDNA は配列番号1と実質的に同一のヌクレオチド配列を含む。本発明の蛋白質をコードする好適 cDNA 分子は配列番号1と同一のヌクレオチド配列、好ましくは本明細書に記載するコーディング領域を含む。

20

【0093】

本発明の別の態様は配列番号2又は3と実質的に同一のアミノ酸配列をコードする参照ヌクレオチド配列と実質的に同一のヌクレオチド配列をもつ核酸に関する。

【0094】

ハイブリダイゼーションとは染色体DNAに天然に存在する結合に類似する水素結合を介して核酸の相補鎖 (即ちセンス: アンチセンス鎖又はプローブ: ターゲットDNA) が相互に結合することを意味する。所定プローブをターゲットDNAとハイブリダイズするために使用するストリンジェンシーレベルは当業者が容易に変えることができる。

30

【0095】

本明細書において「ストリンジェントハイブリダイゼーション」なる用語はポリ核酸ハイブリッドが安定な条件を表すために使用する。当業者に公知の通り、ハイブリッドの安定性はハイブリッドの融点 ( $T_m$ ) で表される。 $T_m$  は式:

$$81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - 600 / l$$

(式中、 $l$  はハイブリッドのヌクレオチド長である) により概算することができる。 $T_m$  は配列相同度が1%減る毎に約1~1.5 低下する。一般に、ハイブリッドの安定性はナトリウムイオン濃度と温度に依存する。一般に、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイゼーション反応を実施した後に、より高い別のストリンジェンシーで洗浄する。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーとはこのような洗浄条件を言う。

40

【0096】

本明細書で使用する「中等ストリンジェントハイブリダイゼーション」なる用語はターゲットDNAと約60%、好ましくは約75%、より好ましくは約85%の一致度をもつ相補的核酸とターゲットDNAを結合させることができる条件を意味し、ターゲットDNAとの一致度が約90%を上回ることが特に好ましい。中等ストリンジェント条件は42で50%ホルムアミド、5x Denhart 溶液、5x SSPE、0.2% SDS 中でハイブリダイゼーション後に65で0.2x SSPE、0.2% SDS で洗浄するのに等価の条件である。

【0097】

50

「高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション」なる用語は65の0.018M NaCl中で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する(即ち本明細書ではハイブリッドが65の0.018M NaCl中で不安定ならば高ストリンジェンシー条件下で不安定であるとみなす)。高ストリンジェンシー条件は例えば42で50%ホルムアミド、5xDenhart溶液、5xSSPE、0.2%SDS中でハイブリダイゼーション後に65で0.1xSSPE、0.1%SDSで洗浄することにより提供することができる。

【0098】

「低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション」なる用語は42で10%ホルムアミド、5xDenhart溶液、6xSSPE、0.2%SDS中でハイブリダイゼーション後に50で1xSSPE、0.2%SDSで洗浄するのに等価の条件を意味する。 10

【0099】

Denhart溶液とSSPE(例えばSambrook, Fritsch, and Maniatis, in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989参照)は他の適当なハイブリダイゼーション緩衝液と同様に当業者に周知である。例えば、SSPEはpH7.4リン酸緩衝液、0.18M NaClである。SSPEは例えばNaCl 175.3g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 27.6g及びEDTA 7.4gを水800mlに溶かし、pHを7.4に調整した後に水を加えて1リットルとすることにより20倍ストック溶液として調製することができる。Denhart溶液 20(例えばDenhart(1996)Biochem. Biophys. Res. Commun. 23:641参照)は例えばFicoll(Type 400, Pharmacia LKB Biotechnology, INC., Piscataway N.J.)5gとポリビニルピロリドン5gとウシ血清アルブミン(フラクシオンV; Sigma, St. Louis Mo.)5gを混合した後に水を加えて500mlとし、粒状物を濾去することにより50倍ストック溶液として調製することができる。

【0100】

本発明のポリペプチドをコードする好適核酸は中等ストリンジェント、好ましくは高ストリンジェンシー条件下で配列番号1に記載の核酸配列の実質的に完全配列又は実質的部分(即ち一般に少なくとも15~30ヌクレオチド)とハイブリダイズする。 30

【0101】

本発明の核酸は当分野で周知の種々の方法により生産することができ、例えば配列番号1の種々の領域に由来するオリゴヌクレオチドプライマーを使用するPCR増幅等を利用して本明細書に記載する方法により生産することができる。

【0102】

本明細書で使用する「発現」とはポリ核酸がmRNAに転写され、ペプチド、ポリペプチド又は蛋白質に翻訳されるプロセスを意味する。ポリ核酸がゲノムDNAに由来する場合には、適切な真核宿主細胞又は生物を選択するならば発現はmRNAのスプライシングを含むことができる。

【0103】

本発明のポリペプチドの作製手段の1例は当分野で周知の方法を使用して細菌細胞等の適当な宿主細胞で本発明のポリペプチドをコードする核酸を発現させ、発現されたポリペプチドを同じく周知方法で回収する。本発明のポリペプチドは本発明のペプチド又はそのフラグメント/部分をコードする核酸を含む発現ベクターで形質転換させた細胞から直接単離することができる。 40

【0104】

クローニングしたDNAを適当な発現ベクターに組込み、各々1個以上の別個遺伝子をコードするプラスミドベクターもしくはプラスミドベクター組合せ又は直鎖DNAを真核細胞にトランスフェクトし、トランスフェクトした細胞を選択する方法は当分野で周知である(例えばSambrookら(1989)Molecular Cloning: A 50

Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press 参照)。本発明の核酸構築物を含む発現ベクターを宿主細胞に導入(形質導入)し、形質導入した組換え細胞(即ち組換え異種核酸を含む細胞)を生産するのに適した手段は当分野で周知である(例えば各々参考資料としてその開示内容全体を本明細書に組込む Friedmann, 1989, Science, 244: 1275-1281; Mulligan, 1993, Science, 260: 926-932 参照)。

#### 【0105】

形質導入法の例としては例えばウイルスベクターを利用した感染(例えば米国特許第4,405,712号及び4,560,764号参照)、リン酸カルシウムトランスフェクション(米国特許第4,399,216号及び4,634,665号参照)、デキストラン硫酸トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポフェクション(例えば米国特許第4,394,448号及び4,619,794号参照)、サイトフェクション、粒子ビーズボンバードメント等が挙げられる。異種核酸は場合によりその染色体外(即ちエピソーム)維持を可能にする配列を含んでいてもよいし、異種核酸は宿主のゲノムに組み込まれる供与核酸でもよい。その後、DNAによりコードされる本発明のペプチドを発現させる条件下で組換え細胞を培養することができる。好適細胞としては哺乳動物細胞(例えばHEK293、CHO及びLtk-細胞)、酵母細胞(例えばPichia pastoris等のメチロトロフ酵母細胞)、細菌細胞(例えば大腸菌)等が挙げられる。

10

#### 【0106】

適当な発現ベクターは当分野で周知であり、該当DNAの発現を調節することが可能なプロモーター領域等の調節配列に機能的に連結したDNAを発現させることが可能なベクターが挙げられる。従って、発現ベクターとは適当な宿主細胞に導入すると、挿入したDNAを発現させる組換えDNA又はRNA構築物(例えばプラスミド、ファージ、組換えウイルス又は他のベクター)を意味する。適当な発現ベクターは当業者に周知であり、真核細胞及び/又は原核細胞で複製可能なものや、エピソームに維持されるものや、宿主細胞ゲノムに組み込まれるものが挙げられる。

20

#### 【0107】

真核及び/又は原核発現ベクターの例としてはpSV-2gpt系(Mulliganら, 1979, Nature, 277: 108-114)、Okayama-Berg系(Mol. Cell Biol., 2: 161-170)、Genetics Instituteにより記載された発現クロニングベクター(1985, Science, 228: 810-815)及び種々の市販プラスミドベクター(例えばpUCやpBC)等の真核カセットが挙げられる。これらのプラスミドベクターは各々本発明の目的蛋白質の発現を促進することが可能である。

30

#### 【0108】

本明細書で使用する「異種又は外来DNA及び/又はRNA」は同義に使用し、該当DNA又はRNAが存在している細胞のゲノムの部分として天然に存在しないDNAもしくはRNA又は天然に存在するものとは異なるゲノムの位置に存在するDNAもしくはRNAを意味する。一般に、異種又は外来DNA及びRNAとは宿主細胞に内在せず、人工的に細胞に導入されたDNA又はRNAを意味する。異種DNAの例としては本発明のペプチドをコードするDNAが挙げられる。

40

#### 【0109】

好適態様では、DNAをベクターにライゲートし、本発明のペプチド又はそのフラグメントを発現する形質転換細胞系を生産するのに適した宿主細胞に導入する。その後、得られた細胞系を大量に生産し、受容体機能に及ぼす薬剤の効果を再現可能に定量分析できる。

#### 【0110】

他の態様では、本発明のペプチドをコードするDNAのin vitro転写によりmRNAを生産することができる。このmRNAをその後、アフリカツメガエル卵母細胞に注入すると、RNAは本発明のペプチドの合成を誘導する。あるいは、本発明のペプチドを

50

コードするDNAを卵母細胞に直接注入し、本発明の機能的ペプチドを発現させることもできる。トランスフェクトした哺乳動物細胞又は注入した卵母細胞はその後、本明細書に記載する薬剤スクリーニング法で使用することができる。

【0111】

DNA又はRNAを導入することができる真核細胞としてはこのようなDNA又はRNAをトランスフェクトすることが可能であるかあるいは前記DNA又はRNAを注入可能な任意細胞が挙げられる。好適細胞は一過的又は安定的にトランスフェクトできると共にDNAとRNAを発現する細胞である。本発明の最も好適な細胞は異種DNAによりコードされる組換え又は異種ウラシル輸送体蛋白質又はウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素を発現することができる細胞である。このような細胞は経験的に識別することもできるし、トランスフェクト又は注入が容易であることが知られている細胞から選択してもよい。

10

【0112】

DNAを導入する細胞の例としては哺乳動物由来細胞（例えばCOS細胞、マウスL細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胚性腎細胞、アフリカミドリザル細胞及び当業者に公知の他の類似細胞）、両生類細胞（例えばアフリカツメガエル卵母細胞）、酵母細胞（例えば*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*）等が挙げられる。注入したRNA転写産物を発現させる細胞の例としてはアフリカツメガエル卵母細胞が挙げられる。DNAのトランスフェクションに好適な細胞は当業者に公知であるか又は経験的に識別することができ、HEK293、Ltk-細胞、COS細胞及びDG44細胞（*dhrf<sup>-</sup>* CHO細胞；例えばUrlaubら（1986）*Cell. Molec. Genet.* 12:555参照）が挙げられる。本明細書に記載する本発明のペプチドをコードするDNAを発現させるための他の哺乳動物発現系（市販系や当業者に公知の他の類似系を含む）も好適である。

20

【0113】

当分野で公知の方法を使用して核酸分子を細胞に安定的に組込むか又は一過的に導入することができる。選択マーカー遺伝子（例えばチミジンキナーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、ネオマイシン耐性等の遺伝子）をもつ発現ベクターを細胞にトランスフェクトし、マーカー遺伝子が発現する細胞に選択的な条件下にトランスフェクト細胞を増殖させることにより、安定的にトランスフェクトされた哺乳動物細胞を作製することができる。このような細胞を生産するためには、異種DNAによりコードされる本発明のペプチドを形成するために十分な濃度の本発明のペプチドをコードする核酸を細胞にトランスフェクトすべきである。本発明のペプチドをコードするDNAの厳密な量と割合は経験的に決定し、特定細胞及びアッセイ条件に合わせて最適化することができる。

30

【0114】

異種DNAはエピソームエレメントとして細胞に維持してもよいし、細胞の染色体DNAに組込んでよい。その後、得られた組換え細胞を培養するか又はこのような培養物もしくはその継代培養物から継代培養することができる。トランスフェクション、注入及び組換え細胞の培養方法は当業者に公知である。同様に、当業者に公知の蛋白質精製法を使用して本発明のペプチドを精製することができる。例えば、本発明のペプチドに特異的に結合する抗体又は他のリガンドを使用して本発明のペプチドをアフィニティー精製することができる。

40

【0115】

上記に従い、本発明のペプチドをコードするDNAを宿主細胞にトランスフェクトする。ノーザンブロット又はスロットブロット分析等の方法を使用し、本発明のペプチドをコードするDNA又はRNAを含むトランスフェクト細胞を選択することができる。トランスフェクト細胞を分析し、本発明のペプチドを発現する細胞を識別することもできる。urAによりコードされる蛋白質については、例えばその結合パートナー即ち細菌ウラシル輸送体蛋白質に対して免疫反応性の抗体との細胞の結合能を測定することにより分析を実施することができる。

50

## 【0116】

本明細書で使用する本発明のペプチドの活性とはネズミチフス菌に由来するウラシル輸送体蛋白質又はウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼの特徴を表す任意活性を意味する。このような活性は例えば放射性標識ウラシル取込み（ウラシル輸送活性）を測定するアッセイや、ガスクロマトグラフィー/質量分析によるウラシルとウリジンの直接測定（ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼによるウラシル-ウリジン変換）等の当業者に公知の任意方法により測定することができる。

## 【0117】

本発明のペプチド、生物学的に活性なフラグメント及びその機能的等価物は化学的合成により生産することもできる。例えば、Applied Biosystems, Inc. Model 430A又は431A自動ペプチド合成機（Foster City, Calif.）を使用し、製造業者により記載されている化学反応を利用して合成ポリペプチドを生産することができる。

10

## 【0118】

mRNAの翻訳を阻止するように本発明のペプチドの任意の一つをコードするmRNAの任意部分と特異的に結合することが可能なヌクレオチド配列をもつアンチセンスオリゴヌクレオチドも提供される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明のポリペプチドをコードするcDNAの配列の任意部分と特異的に結合することが可能な配列をもつことができる。

## 【0119】

本発明の更に別の態様によると、本発明のペプチドに対する抗体即ち本発明のペプチドのいずれかに対して特異的親和性をもつウラシル輸送体蛋白質又はウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ特異抗体も提供される。抗体の活性フラグメントも「抗体」の定義に含む。

