

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4574012号
(P4574012)

(45) 発行日 平成22年11月4日 (2010. 11. 4)

(24) 登録日 平成22年8月27日 (2010. 8. 27)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/00 1 O 1

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 O 5

C O 7 K 14/47 (2006. 01)

C O 7 K 14/47

請求項の数 57 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-579170 (P2000-579170)
 (86) (22) 出願日 平成11年11月2日 (1999. 11. 2)
 (65) 公表番号 特表2002-534060 (P2002-534060A)
 (43) 公表日 平成14年10月15日 (2002. 10. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/025700
 (87) 国際公開番号 W02000/025725
 (87) 国際公開日 平成12年5月11日 (2000. 5. 11)
 審査請求日 平成18年11月1日 (2006. 11. 1)
 (31) 優先権主張番号 60/106, 703
 (32) 優先日 平成10年11月2日 (1998. 11. 2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 501188889
 キュリス, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 3 8, ケンブリッジ, ムールトン スト
 リート 4 5
 (74) 代理人 110000523
 アクシス国際特許業務法人
 (72) 発明者 ケビン ウィリアムズ
 アメリカ合衆国 O 1 7 6 0 マサチュー
 セッツ, ネイティック, モールデン スト
 リート 7
 (72) 発明者 ポール レイホーン
 アメリカ合衆国 O 2 0 3 5 マサチュー
 セッツ, フォックスバラ, ミリミチ ロー
 ド 4 8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘッジホッグ活性の機能的アンタゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘッジホッグポリペプチドの単離された機能的アンタゴニストであって、該アンタゴニストはヘッジホッグレセプターに結合するが、ヘッジホッグ依存性シグナリング応答を誘導せず、該アンタゴニストは S E Q I D N O : 1 ~ 7 及び 1 1 のいずれかと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、アンタゴニストは、：

a) 成熟ヘッジホッグポリペプチドの C y s - 1 に対応する N 末端システインを欠くヘッジホッグポリペプチドであるか、
 b) 成熟ヘッジホッグポリペプチドの C y s - 1 を有する N 末端伸長部位を含むか、
 c) 最も N 末端側のアミノ酸残基として成熟ヘッジホッグポリペプチドの C y s - 1 を有する N 末端伸長部位を含むか、
 d) 成熟ヘッジホッグポリペプチドの C y s - 1 に対応する N 末端システインから始まるアミノ酸を最大で 1 2 個欠いているか、又は
 e) N 末端システインの他のアミノ酸残基への突然変異を有する、
 該アンタゴニスト。

【請求項 2】

C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞におけるアルカリホスフェート誘導アッセイ； C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞における p t