20

## 【0120】

このような抗体は本発明のポリペプチド、蛋白質又はその部分を抗原として使用して当分野で公知の方法により生産することができる。例えば、参考資料として本明細書に組込むHarlowとLane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory (1988))に記載されているような当分野で周知の方法によりポリクローナル及びモノクローナル抗体を生産することができる。このような抗体を作製する際に本発明のポリペプチドを免疫原として使用することができる。あるいは、（市販合成機を使用して）合成ペプチドを作製し、免疫原として使用することもできる。当分野で周知の方法によりアミノ酸配列を分析し、対応するポリペプチドの疎水性又は親水性ドメインをコードするか否かを調べることができる。キメラ、ヒト化、CDR-グラフト又は二官能性抗体等の改変抗体も当分野で周知の方法により生産することができる。このような抗体も例えばSambrookら、前出及びHarlowとLane、前出に記載のハイブリドーマ、化学合成又は組換え法により生産することができる。抗ペプチド及び抗融合蛋白質抗体のどちらも使用することができる（例えば参考資料として本明細書に組込むBahouthら, Trends Pharmacol. Sci. 12: 338 (1991); Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, N.Y. (1989) 参照)。

30

40

## 【0121】

こうして生産した抗体を特に診断法及びシステムで使用し、試料中に存在する本発明のペプチドの濃度を検出することができる。

## 【0122】

このような抗体は本発明のポリペプチドの免疫アフィニティー又はアフィニティークロマトグラフィー精製に使用することもできる。更に、細胞表面における本発明のポリペプチドの存在の検出方法も本発明に含まれ、本方法は抗体を少なくとも1種の本発明のポリペプチドに結合させる条件下で前記ポリペプチドに特異的に結合する抗体と細胞を接触させ

50

、細胞に結合した抗体の存在を検出することにより細胞表面における本発明のポリペプチドの存在を検出する。このようなポリペプチドの検出に関連して、*in vitro*診断又は*in vivo*イメージング法に抗体を使用することができる。

【0123】

試料中の本発明のポリペプチドの*in vitro*検出に有用な免疫学的方法としては、検出可能な抗体を利用するイムノアッセイが挙げられる。このようなイムノアッセイとしては例えば当分野で周知のELISA、Pandexマイクロフルオロメトリーアッセイ、凝集アッセイ、フローサイトメトリー、血清診断アッセイ及び免疫組織化学染色法が挙げられる。当分野で周知の種々の手段により抗体を検出可能にすることができる。例えば、検出可能なマーカーを抗体に直接又は間接的に結合することができる。有用なマーカー

10

【0124】

本発明のペプチドの「免疫学的活性フラグメント」も本発明に含まれる。このようなフラグメントはターゲット免疫系（例えばマウス又はウサギ）で本明細書に開示する本発明の2種のペプチドのいずれかに特異的な抗体を生成することが可能であるか又はウラシル輸送体もしくはウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ特異抗体との結合を天然ペプチドと競合することが可能な蛋白質であり、従って、例えば生体試料中のヒトオロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの存在のイムノアッセイに有用である。

【0125】

本発明の核酸、オリゴヌクレオチド（アンチセンスを含む）、これらを含むベクター、形質転換宿主細胞、ポリペプチド及びその組合せ並びに本発明の抗体を使用して化合物を*in vitro*スクリーニングし、化合物が本発明のペプチドの潜在的アゴニスト又はアンタゴニストとして機能するか否かを調べることができる。

20

【0126】

本発明の別の態様によると、適当なパッケージング材料中に少なくとも1種の本発明の核酸を含む好ましくはキット形態の診断システムが提供される。診断用核酸は本明細書に記載する本発明のペプチドをコードする核酸に由来する。1態様では、例えば診断用核酸は配列番号1に由来する。別の態様では、核酸は本明細書に記載するコーディング領域に由来する。本発明の診断システムは本発明のペプチドをコードするゲノムDNA又は転写核酸（例えばmRNA又はcDNA）における本発明のペプチドをコードする核酸の有無を

30

【0127】

利用可能な診断システムは少なくとも1回のアッセイに十分な量の個別にパッケージした化学試薬として少なくとも1種の本発明の核酸、好ましくは2種以上の本発明の核酸を含む。一般にパッケージした試薬の使用説明書も含む。当業者は本明細書に記載するような本発明の方法を実施するのに適した緩衝液及び溶液と共に本発明の核酸プローブ及び/又はプライマーを適切なキット形態に容易に組込むことができる。

【0128】

別の側面では、本明細書に開示する本発明の核酸は外生及び内生化合物の変異原性能を調べるためにネズミチフス菌における微生物フォワード突然変異アッセイで有用である。アッセイは、両酵素の基質である5-フルオロウラシルの毒性作用に対する耐性により選択可能な、ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ又はウラシル輸送体遺伝子の突然変異としてスコアすることができる。この微生物突然変異アッセイは試験化合物の高スループットスクリーニングに適した簡便で迅速な突然変異アッセイを提供することができる。

40

【0129】

現在利用可能な化学療法計画が殆どの種類の癌を治癒できない原因は主に薬剤耐性にある。有意義なことに、化学療法剤代謝拮抗剤である5-フルオロウラシルは主にピリミジン生合成の経路で主要段階を阻害する。簡単に言うと、これらの経路の阻害はDNAの構成ブロックの欠乏に続いてDNA合成の阻害を招き、細胞型に応じて迅速又は最終的にDNA鎖切断を誘導する。5-フルオロウラシルの詳細な作用メカニズムはKinsellら

50

, Br. J. Cancer, 75: 935 - 945 とその引用文献に既に広く記載されている。

【0130】

上記の結果として、本発明は5 - フルオロウラシル等の代謝拮抗剤治療に対する癌細胞の感受性を改善するための方法を提供する。実際に、本発明の1態様は抗癌剤の治療効力の改善方法に関し、本方法は前記抗癌剤治療に対して前記細胞を感作するために十分な治療的に有効な量の配列番号1の核酸分子、好ましくは配列番号2の蛋白質であるウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質又は実質的に類似配列又はその変異体をコードするコーディング領域を抗癌剤治療に反応性の細胞即ち膀胱癌細胞にトランスフェクトする。

10

【0131】

抗癌剤は5 - フルオロウラシル又は配列番号2の蛋白質をコードする本明細書に開示するヌクレオチド配列の作用を受けて代謝産物を介して非毒性物質に変換することが可能な他の任意の物質とすることができる。

【0132】

同様に、本発明の別の態様は5 - フルオロウラシル治療に反応性の病態（例えば膀胱癌等）を緩和するように設計された治療計画の進行の追跡方法を提供し、配列番号2の蛋白質をコードする核酸分子による治療（細胞トランスフェクション）の前後に癌細胞試料をアッセイし、配列番号1、好ましくはウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするコーディング領域の遺伝子産物による5 - フルオロウラシルの活性化の結果である活性化/非毒性代謝産物即ち5 - フルオロウリジン5' - リン酸の濃度を比較する。これを経時的におこなって比較する。

20

【0133】

一般に、代謝産物の生産レベルの経時的増加が治療プロトコールの効力を示す。換言するならば、配列番号1、好ましくは配列番号2の蛋白質をコードする配列番号1のコーディング部分、特にヌクレオチド215 ~ 841又はこれに実質的に類似する配列番号を細胞にトランスフェクトした後に代謝産物濃度が経時的に増加するならば、遺伝子治療法は抗癌剤治療に対して細胞を感作するのに成功し、従って患者に有益であることを示唆している。

【0134】

以上、添付図面を参考に本発明の好適態様について説明したが、当然のことながら本発明はこれらの厳密な態様に制限されず、特許請求の範囲に記載する本発明の範囲又は趣旨から逸脱せずに当業者は種々の変更及び変形を加えることが可能である。

30

【実施例1】

【0135】

ネズミチフス菌からウラシル輸送体蛋白質をコードするDNAとウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質をコードするDNAの単離

まずQiagen DNeasy Tissue Kit（カタログ番号69504）を製造業者により記載されているように使用してネズミチフス菌TA100からゲノムDNAを得た。まずSalmonella UPP遺伝子を単離しようとして既知大腸菌UPRT遺伝子配列（GenBank accession X57104）の両側のPCRプライマーを設計した。これらのプライマーは大腸菌配列と相同であり（フォワード：5' - TTT GTG GCT GCC CCT CAA AGG 3'；リバーズ：5' AA AGC CGA CTC TTA AAG TCG GCT T 3'）、数回試みたが、精製ゲノムDNAからSalmonella UPP遺伝子を増幅できないことがわかった。次に、大腸菌UPP遺伝子をヌクレオチドBLAST検索エンジン（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST）に入力した処、purN及びpurI遺伝子配列（accession U68765.1）についてSalmonella GenBankサブミッションの小部分と88%相同を示した。大腸菌UPPの約50%がこのSalmonella purN及びpurI配列の末端に存在し

40

50

ていた。Salmonella UPP配列の前半を大腸菌UPP配列の後半と整列させることにより、仮想UPPハイブリッドを構築した。次にフォワードプライマーがSalmonella配列(フォワード1:5' TTT GTG GTT GCC AGT CAT CTG AGG 3'; フォワード2:5' ATC CAG GTC AAG CAT ACA TTG TGT TG 3'; フォワード3:5' AGG ATA TCC AGC ACT TGG TTT ACG AC 3')と相同となり、数個のリバースプライマーが大腸菌配列(リバース1:5' CTG GAT CGC GCA GCA GAT CTT TTT T 3'; リバース2:5' ATA AGC CGG AAT TTT CCC TTT 3'; リバース3:5' CCC CGC TTT CTT CAC GAT AAA AGA AA 3')と相同になるようにPCRプライマーを設計した。これらの大腸菌プライマーはSalmonellaでホモポリマー重合をプライミングして十分にPCR増幅できるように設計した。Salmonella TA100から増幅して予想寸法のPCR産物が得られ、その後、配列決定した処、Salmonella UPPヌクレオチド配列であることが判明した。異なる資源から3種のTA100培養物を得、Salmonella UPP遺伝子を増幅し、配列決定してDNA配列を確認した。Salmonella UPP配列は大腸菌配列とヌクレオチドレベルで88%相同、アミノ酸レベルで99%相同を示した。

#### 【0136】

次に、同様のアプローチを使用してSalmonella uraA配列を配列決定した。まず、大腸菌uraA配列をGenBank(accession AE000336 U00096)から得た。驚くべきことに、大腸菌UPPはuraA開始コドンから86ヌクレオチド上流に位置することが分かった。従来決定されたSalmonella UPPヌクレオチド配列では、UPP停止コドンから下流の約800ヌクレオチドが決定され、Salmonella uraA遺伝子の約半分であった。決定されたSalmonella配列(フォワード1:5' AAA CCA CTC ATA ACA AAC ACA CTT AG 3'; フォワード2:5' CGG TGT TCG GCT CCG TAC TGT 3')と相同となるようにSalmonellaフォワードPCRプライマーを設計した後、十分PCR増幅できるような所定相同性レベルの検出を期待してホモポリマー重合を開始するように大腸菌リバースPCRプライマーを設計した(リバース1:5' CCT CAA CCA GGA TTT CAC AAA 3'; リバース2:5' GCC AGT AAA GAG GAG TTA TCC CC 3'; リバース3:5' CGG AAC AAA CCA GGT GCG TTT 3')。PCR増幅は次のように実施した。94 で2分後に、94 で15秒、50 で30秒、72 で1分間を32サイクル行い、最後に72 で3分間伸長した。増幅は成功し、その後、PCR産物を配列決定した処、Salmonella uraAヌクレオチド配列が判明した。Salmonella uraA遺伝子を増幅し、3個の独立培養物から配列決定し、コンセンサスDNA配列を得た。Salmonella uraA配列は大腸菌配列とヌクレオチドレベルで82%相同、アミノ酸レベルで93%相同であった。

#### 【0137】

Salmonella UPP及びuraA核酸の決定後、数個のFU耐性クローンを単離し、ゲノムDNAを配列決定し、FU耐性生化学経路におけるその役割を確認した。ゲノムDNAをFU耐性クローンから単離し、UPP及びuraA遺伝子の両者をPCR増幅し、PCR産物を配列決定した。分析した全クローンはUPP遺伝子に分子欠損があり、いずれも蛋白質のアミノ酸配列が改変しており、UPPが主にSalmonellaにおけるFU耐性に関与していることが確認された。

#### 【0138】

以上、所定の好適態様について本発明を詳細に説明したが、当然のことながら、各種変更及び変形も明細書及び特許請求の範囲に記載する発明の趣旨と範囲に含むものとする。

#### 【0139】

配列の要約

配列番号 1 はネズミチフス菌に由来するウラシル輸送体蛋白質 ( u r a A 蛋白質 ) とウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質 ( U P P / U P R T ) をコードする 2 5 2 0 ヌクレオチドの複合ヌクレオチド配列である。 u r a A のコーディング部分はヌクレオチド 9 2 9 ~ 2 2 1 8 により定義され、 U P R T 遺伝子のコーディング領域はヌクレオチド 2 1 5 ~ 8 4 1 により定義される。

【 0 1 4 0 】

配列番号 2 はウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質の推定アミノ酸配列である。

【 0 1 4 1 】

配列番号 3 はウラシル輸送体蛋白質の推定アミノ酸配である。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 4 2 】

【 図 1 】 いずれもネズミチフス菌に由来する本発明のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼと本発明のウラシル輸送体蛋白質の各々をコードするヌクレオチド配列を含む複合核酸配列 ( D N A ) を示す。

【 図 2 】 ネズミチフス菌に由来し、図 1 に示すヌクレオチド配列によりコードされるウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ蛋白質のアミノ酸配列を示す。

【 図 3 】 ネズミチフス菌に由来し、図 1 に示すヌクレオチド配列によりコードされるウラシル輸送体蛋白質のアミノ酸配列を示す。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 April 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/029407 A2

- (51) International Patent Classification: C12N [US/US]: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US); SKOPEK, Thomas [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/30435
- (22) International Filing Date: 25 September 2002 (25.09.2002) (74) Common Representative: MERCK & CO., INC.; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (25) Filing Language: English (81) Designated States (national): CA, JP, US.
- (26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (30) Priority Data: 60/325,128 26 September 2001 (26.09.2001) US  
Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK & CO., INC. [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).  
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): GLAAB, Warren



WO 03/029407 A2

(54) Title: ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A BACTERIAL URACIL TRANSPORT PROTEIN AND A BACTERIAL URACIL PHOSPHORIBOSYL-TRANSFERASE ENZYME, CELLS TRANSFORMED THEREWITH AND USES THEREOF

(57) Abstract: Disclosed herein are novel polynucleotides encoding one of a uracil transport protein and a uracil phosphoribosyl transferase, each being derived from *Salmonella typhimurium*. The disclosed uracil phosphoribosyl transferase protein is useful in sensitizing human cancer cells to treatment with anti-cancer agents such as 5-Fluorouracil.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

## TITLE OF THE INVENTION

ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A BACTERIAL  
URACIL TRANSPORT PROTEIN AND A BACTERIAL URACIL  
PHOSPHORIBOSYL-TRANSFERASE ENZYME, CELLS TRANSFORMED  
5 THEREWITH AND USES THEREOF

## CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

Not applicable.

## 10 STATEMENT REGARDING FEDERALLY-SPONSORED R&amp;D

Not applicable.

## REFERENCE TO MICROFICHE APPENDIX

Not applicable.

15

## BACKGROUND OF THE INVENTION

This invention relates to newly identified polynucleotides,  
polypeptides encoded by such polynucleotides, the use of such polynucleotides and  
polypeptides, as well as the production of such polynucleotides and polypeptides.  
20 More particularly, the polypeptides of the present invention are of bacterial origin,  
i.e., isolated from *Salmonella typhimurium*. In particular, the invention relates to  
isolated nucleic acid molecules, such as DNA and RNA encoding a uracil transport  
protein and a uracil phosphoribosyltransferase and uses thereof.

In most organisms, the biosynthesis of the purine, pyrimidine, and  
25 pyridine nucleotides, as well as the aromatic amino acids, histidine, and tryptophan,  
involves a group of ten enzymes known as phosphoribosyltransferases (PRTases).  
Each of these enzymes is highly specific for a nitrogenous base, generally aromatic, a  
divalent metal ion and  $\alpha$ -D-5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate (PRPP). In all cases,  
cleavage of the pyrophosphate moiety of PRPP is accompanied by the anomeric  
30 inversion of the ribofuranose ring resulting in a  $\beta$ -N riboside monophosphate. In  
vertebrates, several PRTases exhibit a striking organ specificity while others are  
found in varying levels in most tissues. In all organisms, the PRTases are  
subcellularly confined to the soluble cytoplasmic fractions. In mammals, a single  
enzyme, orotate phosphoribosyltransferase (OPRTase), is responsible for the salvage  
35 of pyrimidine bases. However, in bacteria, yeast, and plant cells a uracil-specific

WO 03/029407

PCT/US02/30435

enzyme is also found - Uracil phosphoribosyltransferase (Uracil phosphoribosyltransferase)

Uracil phosphoribosyltransferase of bacterial origin catalyzes the conversion of uracil and 5-phosphoribosyl  $\alpha$ -1-pyrophosphate (*PRib-PP*) to uridine-5'-monophosphate (UMP) and  $PP_i$ . See Neuhard et al., *Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms* (Munich-Petersen A., ed.) Academic Press, New York, 95-148. Importantly, the bacterial uracil phosphoribosyltransferase, although absent in mammalian cells is nevertheless functionally equivalent to orotate phosphoribosyltransferase or uridine-5'-monophosphate synthase of mammalian cells and has a fundamental importance in the utilization of endogenous uracil formed by degradation of pyrimidine and in the utilization of exogenous uracil, cytosine and uridine for pyrimidine synthesis. This has been demonstrated in *Saccharomyces cerevisiae*, *infra*.

The *UPP* gene from *Escherichia coli* encodes for the enzyme uracil phosphoribosyltransferase and has been isolated by Anderson et al., *Eur J. Biochem*, 204: 51-56 (1992). (Andersen et al., 1992). Mutants of *Escherichia coli* lacking the enzyme uracil phosphoribosyltransferase but with an intact uracil transport system fail to grow on uracil as a pyrimidine source and they excrete uracil into the culture medium. See Malloy A., et al. *FEBS Letts.*, 5: 211-213 (1969). Furthermore they are resistant to 20  $\mu$ M 5-fluorouracil, this being a phenotype which has been used in the selection of *UPP* mutants.

The role of uracil phosphoribosyltransferase in the salvage of endogenously formed uracil and in the utilization of exogenous uracil and cytosine has been demonstrated in several microorganisms including *Escherichia coli*. The pyrimidine salvage enzymes enable the cells to utilize preformed nucleobases and nucleosides either from the growth medium or from degradation products of cellular nucleic acids.

The nucleotide sequence of the gene encoding URPTase from *Saccharomyces cerevisiae* has recently been published. See Kern, et al., *Gene*, 88: 149-157 (1990). This gene encodes a 28.7-kDa protein. The deduced amino acid sequences of the Uracil phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* have been compared and found to share some similarities in discrete areas despite only 32% overall identities.

Natural nucleosides and nucleobases are important metabolites and have a myriad of physiological effects in many organs, systems and species. As a

WO 03/029407

PCT/US02/30435

result of the varied metabolic fates of nucleosides and nucleobases and their key role in nucleic acid metabolism, many analogues of these compounds have been synthesized over the past 40 years with the aim of developing clinically useful drugs. Synthetic nucleosides have important applications in chemotherapy of the leukemias and as antiviral agents, e.g. cytosine arabinoside (araC), acyclovir, azidothymidine, 5-fluorodeoxyuridine and 5-fluorouracil. New analogues of nucleobases and nucleosides acting as antimetabolites and antibiotics continue to be synthesized and evaluated for prospective therapeutic application. Some nucleosides and nucleobases can reverse the effects of particular inhibitors of *de novo* pyrimidine and purine synthesis such as methotrexate, 5-fluorouracil and *N*-phosphonoacetyl-L-aspartate.

Bacterial uracil phosphoribosyltransferase is functionally equivalent to orotate phosphoribosyltransferase or uridine-5'-monophosphate synthase of mammalian cells. These enzymes mediate the conversion of 5-fluorouracil (5-FU)<sup>1</sup>, to 5-fluorouridine 5' monophosphate (5-FUMP). 5-fluorouridine 5' monophosphate is subsequently converted 5-FdUDP and 5-FdUMP in the mammalian *de novo* pyrimidine pathway. Each 5-FdUMP is an irreversible inhibitor of thymidylate synthase (Thy-A) and results in dTTP starvation and subsequent apoptosis. This conversion is one of the requisite pathways to achieve cytotoxic effects of 5-fluorouracil. See Kawamura, K et al., *Cancer Gene Ther.*, 7: 637-43 (2000) whose data corroborate the above conclusions regarding the ability of bacterially derived uracil phosphoribosyltransferase to convert 5-fluorouracil to an active metabolite 5-fluorouridine-5'-monophosphate as does mammalian orotate phosphoribosyltransferase. It has been suggested that the bacterial uracil phosphoribosyltransferase encoding gene that is absent in mammalian cells, when expressed in tumor cells, can effectively enhance the cytotoxic effect attending 5-fluorouracil in the transduced cells.

The data suggest that uracil phosphoribosyltransferase gene therapy with 5-fluorouracil can sensitize the antitumor effect of 5-fluorouracil. Consequently, this approach is a new chemosensitizing strategy for cancer gene therapy and a more feasible modality for the treatment of bladder cancer.

Researchers have also reported that infecting human colon cancer cells with an adenovirus carrying the *Escherichia coli* gene for uracil

<sup>1</sup> 5-FU has been approved by the FDA for the treatment of cancer. However, it is relatively toxic to patients. As such, its dose must be minimized to avoid adverse reactions. See Pinedo, et al., *J. Clin. Oncol.*, 6: 1653-1664 (1988).

WO 03/029407

PCT/US02/30435

phosphoribosyltransferase makes them much more sensitive to treatment with 5-fluorouracil. The data demonstrate that the adenoviral-mediated transfer of the *Escherichia coli* *UPP* gene enhances both the DNA- and RNA-directed activating anabolisms of 5-fluorouracil resulting in sensitizing human colon cancer cells to treatment with 5-FU, thus suggesting that "the UPRT/5-fluorouracil system can be regarded as a new biochemical modulation of fluorouracil therapy for colorectal cancer treatment." See Koyama, F et al., *Eur J Cancer*, 36:2403-2410 (2000).

As well, Sunamura, M. et al., *Nippon Rinsho*, 59: 98-103 (2001) report that the transfection of a bacterial *UPP* gene into pancreatic cells resulted in a significant change in the sensitivity of pancreatic cells against 5-fluorouracil. See also Adachi, Y. et al., *Hum. Gene Ther.*, 11 :77-89 (2000). Similar results have been reported by Inaba M et al., *Jpn J Cancer Res*. 90: 349-354 (1999) in a human stomach cancer cell line. As well, Kanai et al., *Cancer Res*, 58: 1946-51 (1998) report that adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase encoding gene resulted in a marked sensitization of colon, gastric, and pancreatic cancer cell lines. More, 5-fluorouracil treatment of human hepatoma or gastric cancer xenografts in nude mice transduced with a bacterial uracil phosphoribosyltransferase encoding gene resulted in a significant *in vivo* antitumor effect.

Nucleoside and nucleobase transportation is common in a large variety of organisms and has many different physiological effects (Griffith and Jarvis 1996). Physiological nucleosides and nucleobases, and most nucleoside analogues, are hydrophilic, and specialized transport systems are required for their movement into or out of cells. The presence or absence of nucleoside and nucleobase transporters in cells and organisms will have an important impact on the pharmacokinetics, and the disposition and *in vivo* biological activity of physiological occurring compounds as well as nucleoside and nucleobase drugs.

Several references describe that the uracil transport protein is necessary for uracil uptake at low exogenous uracil concentrations, even under conditions with high uracil phosphoribosyltransferase activity. Investigators have suggested that uracil enters the cytoplasm by facilitated diffusion across the cytoplasmic membrane where the uracil transport protein is a membrane-bound facilitator.

It is noteworthy that none of the prior art references describe the isolation of a uracil transport protein or the gene encoding this protein - *uraA* or a

WO 03/029407

PCT/US02/30435

*UPP* gene encoding for uracil phosphoribosyltransferase from *Salmonella typhimurium*.

As such, the availability of the disclosed isolated nucleic acid molecules that will fulfill the above referenced voids in the prior art and will provide detailed information of the encoded proteins' structure and function based on predictions drawn from other sources.

In addition, the availability of the disclosed isolated nucleic acid molecules will allow for improving the therapeutic efficacy of current cancer treatment protocols as well as allowing for the development of therapeutic candidates that are capable of sensitizing cancerous cells to treatment with conventional anti-tumor drugs etc.

As well, the identity of the proteins encoded by the herein disclosed nucleic acid molecules will enable the rapid screening of a large number of compounds to identify those candidates suitable for further, in-depth studies of therapeutic applications.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides isolated nucleic acid molecules derived from *Salmonella typhimurium*, encoded proteins, including mRNAs, DNAs, cDNAs, genomic DNA, as well as antisense analogs thereof. Also provided are biologically active and diagnostically or therapeutically useful fragments thereof, as well as antibodies immunoreactive with the herein disclosed proteins.

Plasmids containing DNA encoding the invention peptides are also provided. Recombinant cells containing the above-described DNA, mRNA or plasmids are also provided herein.

Vector(s) comprising the invention nucleic acid molecules are also provided as are processes for producing the invention peptide(s) by recombinant techniques. A proposed method comprises culturing transformed prokaryotic and/or eukaryotic host cells containing nucleic acid sequences encoding the invention peptides under conditions promoting expression of the invention peptide, followed by subsequent recovery of the polypeptide(s).

In accordance with yet another aspect of the present invention, there are provided single-stranded nucleic acid probes comprising nucleic acid molecules of sufficient length to specifically hybridize to the polynucleotide sequences of the present invention.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

The single-stranded nucleic acid probes and mixtures thereof provided by the present invention will enable one of ordinary skill in the art of genetic engineering to identify and clone similar polynucleotides and encoded polypeptides from any species thereby expanding the usefulness of the sequences of the invention.

5 The probes may be the full length sequence of the nucleic acid molecules encoding the invention peptides or fragments thereof. Typical probes are 12 to 40 nucleotides in length. Generally, the probes are complementary to the coding sequence, although probes to introns are also contemplated.

10 The probes may be synthesized using an oligonucleotide synthesizer such as Applied Biosystems Model 392 DNA/RNA synthesizer, and may be labeled with a detectable marker. Combinations of two or more labeled probes corresponding to different regions of the nucleic acid also may be included in kits to allow for the detection and/or analysis of the gene by hybridization.

15 In another aspect, the invention features assays for detecting the invention peptide.

In another aspect, the present invention provides diagnostic assays for detecting diseases related to mutations in the nucleic acid sequences encoding the invention peptide and for detecting an altered level of the encoded polypeptide.

20 In accordance with yet a further aspect of the present invention, there are provided processes for utilizing the invention peptide or nucleic acid molecules encoding such polypeptides for *in vitro* purposes such as synthesis of DNA and manufacture of DNA vectors.

Also provided are methods for identifying cells that express the invention peptide.

25 The availability of the invention polypeptides-specific antibodies makes possible the application of the technique of immunohistochemistry to monitor the distribution and expression density of the invention peptide (e.g., in normal vs diseased brain tissue). Such antibodies could also be employed for diagnostic and therapeutic applications. This antibody is preferably capable of neutralizing a biological activity of uracil transport protein or the Uracil phosphoribosyltransferase.

30 The ability to test either or both of the invention peptides with a variety of potential agonists or antagonists provides additional information with respect to the function and activity of either or both of the invention peptides and should lead to the identification and design of compounds that are capable of very specific interaction with human counterparts of the invention peptides, if any.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

Further in relation to drug development and therapeutic treatment of various disease states, the availability of DNAs encoding the invention peptides enables identification of any alterations in such genes (e.g., mutations) which may correlate with the occurrence of certain functions heretofore unknown.

5 As noted, *supra*, 5-fluorouracil has been approved for the treatment of cancer. However, a chief drawback attending its use is its relative toxicity. In accordance with still another embodiment of the invention, there are provided processes of administering the invention nucleic acid encoding uracil phosphoribosyltransferase to host cells responsive to treatment with 5-fluorouracil in  
10 an amount sufficient to improve the therapeutic efficacy of the 5-fluorouracil. This effect is achieved by the ability of the Uracil phosphoribosyltransferase to convert the 5-fluorouracil to its non-toxic metabolite 5-fluorouridine 5' monophosphate. Thus, it is believed that the novel uracil phosphoribosyltransferase encoding gene of the invention will pave the path for a more feasible modality for the treatment of human  
15 cancers.

The present invention is described in the following Experimental Details Section, which is set forth to aid in an understanding of the invention, and should not be construed to limit in any way the invention as defined in the claims which follow thereafter. Other features and advantages of the invention will be  
20 apparent to those of skill in the art upon further study of the specification and claims.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 presents the combined nucleic acid sequence (DNA) that contains the nucleotides encoding each of the uracil phosphoribosyl transferase of the invention and the uracil transport protein of the invention, both being derived from  
25 *Salmonella typhimurium*.

FIG. 2 presents the amino acid sequence of Uracil Phosphoribosyl Transferase Protein derived from *Salmonella typhimurium* and encoded by the nucleotide sequence contained in Figure 1.

30 FIG. 3 presents the amino acid sequence of Uracil Transport Protein derived from *Salmonella typhimurium* and encoded by the nucleotide sequence contained in Figure.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a host cell" includes a plurality of such host cells, reference to the "antibody" is a reference to one or more antibodies and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described.

All publications mentioned herein are incorporated herein by reference for the purpose of describing and disclosing the methodologies, vectors etc which are reported in the publications that might be used in connection with the invention.

Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

In the description that follows, a number of terms used in the field of recombinant DNA technology are extensively utilized. In order to provide a clearer and consistent understanding of the specification and claims, including the scope to be given such terms, the following definitions are provided.

The present invention provides isolated nucleic acid molecules that encode a novel uracil transport protein and a uracil phosphoribosyltransferase, each derived from *Salmonella typhimurium*. Specifically, isolated DNA encoding the invention peptides are described as are recombinant messenger RNA (mRNA).

Splice variants of the isolated DNA's are also described.

"Invention nucleic acid(s)" and "nucleic acid molecules" are used interchangeably and refer to the nucleic acid molecules of the invention that encode the invention peptides.

"Polypeptide" or "peptide" or "protein" refers to a polymer of amino acid residues and to variants and synthetic analogs of the same and are used interchangeably herein. Thus, these terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residues is a synthetic non-naturally occurring amino acid, such as a chemical analog of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers. The invention peptide is the preferred polypeptide.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

The term "amino acid sequence" as used herein refers to an oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein sequence, and fragments or portions thereof, and to naturally occurring or synthetic molecules.

5 The term "invention peptide" refers to the polypeptides encoded by the invention nucleic acid molecules. Variants and fragments are also included.

As used herein, "uracil phosphoribosyltransferase gene" or "*UPP*" refers to a uracil phosphoribosyltransferase gene derived from *Salmonella typhimurium* that is encoded by a nucleic acid molecule of SEQ ID NO. 1. It also includes nucleic acid molecule that hybridizes under high stringency conditions to the  
10 nucleotide sequences disclosed herein. Such nucleic acid molecule can be characterized in a number of ways, for example - the DNA may encode the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO. 2, or the DNA may include the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO. 1. The coding sequence for the *UPP* is from nucleotides 929 – 2218 as contained in Figure 1 that encode the protein of SEQ ID  
15 NO: 2 (429 amino acids encoded by 1290 base pairs).

Typically, unless the *UPP* gene arises as a splice variant, the disclosed *UPP* DNA will share substantial sequence homology (i.e., greater than about 90%), with the *UPP* gene described herein. DNA or RNA encoding a splice variant may share less than 90% overall sequence homology with the DNA or RNA provided  
20 herein, but such a splice variant would include regions of nearly 100% homology to the disclosed DNAs.

As used herein, "uracil transport gene" or "*uraA*" refers to a uracil transport protein encoding gene derived from *Salmonella typhimurium* that is encoded by a nucleic acid molecule of SEQ ID NO. 1 or one that hybridizes under high  
25 stringency conditions to the nucleotide sequence of SEQ ID NO.1. Such nucleic acid molecule can be characterized in a number of ways, for example - the DNA may encode the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO. 3, or the DNA may include the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO. 1. Typically, the start and stop codons are listed in Figure 1. The arbitrary numbers for the entire sequence are  
30 nucleotides 1 – 2520, the coding sequence for the uracil transport protein of SEQ ID NO:2 being defined by nucleotides 215 to 841, for a total of 627 base pairs that encode for a 208 amino acid protein.

The nucleic acid molecules described herein are useful for producing invention peptides when such nucleic acids are incorporated into a variety of protein  
35 expression systems known to those of skill in the art. In addition, such nucleic acid

WO 03/029407

PCT/US02/30435

molecules or fragments thereof can be labeled with a readily detectable substituent and used as hybridization probes for assaying for the presence and/or amount of a *UPP* or *uraA* encoding gene or mRNA transcript in a given sample.

5 The nucleic acid molecules described herein, and fragments thereof, are also useful as primers and/or templates in a PCR reaction for amplifying genes encoding the invention peptides described herein.

10 A "gene" refers to a nucleic acid molecule whose nucleotide sequence codes for a polypeptide molecule. Genes may be uninterrupted sequences of nucleotides or they may include such intervening segments as introns, promoter regions, splicing sites and repetitive sequences. A gene can be either RNA or DNA. A preferred gene is one that encodes the invention peptide.

15 The term "nucleic acid" or "nucleic acid molecule" is intended for ribonucleic acid (RNA) or deoxyribonucleic acid (DNA), probes, oligonucleotides, fragment or portions thereof, and primers. DNA can be either complementary DNA (cDNA) or genomic DNA, e.g. a gene encoding the invention peptide.

20 Unless otherwise indicated, a nucleotide defines a monomeric unit of DNA or RNA consisting of a sugar moiety (pentose), a phosphate group, and a nitrogenous heterocyclic base. The base is linked to the sugar moiety via the glycosidic carbon (1' carbon of the pentose) and that combination of base and sugar is a nucleoside. When the nucleoside contains a phosphate group bonded to the 3' or 5' position of the pentose, it is referred to as a nucleotide. A sequence of operatively linked nucleotides is typically referred to herein as a "base sequence" or "nucleotide sequence", and their grammatical equivalents, and is represented herein by a formula whose left to right orientation is in the conventional direction of 5'-terminus to 3'-terminus.

25 Each "nucleotide sequence" set forth herein is presented as a sequence of deoxyribonucleotides (abbreviated A, G, C and T). However, by "nucleotide sequence" of a nucleic acid molecule is intended, for a DNA molecule or polynucleotide, a sequence of deoxyribonucleotides, and for an RNA molecule or polynucleotide, the corresponding sequence of ribonucleotides (A, G, C and U), where each thymidine deoxyribonucleotide (T) in the specified deoxyribonucleotide sequence is replaced by the ribonucleotide uridine (U). For instance, reference to an RNA molecule having the sequence of SEQ ID NO. 1 set forth using deoxyribonucleotide abbreviations is intended to indicate an RNA molecule having a  
35 sequence in which each deoxyribonucleotide A, G or C of SEQ ID NO. 1 has been

WO 03/029407

PCT/US02/30435

replaced by the corresponding ribonucleotide A, G or C, and each deoxyribonucleotide T has been replaced by a ribonucleotide U.

Use of the terms "isolated" and/or "purified" in the present specification and claims as a modifier of DNA, RNA, polypeptides or proteins means that the DNA, RNA, polypeptides or proteins so designated have been produced in  
5 such form by the hand of man, and thus are separated from their native in vivo cellular environment. As a result of this human intervention, the recombinant DNAs, RNAs, polypeptides and proteins of the invention are useful in ways described herein that the DNAs, RNAs, polypeptides or proteins as they naturally occur are not.

10 Similarly, as used herein, "recombinant" as a modifier of DNA, RNA, polypeptides or proteins means that the DNA, RNA, polypeptides or proteins so designated have been prepared by the efforts of human beings, e.g., by cloning, recombinant expression, and the like. Thus as used herein, recombinant proteins, for example, refers to proteins produced by a recombinant host, expressing DNAs which  
15 have been added to that host through the efforts of human beings.

In defining nucleic acid sequences, all subject nucleic acid sequences capable of encoding substantially similar amino acid sequences are considered substantially similar or are considered as comprising substantially identical sequences of nucleotides to the reference nucleic acid sequences disclosed herein.

20 In practice, the term "substantially the same sequence" means that DNA or RNA encoding two proteins hybridize under moderately stringent conditions and encode proteins that have the same sequence of amino acids or have changes in sequence that do not alter their structure or function.

Nucleotide sequence "similarity" is a measure of the degree to which  
25 two polynucleotide sequences have identical nucleotide bases at corresponding positions in their sequence when optimally aligned (with appropriate nucleotide insertions or deletions). Sequence similarity or percent similarity can be determined, for example, by comparing sequence information using sequence analysis software such as the GAP computer program, version 6.0, available from the University of  
30 Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). The GAP program utilizes the alignment method of Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), as revised by Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1981).

As used herein, "substantially identical sequences of nucleotides" share at least about 90% identity, and substantially identical amino acid sequences  
35 share more than 95% amino acid identity. It is recognized, however, that proteins

WO 03/029407

PCT/US02/30435

(and DNA or mRNA encoding such proteins) containing less than the above-described level of homology arising as splice variants or that are modified by conservative amino acid substitutions (or substitution of degenerate codons) are contemplated to be within the scope of the present invention.

5 The present invention also encompasses nucleic acids which differ from the nucleic acids shown in SEQ ID NOs:1, but which have the same phenotype. Phenotypically similar nucleic acids are also referred to as "functionally equivalent nucleic acids".

10 As used herein, the phrase "functionally equivalent nucleic acids" encompasses nucleic acids characterized by slight and non-consequential sequence variations that will function in substantially the same manner to produce the same protein product(s) as the nucleic acids disclosed herein.

15 Functionally equivalent sequences will function in substantially the same manner to produce substantially the same compositions as the nucleic acid and amino acid compositions disclosed and claimed herein. In particular, functionally equivalent DNAs encode proteins that are the same as those disclosed herein or that have conservative amino acid variations, such as substitution of a non-polar residue for another non-polar residue or a charged residue for a similarly charged residue. These changes include those recognized by those of skill in the art as those that do not  
20 substantially alter the tertiary structure of the protein.

In particular, functionally equivalent nucleic acids encode polypeptides that are the same as those disclosed herein or that have conservative amino acid variations, or that are substantially similar to one having the amino acid sequence as set forth in SEQ. ID. NO:2  
25 or 3.

For example, conservative variations include substitution of a non-polar residue with another non-polar residue, or substitution of a charged residue with a similarly charged residue. These variations include those recognized by skilled artisans as those that do not substantially alter the tertiary structure of the protein.

30 Further provided are nucleic acids encoding the invention polypeptides that, by virtue of the degeneracy of the genetic code, do not necessarily hybridize to the invention nucleic acids under specified hybridization conditions. Preferred nucleic acids encoding the invention polypeptide are comprised of nucleotides that encode substantially the same amino acid sequence set forth in SEQ ID NO.2 or 3.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

Thus, an exemplary nucleic acid encoding an invention polypeptide may be selected from:

- (a) DNA encoding the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO.2 or 3.
- 5 (b) DNA that hybridizes to the DNA of (a) under moderately stringent conditions, wherein said DNA encodes biologically active uracil transport protein of the invention or a uracil phosphoribosyltransferase enzyme of the invention; or

(c) DNA degenerate with respect to either (a) or (b) above.

10 As used herein, the term "degenerate" refers to codons that differ in at least one nucleotide from that of SEQ ID NO:1, but encode the same amino acids as that set forth in SEQ ID NOs. 2 or 3. For example, codons specified by the triplets "UCU", "UCC", "UCA", and "UCG" are degenerate with respect to each other since all four of these codons encode the amino acid serine.

15 As used herein, reference to the nucleotide sequence of SEQ ID NO; 1 generally refers to the coding sequences encoding each or either of the invention peptides.

A "fragment" of a nucleic acid molecule or nucleotide sequence is a portion of the nucleic acid that is less than full-length and comprises at least a minimum length capable of hybridizing specifically with the nucleotide sequence of SEQ ID NO. 1 under stringent hybridization conditions, preferably to either or both of the coding sequences disclosed therein. The length of such a fragment is preferably 15-17 nucleotides or more.

20

A "variant" nucleic acid molecule or DNA molecule refers to DNA molecules containing minor changes in the native nucleotide sequence encoding the invention polypeptide(s) (coding portion), i.e., changes in which one or more nucleotides of a native sequence is deleted, added, and/or substituted, preferably while substantially maintaining the biological activity of the native nucleic acid molecule, it being understood that such changes are in either or both of the coding region specified in SEQ ID NO:1. Variant DNA molecules can be produced, for example, by standard DNA mutagenesis techniques or by chemically synthesizing the variant DNA molecule or a portion thereof. Generally, differences are limited so that the nucleotide sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical.

30

WO 03/029407

PCT/US02/30435

Changes in the nucleotide sequence of a variant polynucleotide may be silent. That is, they may not alter the amino acids encoded by the polynucleotide. Where alterations are limited to silent changes of this type, a variant will encode a polypeptide with the same amino acid sequence as the reference.

5 Alternatively, the changes may be "conservative." Conservative variants are changes in the nucleotide sequence (either or both of the coding region or sequence/protein-coding region) that may alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Such nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the  
10 polypeptide encoded by the reference sequence. Thus, conservative variants are those changes in the protein-coding region of the gene that result in conservative change in one or more amino acid residues of the polypeptide encoded by the nucleic acid sequence, i.e. amino acid substitution.

An "insertion" or "addition", as used herein, refers to a change in an  
15 amino acid or nucleotide sequence resulting in the addition of one or more amino acid or nucleotide residues, respectively, as compared to the naturally occurring molecule.

A "substitution", as used herein, refers to the replacement of one or more amino acids or nucleotides by different amino acids or nucleotides, respectively.

Preferably, a variant form of the preferred nucleic acid molecule has at  
20 least 70%, more preferably at least 80%, and most preferably at least 90% nucleotide sequence similarity with the native gene encoding the invention peptide.

"Primer" or "nucleic acid polymerase primer(s)" refers to an oligonucleotide, whether natural or synthetic, capable of acting as a point of initiation of DNA synthesis under conditions in which synthesis of a primer extension product  
25 complementary to a nucleic acid strand is initiated, i.e., in the presence of four different nucleotide triphosphates and an agent for polymerization (i.e., DNA polymerase or reverse transcriptase) in an appropriate buffer and at a suitable temperature. The exact length of a primer will depend on many factors, but typically ranges from 15 to 25 nucleotides. Short primer molecules generally require cooler  
30 temperatures to form sufficiently stable hybrid complexes with the template. A primer need not reflect the exact sequence of the template, but must be sufficiently complementary to hybridize with a template. A primer can be labeled, if desired.

"Identity" or "homology" with respect to the invention peptide is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that  
35 are identical with the residues in one of SEQ ID NOs. 2 or 4, after aligning the

WO 03/029407

PCT/US02/30435

sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent homology, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. No N- nor C-terminal extensions, deletions nor insertions shall be construed as reducing identity or homology.

5 As used herein, a "variant" of the invention peptide refers to a polypeptide having an amino acid sequence with one or more amino acid substitutions, insertions, and/or deletions compared to the sequence of the invention peptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference (invention peptide) and the variant are closely similar overall, and in many regions,  
10 identical. Such variants are generally biologically active and necessarily have less than 100% sequence identity with the polypeptide of interest.

In a preferred embodiment, the biologically active variant has an amino acid sequence sharing at least about 70% amino acid sequence identity with the invention peptide, preferably at least about 75%, more preferably at least about  
15 80%, still more preferably at least about 85%, even more preferably at least about 90%, and most preferably at least about 95%. Amino-acid substitutions are preferably substitutions of single amino-acid residues.

A "fragment" of the invention peptide (reference protein) is meant to refer to a protein molecule which contains a portion of the complete amino acid  
20 sequence of the wild type or reference protein.

Complementary DNA clones encoding the invention peptide may be prepared from the DNA provided. The nucleic acid clones provided herein may be used to isolate genomic clones encoding the invention peptide and to isolate any splice variants by screening libraries prepared from different sources.

25 Alternatively, the library may be screened with a suitable probe. Thus, one means of isolating a nucleic acid encoding the invention peptide is to probe a bacterial genomic library with a natural or artificially designed nucleic acid probe using methods well known in the art. Nucleic acid probes derived from the invention peptide encoding gene(s) are particularly useful for this purpose. Examples of  
30 nucleic acids are RNA, cDNA, or isolated genomic DNA encoding the invention peptides. Such nucleic acids may include, but are not limited to, nucleic acids having substantially the same nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO.1, preferably the coding regions contained therein or one encoding the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO.2 or 3.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

Nucleic acid amplification techniques, which are well known in the art, can be used to locate splice variants of the invention peptide. This is accomplished by employing oligonucleotides based on DNA sequences surrounding divergent sequence(s) as primers for amplifying human RNA or genomic DNA. Size and sequence determinations of the amplification products can reveal the existence of splice variants. Furthermore, isolation of human genomic DNA sequences by hybridization can yield DNA containing multiple exons, separated by introns that correspond to different splice variants of transcripts encoding the invention peptide. Techniques for nucleic-acid manipulation are described generally in, for example, Sambrook et al. (1989) and Ausubel et al. (1987, with periodic updates). Methods for chemical synthesis of nucleic acids are discussed, for example, in Beaucage and Carruthers, *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, 1981, and Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185, 1981. Chemical synthesis of nucleic acids can be performed, for example, on commercial automated oligonucleotide synthesizers.

As used herein, a "splice variant" refers to variant invention peptide(s)-encoding nucleic acid(s) produced by differential processing of primary transcript(s) of genomic DNA, resulting in the production of more than one type of mRNA. cDNA derived from differentially processed primary transcript will encode the invention peptide(s) that have regions of complete amino acid identity and regions having different amino acid sequences. Thus, the same genomic sequence can lead to the production of multiple, related mRNAs and proteins. Both the resulting mRNAs and proteins are referred to herein as "splice variants".

As used herein, a nucleic acid "probe" is single-stranded DNA or RNA, or analog thereof, that has a sequence of nucleotides that includes at least 14, preferably at least 20, more preferably at least 50, contiguous bases that are the same as or the complement of any 14 or more contiguous bases set forth in any of SEQ ID NO.1, preferably the coding regions contained therein. In addition, the entire cDNA encoding region of the invention polypeptides, or the entire sequence corresponding to SEQ ID NO.1 may be used as a probe.

Presently preferred probe-based screening conditions comprise a temperature of about 37°C, a formamide concentration of about 20%, and a salt concentration of about 5X standard saline citrate (SSC; 20X SSC contains 3M sodium chloride, 0.3M sodium citrate, pH 7.0). Such conditions will allow the identification of sequences which have a substantial degree of similarity with the probe sequence, without requiring perfect homology.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

Preferably, hybridization conditions will be selected which allow the identification of sequences having at least 70% homology with the probe, while discriminating against sequences which have a lower degree of homology with the probe. As a result, nucleic acids having substantially the same nucleotide sequence as the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO.1 are obtained.

5 After screening the library, positive clones are identified by detecting a hybridization signal; the identified clones are characterized by restriction enzyme mapping and/or DNA sequence analysis, and then examined, by comparison with the sequences set forth herein, to ascertain whether they include DNA encoding the entire  
10 invention peptide. If the selected clones are incomplete, they may be used to rescreen the same or a different library to obtain overlapping clones. If desired, the library can be rescreened with positive clones until overlapping clones that encode an entire invention peptide are obtained. If the library is a cDNA library, then the overlapping clones will include an open reading frame. If the library is genomic, then the  
15 overlapping clones may include exons and introns. In both instances, complete clones may be identified by comparison with the DNA and encoded proteins provided herein.

Thus, the nucleic acid probes are useful for various applications. On the one hand, they may be used as PCR primers for amplification of nucleic acid  
20 molecules according to the invention. On the other hand, they can be useful tools for the detection of the expression of molecules according to the invention in target tissues, for example, by in-situ hybridization or Northern-Blot hybridization.

The probes of the invention may be labeled by methods well-known in the art, as described hereinafter, and used in various diagnostic kits.

25 A "label" refers to a compound or composition that facilitates detection of a compound or composition with which it is specifically associated, which can include conferring a property that makes the labeled compound or composition able to bind specifically to another molecule. "Labeled" refers to a compound or composition that is specifically associated, typically by covalent  
30 bonding but non-covalent interactions can also be employed to label a compound or composition, with a label. Thus, a label may be detectable directly, i.e., the label can be a radioisotope (e.g.,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ) or a fluorescent or phosphorescent molecule (e.g., FITC, rhodamine, lanthanide phosphors), or indirectly, i.e., by enzymatic activity (e.g., horseradish peroxidase, beta-galactosidase,  
35 luciferase, alkaline phosphatase) or by its ability to bind to another molecule (e.g.,

WO 03/029407

PCT/US02/30435

streptavidin, biotin, an antigen, epitope, or antibody). Incorporation of a label can be achieved by a variety of means, i.e., by use of radiolabeled or biotinylated nucleotides in polymerase-mediated primer extension reactions, epitope-tagging via recombinant expression or synthetic means, or binding to an antibody.

5 Labels can be attached directly or via spacer arms of various lengths, i.e., to reduce steric hindrance. Any of a wide variety of labeled reagents can be used for purposes of the present invention. For instance, one can use one or more labeled nucleoside triphosphates, primers, linkers, or probes. A description of immunofluorescent analytic techniques is found in DeLuca, "Immunofluorescence  
10 Analysis", in *Antibody As a Tool*, Marchalonis et al., eds., John Wiley & Sons, Ltd., pp. 189-231 (1982), which is incorporated herein by reference.

The term label can also refer to a "tag", which can bind specifically to a labeled molecule. For instance, one can use biotin as a tag and then use avidinylated or streptavidinylated horseradish peroxidase (HRP) to bind to the tag,  
15 and then use a chromogenic substrate (e.g., tetramethylbenzamine) to detect the presence of HRP. In a similar fashion, the tag can be an epitope or antigen (e.g., digoxigenin), and an enzymatically, fluorescently, or radioactively labeled antibody can be used to bind to the tag.

In one embodiment of the present invention, cDNAs encoding the  
20 invention peptides disclosed herein include substantially the same nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO.1. Preferred cDNA molecules encoding the invention proteins include the same nucleotide sequence as that set forth in SEQ ID NO.1, preferably the coding regions described therein.

Another embodiment of the invention contemplates nucleic acid(s)  
25 having substantially the same nucleotide sequence as the reference nucleotide sequence that encodes substantially the same amino acid sequence as that set forth in SEQ ID NO. 2 or 3.

Hybridization refers to the binding of complementary strands of  
30 nucleic acid (i.e., sense:antisense strands or probe:target-DNA) to each other through hydrogen bonds, similar to the bonds that naturally occur in chromosomal DNA. Stringency levels used to hybridize a given probe with target-DNA can be readily varied by those of skill in the art.

The phrase "stringent hybridization" is used herein to refer to conditions under which polynucleic acid hybrids are stable. As known to those of

WO 03/029407

PCT/US02/30435

skill in the art, the stability of hybrids is reflected in the melting temperature ( $T_m$ ) of the hybrids.  $T_m$  can be approximated by the formula:

$$81.5^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/l,$$

5 where  $l$  is the length of the hybrids in nucleotides.  $T_m$  decreases approximately  $1^\circ$ - $1.5^\circ$  C with every 1% decrease in sequence homology. In general, the stability of a hybrid is a function of sodium ion concentration and temperature. Typically, the hybridization reaction is performed under conditions of lower stringency, followed by  
10 washes of varying, but higher, stringency. Reference to hybridization stringency relates to such washing conditions.

As used herein, the phrase "moderately stringent hybridization" refers to conditions that permit target-DNA to bind a complementary nucleic acid that has about 60% identity, preferably about 75% identity, more preferably about 85%  
15 identity to the target DNA; with greater than about 90% identity to target-DNA being especially preferred. Preferably, moderately stringent conditions are conditions equivalent to hybridization in 50% formamide, 5X Denhart's solution, 5X SSPE, 0.2% SDS at  $42^\circ\text{C}$ ., followed by washing in 0.2X SSPE, 0.2% SDS, at  $65^\circ\text{C}$ ..

The phrase "high stringency hybridization" refers to conditions that  
20 permit hybridization of only those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 0.018M NaCl at  $65^\circ\text{C}$  (i.e., if a hybrid is not stable in 0.018M NaCl at  $65^\circ\text{C}$ , it will not be stable under high stringency conditions, as contemplated herein). High stringency conditions can be provided, for example, by hybridization in 50% formamide, 5X Denhart's solution, 5X SSPE, 0.2% SDS at  $42^\circ\text{C}$ ., followed by  
25 washing in 0.1X SSPE, and 0.1% SDS at  $65^\circ\text{C}$ ..

The phrase "low stringency hybridization" refers to conditions equivalent to hybridization in 10% formamide, 5X Denhart's solution, 6X SSPE, 0.2% SDS at  $42^\circ\text{C}$ ., followed by washing in 1X SSPE, 0.2% SDS, at  $50^\circ\text{C}$ ..

Denhardt's solution and SSPE (see, e.g., Sambrook, Fritsch, and  
30 Maniatis, in: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) are well known to those of skill in the art as are other suitable hybridization buffers. For example, SSPE is pH 7.4 phosphate-buffered 0.18M NaCl. SSPE can be prepared, for example, as a 20X stock solution by dissolving 175.3 g of NaCl, 27.6 g of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and 7.4 g EDTA in 800 ml of water,  
35 adjusting the pH to 7.4, and then adding water to 1 liter. Denhardt's solution (see,

WO 03/029407

PCT/US02/30435

Denhardt (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23:641) can be prepared, for example, as a 50X stock solution by mixing 5 g Ficoll (Type 400, Pharmacia LKB Biotechnology, INC., Piscataway N.J.), 5 g of polyvinylpyrrolidone, and 5 g bovine serum albumin (Fraction V; Sigma, St. Louis Mo.), and then adding water to 500 ml and filtering to remove particulate matter.

5 Preferred nucleic acids encoding the invention polypeptide(s) hybridize under moderately stringent, preferably high stringency, conditions to substantially the entire sequence, or substantial portions (i.e., typically at least 15-30 nucleotides) of the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO.1.

10 The invention nucleic acids can be produced by a variety of methods well-known in the art, e.g., the methods described herein, employing PCR amplification using oligonucleotide primers from various regions of SEQ ID NO.1 and the like.

15 As used herein, "expression" refers to the process by which polynucleic acids are transcribed into mRNA and translated into peptides, polypeptides, or proteins. If the polynucleic acid is derived from genomic DNA, expression may, if an appropriate eukaryotic host cell or organism is selected, include splicing of the mRNA.

20 An example of the means for preparing the invention polypeptide(s) is to express nucleic acids encoding the invention polypeptide in a suitable host cell, such as a bacterial cell, using methods well known in the art, and recovering the expressed polypeptide, again using well-known methods. Invention polypeptides can be isolated directly from cells that have been transformed with expression vectors comprising nucleic acid encoding the invention peptides or fragments/portions thereof.

25 Incorporation of cloned DNA into a suitable expression vector, transfection of eukaryotic cells with a plasmid vector or a combination of plasmid vectors, each encoding one or more distinct genes or with linear DNA, and selection of transfected cells are well known in the art (see, e.g., Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Suitable means for introducing (transducing) expression vectors containing invention nucleic acid constructs into host cells to produce transduced recombinant cells (i.e., cells containing recombinant heterologous nucleic acid) are well-known in the art (see, for review, Friedmann, 1989, *Science*, 244:1275-1281;

WO 03/029407

PCT/US02/30435

Mulligan, 1993, Science, 260:926-932, each of which are incorporated herein by reference in their entirety).

5 Exemplary methods of transduction include, e.g., infection employing viral vectors (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,405,712 and 4,650,764), calcium phosphate transfection (U.S. Pat. Nos. 4,399,216 and 4,634,665), dextran sulfate transfection, electroporation, lipofection (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,394,448 and 4,619,794), cytofection, particle bead bombardment, and the like. The heterologous nucleic acid can optionally include sequences which allow for its extrachromosomal (i.e., episomal) maintenance, or the heterologous nucleic acid can be donor nucleic acid that integrates into the genome of the host. Recombinant cells can then be cultured under conditions whereby the invention peptide(s) encoded by the DNA is (are) expressed. Preferred cells include mammalian cells (e.g., HEK 293, CHO and Ltk-cells), yeast cells (e.g., methylotrophic yeast cells, such as *Pichia pastoris*), bacterial cells (e.g., *Escherichia coli*), and the like.

10 Suitable expression vectors are well-known in the art, and include vectors capable of expressing DNA operatively linked to a regulatory sequence, such as a promoter region that is capable of regulating expression of such DNA. Thus, an expression vector refers to a recombinant DNA or RNA construct, such as a plasmid, a phage, recombinant virus or other vector that, upon introduction into an appropriate host cell, results in expression of the inserted DNA. Appropriate expression vectors are well known to those of skill in the art and include those that are replicable in eukaryotic cells and/or prokaryotic cells and those that remain episomal or those which integrate into the host cell genome.

15 Exemplary eukaryotic and/or prokaryotic expression vectors include eukaryotic cassettes, such as the pSV-2 gpt system (Mulligan et al., 1979, Nature, 277:108-114); the Okayama-Berg system (Mol. Cell Biol., 2:161-170), the expression cloning vector described by Genetics Institute (1985, Science, 228:810-815), and a variety of commercially available plasmid vectors such as pUC or pBC. Each of these plasmid vectors are capable of promoting expression of the invention protein of interest.

20 As used herein, "heterologous or foreign DNA and/or RNA" are used interchangeably and refer to DNA or RNA that does not occur naturally as part of the genome of the cell in which it is present or to DNA or RNA which is found in a location or locations in the genome that differ from that in which it occurs in nature. Typically, heterologous or foreign DNA and RNA refers to DNA or RNA that is not

WO 03/029407

PCT/US02/30435

endogenous to the host cell and has been artificially introduced into the cell.

Examples of heterologous DNA include DNA that encodes the invention peptides.

5 In preferred embodiments, DNA is ligated into a vector, and introduced into suitable host cells to produce transformed cell lines that express the invention peptide, or a fragment thereof. The resulting cell lines can then be produced in quantity for reproducible quantitative analysis of the effects of drugs on receptor function.

10 In other embodiments, mRNA may be produced by *in vitro* transcription of DNA encoding the invention peptide. This mRNA can then be injected into *Xenopus* oocytes where the RNA directs the synthesis of the invention peptide. Alternatively, the invention-encoding DNA can be directly injected into oocytes for expression of a functional invention peptide. The transfected mammalian cells or injected oocytes may then be used in the methods of drug screening provided herein.

15 Eukaryotic cells in which DNA or RNA may be introduced include any cells that are transfectable by such DNA or RNA or into which such DNA or RNA may be injected. Preferred cells are those that can be transiently or stably transfected and also express the DNA and RNA. Presently most preferred cells are those that can express recombinant or heterologous uracil transport proteins or uracil phosphoribosyltransferase enzyme(s) encoded by the heterologous DNA. Such cells  
20 may be identified empirically or selected from among those known to be readily transfected or injected.

25 Exemplary cells for introducing DNA include cells of mammalian origin (e.g., COS cells, mouse L cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, human embryonic kidney cells, African green monkey cells and other such cells known to those of skill in the art), amphibian cells (e.g., *Xenopus laevis* oocytes), yeast cells (e.g., *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), and the like. Exemplary cells for expressing injected RNA transcripts include *Xenopus laevis* oocytes. Cells that are preferred for transfection of DNA are known to those of skill in the art or may be  
30 empirically identified, and include HEK 293; Ltk<sup>-</sup> cells; COS-7 cells; and DG44 cells (dhfr<sup>-</sup> CHO cells; see, e.g., Urlaub et al. (1986) *Cell. Molec. Genet.* 12:555). Other mammalian expression systems, including commercially available systems and other such systems known to those of skill in the art, for expression of DNA encoding the invention peptide provided herein are presently preferred.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

Nucleic acid molecules may be stably incorporated into cells or may be transiently introduced using methods known in the art. Stably transfected mammalian cells may be prepared by transfecting cells with an expression vector having a selectable marker gene (such as, for example, the gene for thymidine kinase, dihydrofolate reductase, neomycin resistance, and the like), and growing the transfected cells under conditions selective for cells expressing the marker gene. To produce such cells, the cells should be transfected with a sufficient concentration of invention peptide-encoding nucleic acids to form the invention peptide(s) that are encoded by heterologous DNA. The precise amounts and ratios of DNA encoding the invention peptides may be empirically determined and optimized for a particular cells and assay conditions.

Heterologous DNA may be maintained in the cell as an episomal element or may be integrated into chromosomal DNA of the cell. The resulting recombinant cells may then be cultured or subcultured from such a culture or a subculture thereof. Methods for transfection, injection and culturing recombinant cells are known to the skilled artisan. Similarly, the invention peptide(s) may be purified using protein purification methods known to those of skill in the art. For example, antibodies or other ligands that specifically bind to the invention peptides may be used for affinity purification of the invention peptides.

In accordance with the above, host cells are transfected with DNA encoding the invention peptide. Using methods such as northern blot or slot blot analysis, transfected cells that contain invention peptide encoding DNA or RNA can be selected. Transfected cells can also be analyzed to identify those that express the invention peptide. As regards the *uraA* encoded protein, analysis can be carried out, for example, by measuring the ability of cells to bind its binding partner, i.e., antibodies immunoreactive with a bacterial uracil transport protein.

As used herein, activity of the invention peptides refers to any activity characteristic of a uracil transport protein or a uracil phosphoribosyltransferase derived from *Salmonella typhimurium*. Such activity may be measured by any method known to those of skill in the art, such as, for example, assays that measure radio-labeled uracil uptake (uracil transport activity) and the direct measurement of uracil and uridine by gas chromatography/mass spectrometry (uracil conversion to uridine by uracil phosphoribosyltransferase).

The invention peptide, biologically active fragments, and functional equivalents thereof can also be produced by chemical synthesis. For example,

WO 03/029407

PCT/US02/30435

synthetic polypeptides can be produced using Applied Biosystems, Inc. Model 430A or 431A automatic peptide synthesizer (Foster City, Calif.) employing the chemistry provided by the manufacturer.

Also provided are antisense oligonucleotides having a nucleotide  
5 sequence capable of binding specifically with any portion of an mRNA that encodes any one of the invention peptides so as to prevent translation of the mRNA. The antisense oligonucleotide may have a sequence capable of binding specifically with any portion of the sequence of the cDNA encoding the invention polypeptides.

In accordance with yet another embodiment of the present invention,  
10 there are provided anti-invention peptide(s) antibodies i.e, uracil transport protein- or uracil phosphoribosyltransferase specific- antibodies having specific affinity for either of the invention peptides. Active fragments of antibodies are encompassed within the definition of "antibody".

Such antibodies can be produced by methods known in the art using  
15 invention polypeptides, proteins or portions thereof as antigens. For example, polyclonal and monoclonal antibodies can be produced by methods well known in the art, as described, for example, in Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), which is incorporated herein by reference. Invention polypeptides can be used as immunogens in generating such antibodies.

Alternatively, synthetic peptides can be prepared (using commercially available  
20 synthesizers) and used as immunogens. Amino acid sequences can be analyzed by methods well known in the art to determine whether they encode hydrophobic or hydrophilic domains of the corresponding polypeptide. Altered antibodies such as chimeric, humanized, CDR-grafted or bifunctional antibodies can also be produced  
25 by methods well known in the art. Such antibodies can also be produced by hybridoma, chemical synthesis or recombinant methods described, for example, in Sambrook et al., *supra.*, and Harlow and Lane, *supra.* Both anti-peptide and anti-fusion protein antibodies can be used. (see, for example, Bahouth et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 12:338 (1991); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, N.Y. (1989) which are incorporated herein by  
30 reference).

Antibody so produced can be used, *inter alia*, in diagnostic methods and systems to detect the level of the invention peptide(s) present in a sample.

Such antibodies can also be used for the immunoaffinity or affinity  
35 chromatography purification of the invention polypeptides. In addition, methods are

WO 03/029407

PCT/US02/30435

contemplated herein for detecting the presence of invention polypeptides on the surface of a cell comprising contacting the cell with an antibody that specifically binds to at least one invention polypeptide, under conditions permitting binding of the antibody to the polypeptide, detecting the presence of the antibody bound to the cell, and thereby detecting the presence of invention polypeptide on the surface of the cell. With respect to the detection of such polypeptides, the antibodies can be used for *in vitro* diagnostic or *in vivo* imaging methods.

Immunological procedures useful for *in vitro* detection of invention polypeptides in a sample include immunoassays that employ a detectable antibody. Such immunoassays include, for example, ELISA, Pandex microfluorimetric assay, agglutination assays, flow cytometry, serum diagnostic assays and immunohistochemical staining procedures, which are well known in the art. An antibody can be made detectable by various means well known in the art. For example, a detectable marker can be directly or indirectly attached to the antibody. Useful markers include, for example, radionucleotides, enzymes, fluorogens, chromogens and chemiluminescent labels.

"Immunologically active fragment(s)" of the invention peptides are also embraced by the invention. Such fragments are those proteins that are capable of raising antibodies specific for any of the two disclosed invention peptides in a target immune system (e.g., murine or rabbit) or of competing with the native peptides for binding to uracil transport- or uracil phosphoribosyltransferase-specific antibodies, and is thus useful in immunoassays for the presence of, for example, human orotate phosphoribosyltransferase in a biological sample.

Invention nucleic acids, oligonucleotides (including antisense), vectors containing same, transformed host cells, polypeptides and combinations thereof, as well as antibodies of the present invention, can be used to screen compounds *in vitro* to determine whether a compound functions as a potential agonist or antagonist to invention peptides.

In accordance with another embodiment of the present invention, there are provided diagnostic systems, preferably in kit form, comprising at least one invention nucleic acid in a suitable packaging material. The diagnostic nucleic acids are derived from the invention peptide-encoding nucleic acids described herein. In one embodiment, for example, the diagnostic nucleic acids are derived from SEQ ID NO.1. In another, the nucleic acid is derived from the coding regions described therein. Invention diagnostic systems are useful for assaying for the presence or

WO 03/029407

PCT/US02/30435

absence of nucleic acid encoding the invention peptide in either genomic DNA or in transcribed nucleic acid (such as mRNA or cDNA) encoding the invention peptide.

5 A suitable diagnostic system includes at least one invention nucleic acid, preferably two or more invention nucleic acids, as a separately packaged chemical reagent(s) in an amount sufficient for at least one assay. Instructions for use of the packaged reagent are also typically included. Those of skill in the art can readily incorporate invention nucleic probes and/or primers into kit form in combination with appropriate buffers and solutions for the practice of the invention methods as described herein.

10 In another aspect, the herein disclosed invention nucleic acids will be useful in a microbial forward mutation assay in *Salmonella typhimurium* to assess the mutagenic potential of exogenous and endogenous compounds. The assay can score mutations in either the uracil phosphoribosyltransferase or the uracil transport genes, which can be selected by resistance to the toxic effects of 5-fluorouracil, a substrate for both enzymes. This microbial mutation assay may provide a convenient and rapid mutation assay suitable for high throughput screening of test compounds.

15 The failure of currently available chemotherapeutic regimens to cure most types of cancer is predominantly due to drug resistance. Significantly, the chemotherapeutic anti-metabolite 5-fluorouracil inhibits key steps in the pathways principally of pyrimidine biosynthesis. In simple terms inhibition of these pathways leads to a shortage of the building blocks for DNA, the resultant inhibition of DNA synthesis and, depending on cell type, the rapid or eventual induction of DNA strand breaks. The detailed mechanisms of action of 5-fluorouracil has already been extensively reviewed by Kinsella et al., *Br. J. Cancer*, 75: 935-945 and references therein.

20 As a consequence of the above recitation, the invention provides methods for improving sensitivity of cancerous cells to treatment with anti-metabolite such as 5-fluorouracil. Indeed, an embodiment of the invention is drawn to a method for improving the therapeutic efficacy of an anticancer agent that includes transfecting cells responsive to treatment with the agent, i.e., cancer cells of the bladder etc. with a therapeutically effective amount of the nucleic acid molecule of SEQ ID NO. 1, preferably the coding regions(s) encoding the protein of SEQ ID NO.2 – uracil phosphoribosyl transferase protein or a substantially similar sequence or variant thereof sufficient to sensitize the cells for treatment with the anticancer agent.

35

WO 03/029407

PCT/US02/30435

The anticancer agent may be 5-Fluorouracil or any other agent that can be acted upon by the disclosed sequence of nucleotides that encode the protein of SEQ ID NO. 2 and converted into a non-toxic agent via a metabolite.

5 Likewise, another embodiment of the invention promises a method for following progress of a therapeutic regimen designed to alleviate a pathological condition responsive to treatment with 5-Fluorouracil such as tumors of the bladder, etc, which provides for assaying a sample of cancerous cells prior to and after treatment (transfection of cells) with the nucleic acid molecule of that encodes the protein of SEQ ID NO. 2 or and comparing the level of the activated/non-toxic  
10 metabolite i.e., 5-fluorouridine 5' monophosphate which results from activation of 5-fluorouracil by the gene product of SEQ ID NO. 1, preferably the coding sequence encoding the uracil phosphoribosyl transferase. This is done over time and the comparisons made thereof.

Generally, an increase in the level of production of the metabolite over  
15 time is indicative of the efficacy of the treatment protocol. In other words, if, over time, the level of the metabolite increases, after the cells are transfected with the SEQ ID NO. 1, preferably the coding portion of SEQ ID NO: 1 that encodes the protein of SEQ ID NO:2, inter alia, nucleotides 215 – 841 or a sequence substantially similar thereto, this suggests that the gene therapy method is successfully sensitizing the cells  
20 to treatment with the anticancer agent and thus is beneficial to the patient.

Having described preferred embodiments of the invention with reference to the accompanying drawings, it is to be understood that the invention is not limited to those precise embodiments, and that various changes and modifications may be effected therein by one skilled in the art without departing from the scope or  
25 spirit of the invention as defined in the appended claims.

#### EXAMPLE 1

Isolation of DNA Encoding Uracil Transport Protein and DNA Encoding Uracil Phosphoribosyltransferase protein from *Salmonella typhimurium*.

30 Genomic DNA from *Salmonella typhimurium* TA100 was first obtained using Qiagen DNeasy Tissue Kit (catalog # 69504) as described by the manufacturer. Initial attempts to isolate the *Salmonella UPP* gene involved designing PCR primers flanking the known *Escherichia coli* UPRT gene sequence (GenBank

WO 03/029407

PCT/US02/30435

accession X57104). These primers were homologous to the *Escherichia coli* sequences (forward: 5' TTT GTG GCT GCC CCT CAA AGG 3'; reverse: 5' AAA AGC CGA CTC TTA AAG TCG GCT T 3'), and proved unsuccessful in amplifying the *Salmonella UPP* gene from the purified genomic DNA in several attempts. The *Escherichia coli UPP* gene was then entered into a nucleotide BLAST search engine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), which displayed 88% homology to a small portion of a *Salmonella* GenBank submission for the *purN* and *purI* gene sequences (accession U68765.1). Approximately 50% of the *Escherichia coli UPP* was present at the end of this *Salmonella purN* and *purI* sequence. By aligning the front half of the *Salmonella UPP* sequence with the back half of the *Escherichia coli UPP* sequence, a hypothetical *UPP* hybrid was constructed. PCR primers were then designed with a forward primer homologous to the *Salmonella* sequence (Forward-1: 5' TTT GTG GTT GCC AGT CAT CTG AGG 3'; Forward-2: 5' ATC CAG GTC AAG CAT ACA TTG TGT TG 3'; Forward-3: 5' AGG ATA TCC AGC ACT TGG TTT ACG AC 3') and several reverse primers homologous to the *Escherichia coli* sequences (Reverse-1: 5' CTG GAT CGC GCA GCA GAT CTT TTT T 3'; Reverse-2: 5' ATA AGC CGG AAT TTT CCC TTT 3'; Reverse-3: 5' CCC CGC TTT CTT CAC GAT AAA AGA AA 3'). These *Escherichia coli* primers were designed to prime homopolymeric runs in *Salmonella* to allow sufficient amplification by PCR based. Amplification from *Salmonella* TA100 yielded the PCR products of the predicted size, which were then sequenced to reveal the *Salmonella UPP* nucleotide sequence. Three independent cultures of TA100 were obtained from different sources, and the *Salmonella UPP* gene was amplified and sequenced to confirm the DNA sequence. The *Salmonella UPP* sequence demonstrated 88% homology to the *Escherichia coli* sequence at the nucleotide level, and 99% homology at the amino acid level.

The *Salmonella uraA* sequence was then determined using a similar approach. First, the *Escherichia coli uraA* sequence was obtained from GenBank (accession AE000336 U00096). Surprisingly, it was noted that the *Escherichia coli UPP* resides 86 nucleotides upstream from the *uraA* start codon. In the previously determined *Salmonella UPP* nucleotide sequence, approximately 800 nucleotides downstream from the *UPP* stop codon were determined, accounting for approximately half of the *Salmonella uraA* gene. *Salmonella* forward PCR primers were designed with homology to the determined *Salmonella* sequences (Forward-1: 5' AAA CCA CTC ATA ACA AAC ACA CTT AG 3'; Forward-2: 5' CGG TGT

WO 03/029407

PCT/US02/30435

TCG GCT CCG TAC TGT 3'), and *Escherichia coli* reserve PCR primers were then designed to prime homopolymeric runs (Reverse-1: 5' CCT CAA CCA GGA TTT CAC AAA 3'; Reverse-2: 5' GCC AGT AAA GAG GAG TTA TCC CC 3'; Reverse-3: 5' CCG AAC AAA CCA GGT GCG TTT 3') in hopes of finding some level of homology to *Salmonella* to allow sufficient amplification by PCR.

5 PCR amplification was performed as follows: 94°C for 2 minutes, followed by 32 cycles of 94°C for 15 seconds, 50°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute, ending with a 3 minute extension at 72°C. Amplification was successful, and the PCR products were then sequenced to reveal the *Salmonella uraA* nucleotide sequence. *Salmonella*  
10 *uraA* gene was amplified and sequenced from three independent cultures, and a consensus DNA sequence obtained. The *Salmonella uraA* sequence demonstrated 82% homology to the *Escherichia coli* sequence at the nucleotide level, and 93% homology at the amino acid level.

Upon determining the *Salmonella UPP* and *uraA* nucleic acid, several  
15 FU-resistant clones were isolated and the genomic DNA sequenced to confirm their role in the biochemical pathway of FU resistance. Genomic DNA was isolated from the FU-resistant clones as described above, both the *UPP* and *uraA* genes amplified by PCR, and PCR products sequenced. All clones analyzed contained molecular defects in the *UPP* gene, all altering the amino acid sequence of the protein,  
20 confirming that *UPP* is chiefly responsible for FU resistance in *Salmonella*.

While the invention has been described in detail with reference to certain preferred embodiments thereof, it will be understood that modifications and variations are within the spirit and scope of that which is described and claimed.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

## Summary of Sequences

Sequence ID NO. 1 is the combined nucleotide sequence of 2520 nucleobases that encodes a *Salmonella typhimurium* derived uracil transport protein (*uraA* protein) and the Uracil Phosphoribosyl Transferase protein (*UPP/UPRT*). The coding portion for the *uraA* is defined by nucleotides 929- 2218, while the coding region of the *UPRT* gene is defined by nucleotides 215 – 841.

Sequence ID NO. 2 is the deduced amino acid sequence of the *Uracil phosphoribosyltransferase* protein.

Sequence ID NO. 3 is the deduced amino acid sequence of the *Uracil Transport Protein*.

15

WO 03/029407

PCT/US02/30435

## WHAT IS CLAIMED:

1. An isolated nucleic acid molecule, comprising a sequence of nucleotides that encodes a uracil transport protein derived from a bacterial source,  
5 wherein the sequence of nucleotides is selected from the group consisting of:
- (a) a sequence of nucleotides that encodes a uracil transport protein comprising the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO.1;
  - 10 (b) a sequence of nucleotides that encodes a uracil transport protein and that hybridizes under conditions of high stringency to the complement of the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO.1; and, if it is DNA, is fully complementary or, if it is RNA, is identical to mRNA native to the bacterial strain from which it is isolated;
  - 15 (c) a sequence of nucleotides that encode a protein having an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 3;
  - (d) a sequence of nucleotides degenerate with the uracil transport protein encoding sequence of (a), (b) or (c).
  - 20
2. An isolated nucleic acid molecule, comprising a coding region that encodes a splice variant of a uracil transport protein derived from a bacterial source, wherein the uracil transport protein is encoded by a sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NO. 1.  
25
3. The isolated nucleic acid molecule according to claim 1, wherein the isolated nucleic acid molecule is genomic DNA.
4. The isolated nucleic acid molecule according to claim 1,  
30 wherein said isolated nucleic acid molecule is mRNA.
5. The isolated nucleic acid molecule according to claim 1, wherein said isolated nucleic acid molecule is cDNA.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

6. An isolated nucleic acid molecule that encodes a uracil transport protein having an amino acid sequence as set forth in SEQ IDNO:3.
7. An isolated nucleic acid molecule, comprising a sequence of nucleotides that encodes a uracil phosphoribosyltransferase protein derived from a bacterial source, wherein the sequence of nucleotides is selected from the group consisting of:
- (a) a sequence of nucleotides that encodes a uracil phosphoribosyltransferase protein comprising the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID NO. 1 or a coding portion thereof;
  - (b) a sequence of nucleotides that encodes a uracil phosphoribosyltransferase protein and that hybridizes under conditions of high stringency to the complement of the sequence of nucleotides defined by a coding region encoding the uracil phosphoribosyl transferase as set forth in SEQ ID NO. 1; and, if it is DNA, is fully complementary or, if it is RNA, is identical to mRNA native to the bacterial strain from which it is isolated;
  - (c) a sequence of nucleotides that encode a polypeptide comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2;
  - (d) a sequence of nucleotides degenerate with the uracil phosphoribosyltransferase protein encoding sequence of (a), (b) or (c).
8. A substantially pure polypeptide encoded by a nucleotide sequence that is a splice variant of a isolated nucleic acid molecule that encodes a uracil phosphoribosyltransferase protein comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO.2.
9. A substantially pure polypeptide comprising the sequence of amino acids as set forth in one of SEQ ID NOS: 2 or 3.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

10. The polypeptide of claim 9, wherein said polypeptide consists of the amino acid sequence of SEQ ID NO. 2.
11. The polypeptide of claim 9, wherein said polypeptide consists of the amino acid sequence of SEQ ID NO. 3.
12. An expression vector comprising the nucleic acid molecule of claim 1, operably linked to a regulatory nucleotide sequence that controls expression of the nucleic acid molecule in a host cell.
13. An expression vector comprising the nucleic acid molecule of claim 7, operably linked to a regulatory nucleotide sequence that controls expression of the nucleic acid molecule in a host cell.
14. Host cells transformed or transfected with the nucleic acid molecule of claim 1.
15. Host cells transformed or transfected with the nucleic acid molecule of claim 7.
16. A method for identifying DNA sequences encoding a uracil transport protein of bacterial origin, the method comprising probing a cDNA library or a genomic library with a labeled probe comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO. 1, and recovering from the library those sequences having a significant degree of homology relative to the probe.
17. A method for identifying DNA sequences encoding a uracil phosphoribosyltransferase protein of bacterial origin, the method comprising probing a cDNA library or a genomic library with a labeled probe comprising a nucleotide sequence defined by the coding region encoding a protein of SEQ ID NO. 2, and recovering from the library those sequences having a significant degree of homology relative to the probe.
18. A method for identifying a uracil transport protein, comprising:

WO 03/029407

PCT/US02/30435

- 5
- (a) introducing the nucleic acid molecule of claim 1 into eukaryotic cells; and
  - (b) detecting nucleoside transport activity in the cells of step (a), wherein the activity is mediated by a polypeptide encoded by the introduced nucleic acid molecule.
- 10
19. A method for detecting uracil transport protein messenger RNA in a biological sample comprising the steps of:
- (a) contacting all or part of the nucleic acid sequence shown in SEQ ID NO.1 with the biological sample under conditions allowing a complex to form between said nucleic acid sequence and said messenger RNA
  - (b) detecting said complexes; and
  - (c) determining the level of said messenger RNA.
- 15
20. A method for detecting uracil phosphoribosyltransferase protein messenger RNA in a biological sample comprising the steps of:
- (a) contacting all or part of the nucleic acid sequence shown in SEQ ID NO.1 with the biological sample under conditions allowing a complex to form between said nucleic acid sequence and said messenger RNA
  - (b) detecting said complexes; and
  - (c) determining the level of said messenger RNA.
- 20
- 25
21. The method according to claim 20, wherein the nucleic acid sequence in step 1 is defined by the uracil phosphoribosyltransferase protein encoding region of from nucleotides 215 to 841 of SEQ ID NO: 1.
- 30
22. A method for detecting uracil phosphoribosyltransferase protein in a biological sample comprising the steps of (i) contacting a sample suspected of containing said protein with a detectable probe that is specific for the gene product of the isolated nucleic acid molecule of claim 7, under conditions favoring formation of a probe/gene product complex, and (ii) detecting said complex.
- 35

WO 03/029407

PCT/US02/30435

23. The method of claim 22, wherein the probe is an antibody.
24. The method of claim 23, wherein said antibody is labeled with a radioactive label or an enzyme.
- 5
25. An oligonucleotide which encodes an anti-sense sequence complementary to the sequence of nucleotides as set forth in SEQ ID NO: 1, and which inhibits translation of the gene product of said nucleotide sequence in a cell, wherein the gene product is one of a uracil transport protein of SEQ ID NO: 3 or a uracil phosphoribosyl transferase of SEQ ID NO:2.
- 10
26. A method for improving the therapeutic efficacy of an anticancer agent comprising transfecting cells responsive to treatment with said agent with a therapeutically effective amount of the nucleic acid molecule of claim 7 sufficient to sensitize said cells for treatment with said anticancer agent.
- 15
27. The method according to claim 26, wherein said anticancer agent is 5-Fluorouracil.
- 20
28. A method for following progress of a therapeutic régime designed to alleviate a pathological condition responsive to treatment with 5-Fluorouracil comprising:
- 25
- (a) assaying a sample of cells from a subject following treatment with a 5-fluorouracil converting enzyme, wherein said enzyme is the gene product of the nucleic acid molecule of claim 7, to determine level of 5-fluorouridine 5' monophosphate which results from activation of said 5-fluorouracil by said gene product at a first time point;
- 30
- (b) assaying level of the 5-fluorouridine 5' monophosphate at a second time point and
- (c) comparing said level at the second time point to the level determined in (a) as a determination of effect of the therapeutic régime.
- 35

WO 03/029407

PCT/US02/30435

29. A probe comprising the nucleic acid of claim 1, or a complementary strand thereof.
30. The probe of claim 29 labeled with a detectable marker.
- 5 31. A method for screening for a compound able to bind to the gene product of the nucleic acid molecule of claim 1, comprising the steps of:
- (a) expressing a polypeptide comprising the amino acids of SEQ ID NO. 2 from recombinant nucleic acid;
  - 10 (b) providing to said polypeptide a test preparation comprising one or more test compounds; and
  - (c) measuring the ability of said test preparation to bind to said polypeptide
- 15 32. The method of claim 31, wherein said steps (b) and (c) are performed *in vitro*.
33. The method of claim 31, wherein said steps (a), (b) and (c) are performed using a whole cell.
- 20 34. An antibody immunoreactive with the a gene product of the nucleic acid molecule of claim 1 or claim 7.
35. The antibody of claim 34 which is polyclonal.
- 25 36. The antibody of claim 34 which is monoclonal.

WO 03/029407

PCT/US02/30435

SEQUENCE LISTING

<110> Merck & Co., Inc.  
Glaab, Warren  
Skopek, Thomas

<120> ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING  
A BACTERIAL URACIL TRANSPORT PROTEIN AND A BACTERIAL URACIL  
PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE ENZYME, CELLS TRANSFORMED  
THEREWITH AND USES THEREFORE

<130> 20887-PCT

<150> 60/325,128

<151> 2001-09-26

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2520

<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

```

<400> 1
gggacaggtc attcaaccctt aaaattgcta atattcaaac ggttgtagc ctttatcgcc 60
tgtttcaacg tgagtgattt atactcactt ttccgctatc agcgcttttg gttgatccag 120
gtcaagcata cattgtgttg cgtcagagag gaaaagcggg ataactcggc gatttttttt 180
gtggttgcca gtcactctag gataggagaa gagtatgaag atctgtggaag tcaaacacccc 240
actcgtcaaa cacaaagctgg gtcctatgag tgaaaaacgac attagacta aacgctttcg 300
tgaactcggc tcgaagtag gcagcctgct gacgtatgaa gcgacagccg acctggaaac 360
ggaaaaagtc accatcgaag gctggaatgg cccggtggaa atcgaccaga tcaaaagtaa 420
aaaaattacc gttgtgcccga ttctgcgcgc gggctctggg atgatggaag gcgctctgga 480
aaatgtaccg agcgcgcgta tcagcgtagt cgggatgtac cgtaacgaaag agacgcttga 540
gccagtcact tatttcocaga aactggtatc gaacattgat gagcgcattg gcgtgatcgt 600
cgaccocgatg ctggcgactg ccggttctgt catcgcgacc atcgactcgc tgaaaaaagc 660
aggtgttagc agcatlaaag tgctggtgct ggtcgcgcgc ccggaagcca tgcggcgctt 720
ggaaaaagcg caccggagc ttgaactgta ccgcgcctct atcgatcag gggttaacga 780
gcacggatac atattcccg gcttgccgca tgcgcgcgat aagatttttg gtaccaata 840
agtgaataaa caattaaaag ccgactttaa gactcggcct tttttgaa aaaccacac 900
atacaaaaa caacttagag aaaaactata gcgcgcgcgt gctatcgggg tgagtgaag 960
accgcgcctt ttacagacaa tcccgttag ttacagcac cttttcgcca tgtttggcgc 1020
gaccgtgctg gtgccagttc tgtttcatat caatcccgcg acggtgctgc tgtttaacgg 1080
tatcggaaag ttgctgtatc tctttatctg caaaggtaaa atccctgctt acctcggatc 1140
gagcttggc ttatttccc cggtatatct gttgttgcg ctgggttatg aagtggcgct 1200
ggggggtttt attatgtgag cgtgtgttct ctgctctgct tctttcatcg ttaaaaaagc 1260
gggcaccggc tggctggatg tgatgttccc goctgcggca atgggcgcaa tcgttgcctt 1320
catcgtctg gagctggctg cgtctgcgcg ggggatggcc ggattactgc ctgcgcaagg 1380
cgactcgcg gacacgaaaa caattatcat ctccatggtc acgctggcgg tgacggtggt 1440
cggctccgta ctgtttcgcg gtttctcggc gatcattccg atttgatcg gcgtgctggc 1500
gggctatgag ctgtcaattc cgtcgggggt ggtcgatacc acgccgatg cccaggcgca 1560
ctggtttgg ctgcgcgact tctatcgcgc agtthtgaag tggctcgcga tctgacgat 1620
tctgcccggc gctgtgtctg tgatcgcgca gcatgctggt catctgtag tgacggcga 1680
tatcgtcaaa aaagatttag tgcgcgatcc cgtttgcaac cgtcgtatgt tcgtaaacg 1740
actgtgcagc atcatttccc gtttctctgg ctcccgcgc aataccacct atggggaaaa 1800
tattggcgtc atggcgatca cccgcgttta cagtacctgg gttatcggcg gcgcgccgat 1860
tttcgccatt ctgctttccct cgtttggcaa actcggcgcg gcgattcaga ttatcccggt 1920
accctgatg ggcggcgtct cgtctctgtt gtaagcgttt atcggcgcgt cggggattcg 1980
cgtcttgatc gaatcgaag tcgactcaaa caaagcgcaa aactcgtacc tcacctcgtt 2040

```

WO 03/029407

PCT/US02/30435

```

gattttgac atcgcggtga gcggcgcgaa agtgcatac gccgcggcag aattgaaag 2100
gatggcgctg cgcaccatcg tggggatttg cctgagcctg atttttaaac tgattagcct 2160
gttgcgtccg gaagaagtgg tactggagac aaatgatcgg gagccccgc atcagtaacg 2220
ggttgccccg cagcagcctt gccgggtctt atctcacagg aattatgggg taaactcagc 2280
gggattttat gtcactctgg gttcagggtat cctcgaacac accggcacag ctctcttttc 2340
cactttatct tctcgaacac gaaactttcg caagtttctg gccgggggat aacgcctctc 2400
tactggccgc gttacaaaac gtgttgcgcc aggaacatag tggatatatc tacctttggg 2460
cgcgtgaagg cgggggcgc agccatttac tgcacgccg cttgtctgaa ctgtcgcagc 2520

```

<210> 2

<211> 208

<212> PRT

<213> Uracil Phosphoribosyltransferase

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 429

<212> PRT

<213> Uracil Transport Protein

<400> 3

```

Met Thr Arg Arg Ala Ile Gly Val Ser Glu Arg Pro Pro Leu Leu Gln
1 5 10 15
Thr Ile Pro Leu Ser Leu Gln His Leu Phe Ala Met Phe Gly Ala Thr
20 25 30
Val Leu Val Pro Val Leu Phe His Ile Asn Pro Ala Thr Val Leu Leu
35 40 45
Phe Asn Gly Ile Gly Thr Leu Leu Tyr Leu Phe Ile Cys Lys Gly Lys
50 55 60
Ile Pro Ala Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Ala Phe Ile Ser Pro Val Leu
65 70 75
Leu Leu Leu Pro Leu Gly Tyr Glu Val Ala Leu Gly Gly Phe Ile Met
80 85 90 95
Cys Gly Val Leu Phe Cys Leu Val Ser Phe Ile Val Lys Lys Ala Gly
100 105 110

```

WO 03/029407

PCT/US02/30435

Thr Gly Trp Leu Asp Val Met Phe Pro Pro Ala Ala Met Gly Ala Ile  
 115 120 125  
 Val Ala Val Ile Gly Leu Glu Leu Ala Gly Val Ala Ala Gly Met Ala  
 130 135 140  
 Gly Leu Leu Pro Ala Gln Gly Gln Ser Pro Asp Thr Lys Thr Ile Ile  
 145 150 155  
 Ile Ser Met Val Thr Leu Ala Val Thr Val Phe Gly Ser Val Leu Phe  
 165 170 175  
 Arg Gly Phe Leu Ala Ile Ile Pro Ile Leu Ile Gly Val Leu Ala Gly  
 180 185 190  
 Tyr Ala Leu Ser Phe Ala Leu Gly Val Val Asp Thr Thr Pro Ile Ala  
 195 200 205  
 Gln Ala His Trp Phe Ala Leu Pro Thr Phe Tyr Thr Pro Arg Phe Glu  
 210 215 220  
 Trp Phe Ala Ile Leu Thr Ile Leu Pro Ala Ala Leu Val Val Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Glu His Val Gly His Leu Val Val Thr Ala Asn Ile Val Lys Lys Asp  
 245 250 255  
 Leu Val Arg Asp Pro Gly Leu His Arg Ser Met Phe Ala Asn Gly Leu  
 260 265 270  
 Ser Thr Ile Ile Ser Gly Phe Phe Gly Ser Thr Pro Asn Thr Thr Tyr  
 275 280 285  
 Gly Glu Asn Ile Gly Val Met Ala Ile Thr Arg Val Tyr Ser Thr Trp  
 290 295 300  
 Val Ile Gly Gly Ala Ala Ile Phe Ala Ile Leu Ser Cys Val Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Leu Ala Ala Ala Ile Gln Ile Ile Pro Leu Pro Val Met Gly Gly  
 325 330 335  
 Val Ser Leu Leu Leu Tyr Gly Val Ile Gly Ala Ser Gly Ile Arg Val  
 340 345 350  
 Leu Ile Glu Ser Lys Val Asp Tyr Asn Lys Ala Gln Asn Leu Ile Leu  
 355 360 365  
 Thr Ser Val Ile Leu Ile Ile Gly Val Ser Gly Ala Lys Val His Ile  
 370 375 380  
 Gly Ala Ala Glu Leu Lys Gly Met Ala Leu Ala Thr Ile Val Gly Ile  
 385 390 395 400  
 Cys Leu Ser Leu Ile Phe Lys Leu Ile Ser Leu Leu Arg Pro Glu Glu  
 405 410 415  
 Val Val Leu Glu Ala Asn Asp Ala Glu Pro Pro His Gln  
 420 425

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 April 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/029407 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, C12N 1/21, 5/14, 5/16, 15/52, 15/63, C07K 14/195, C07H 21/04 [US/US]: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US); SKOPEK, Thomas [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/30435 (74) Common Representative: MERCK & CO., INC.; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (22) International Filing Date: 25 September 2002 (25.09.2002) (81) Designated States (national): CA, JP, US.
- (25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/325,128 26 September 2001 (26.09.2001) US Published: with international search report
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK & CO., INC. [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US). (88) Date of publication of the international search report: 11 December 2003
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): GLAAB, Warren
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/029407 A3

(54) Title: ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A BACTERIAL URACIL TRANSPORT PROTEIN AND A BACTERIAL URACIL PHOSPHORIBOSYL-TRANSFERASE ENZYME, CELLS TRANSFORMED THEREWITH AND USES THEREOF

(57) Abstract: Disclosed herein are novel polynucleotides encoding one of a uracil transport protein and a uracil phosphoribosyl transferase, each being derived from *Salmonella typhimurium*. The disclosed uracil phosphoribosyl transferase protein is useful in sensitizing human cancer cells to treatment with anti-cancer agents such as 5-Fluorouracil.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/30435
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C12Q 1/68, C12N 1/21, 5/14, 5/16, 15/52, 15/63, C07K 14/195, C07H 21/04		
US CL : 435/6, 252.3, 320.1, 325, 410; 530/350,825: 536/23.7, 24.32		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 252.3, 320.1, 325, 410, 530/350,825: 536/23.7, 24.32		
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GROVE et al. Uptake and Metabolism of the New Anticancer Compound beta-L-(-)-Dioxolane Cytidine in Human Prostate Carcinoma DU-145 Cells. Cancer Research. 15 September 1996, Vol. 56, pages 4187-4191.	1-6, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 25, 29, 30
A	GRIFFITH et al. Nucleoside and Nucleobase Transport Systems of Mammalian Cells. Biochimica et Biophysica Acta. 29 October 1996, Vol. 1286, No. 3, pages 153-181.	1-6, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 25, 29, 30
A	JUND et al. Primary Structure of the Uracil Transport Protein of Saccharomyces Cerevisiae. European Journal of Biochemistry. 1988, Vol. 171, No.1-2, pages 417-424.	1-6, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 25, 29, 30
X,P	MCCLELLAND et al. Complete Genome Sequence of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium LT2. Nature. 25 October 2001, Vol. 413, No. 6858, pages 852-856, a protein of 429 amino acids that is 100% identical to SEQ ID NO: 3 is encoded by the ORF (nucleotides 13641-14930) that is 100% identical to nucleotides 929-2218 of SEQ ID NO. 1.	1-6, 9, 11, 12, 14, 16, 25, 29
Y,P		18, 19, 30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:    ** 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		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"
"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)	"Z"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"E"
Date of the actual completion of the international search: 05 June 2003 (05.06.2003)		
Date of mailing of the international search report: 11 SEP 2003		
Name and mailing address of the ISA/US: Mail Stop PCT, AM: ISA/US, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450, Facsimile No. (703)305-3230		
Authorized official: Elizabeth Stobodyaneky, Telephone No. 703-308-0196		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/30435
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.: Please See Continuation Sheet
<b>Remark on Protest</b>		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/30435

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-6, 9 (in part), 11, 12, 14, 16, 18, 19, 25 (in part), 29 and 30, drawn to a DNA encoding a uracil transport protein of SEQ ID NO:3, a vector, a cell comprising thereof, a hybridization method using a DNA, a method of making a uracil transport protein, said protein.

Group II, claim(s) 7, 8, 9 (in part), 10, 13, 15, 17, 20, 21, 25 (in part), 28 and 31-33, drawn to a DNA encoding a uracil phosphoribosyltransferase protein of SEQ ID NO:2, a vector, a cell comprising thereof, a hybridization method using a DNA, a method of making a phosphoribosyltransferase protein, said protein.

Group III, claim(s) 22-24 and 34-36 (in part), drawn to antibodies against a uracil phosphoribosyltransferase and methods of use thereof.

Group IV, claim(s) 26 and 27, drawn to a method of use of a DNA encoding a uracil phosphoribosyltransferase protein of SEQ ID NO:2.

Group V, claim(s) 34-36 (in part), drawn to antibodies against a uracil transport protein of SEQ ID NO:3. The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group I is an uracil transport protein and a corresponding DNA and method of use of said DNA and said protein. The special technical feature of Group II is a uracil phosphoribosyltransferase protein and a corresponding DNA and method of use of said DNA and said protein. Since the special technical feature of Group I invention is not present in the group II claims and the special technical feature of Group II invention is not present in the Group I claims, unity of invention is lacking.

The special technical feature of Group III is an antibody against a uracil phosphoribosyltransferase protein. The structure of an antibody is unpredictable from the structure of a polypeptide and therefore, the special technical feature of Group II is not present in claims of Group III and vice versa. The special technical feature of Group V is an antibody against a uracil transport protein. The structure of an antibody is unpredictable from the structure of a polypeptide and therefore, the special technical feature of Group I is not present in claims of Group V and vice versa. Since the special technical feature of Group III invention is not present in the Group V claims and the special technical feature of Group V invention is not present in the group III claims, unity of invention is lacking between these two Groups.

Group II and Group IV do not share a special technical feature as being drawn to different methods of use of a DNA/transformed cell. A transformed cell can be used for the production of a polypeptide as in invention II and in a method of Group IV invention. 37 CFR 1.475 does not provide for multiple products or methods within one application. Therefore, unity of invention is lacking with regard to Group s II and IV.

**Continuation of Box II Item 4:**

1-6, 9 (in part, SEQ ID NO:3), 11, 12, 14, 16, 18, 19, 25 (in part, SEQ ID NO:3), 29, 30

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US02/30435

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**  
WEST, MEDLINE, SCISEARCH, LIPESCI, BIOTECHDS, BIOSIS, EMBASE, HCAPLUS, NTIS, ESBIODASE, BIOTECHNO,  
WPIIDS

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/40	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/10	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 9/10	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/48	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/536	B
G 0 1 N 33/536	C 1 2 N 5/00	A
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/52	
	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 グラブ, ウオーレン

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 スコーペク, トーマス

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BB50 BB51 DA13 DA36 FB02 FB03 FB08  
 4B024 AA01 AA10 AA11 AA13 BA10 BA53 BA80 CA03 CA04 CA09  
 CA12 CA20 DA01 DA02 DA05 DA11 GA11 HA11 HA13 HA14  
 HA17  
 4B050 CC01 CC03 DD02 LL03 LL05  
 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ06 QQ21 QQ26 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61  
 QQ79 QQ89 QQ91 QR06 QR08 QR32 QR35 QR39 QR42 QR48  
 QR56 QR62 QR80 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA01X AA46Y AA58X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA29  
 CA43 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA22 BA35 DC25 MA02 NA05  
 ZB262 ZC752  
 4C086 AA01 AA02 AA03 BC43 MA02 MA06 MA07 NA05 ZB26 ZC75  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA75 DA76 EA20 EA50  
 FA71 FA72 FA74

专利名称(译)	细菌尿嘧啶转运蛋白和编码细菌尿嘧啶磷酸核糖转移酶的分离的核酸分子，用所述核酸分子转化的细胞及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005505276A</a>	公开(公告)日	2005-02-24
申请号	JP2003532626	申请日	2002-09-25
申请(专利权)人(译)	默克结束Kamupani公司		
[标]发明人	グラブウオーレン スコークトーマス		
发明人	グラブ,ウオーレン スコーク,トーマス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/513 A61K38/45 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/195 C07K14/255 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	C12N9/1077 C07K14/255		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/513 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.121 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/10 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.P G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/536.B C12N5/00.A A61K37/52 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA10 4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA10 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD02 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ21 4B063/QQ26 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR06 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA46Y 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA29 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA35 4C084/DC25 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/ZB262 4C084/ZC752 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/BC43 4C086/MA02 4C086/MA06 4C086/MA07 4C086/NA05 4C086/ZB26 4C086/ZC75 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/325128 2001-09-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及编码尿嘧啶转运蛋白和尿嘧啶磷酸核糖基转移酶之一的新型多核苷酸，其各自衍生自鼠伤寒沙门氏菌 ( Salmonella typhimurium )。本发明的尿嘧啶磷酸核糖基转移酶蛋白质可用于使人癌细胞对抗癌药物治疗如5-氟尿嘧啶敏感。

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
<b>A 6 1 K 31/513</b>	A 6 1 K 31/513	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 38/45</b>	A 6 1 K 48/00	4 B 0 5 0
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 P 35/00</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 B 0 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁) 最終頁	

(21) 出願番号	特願2003-532626 (P2003-532626)	(71) 出願人	390023526
(66) (22) 出願日	平成14年9月25日 (2002. 9. 25)		メルク エンド カムパニー イン:
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月25日 (2004. 3. 25)		レーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/030435		M E R C K & C O M P A N Y
(87) 国際公開番号	W02003/029407		O P O R A T E D
(87) 国際公開日	平成15年4月10日 (2003. 4. 10)		アメリカ合衆国、ニュージャージー、
(31) 優先権主張番号	60/325, 128		ウエイ、イースト リンカーン ア:
(32) 優先日	平成13年9月26日 (2001. 9. 26)		ュー 1 2 6
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062007
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), CA, JP, US		弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 景夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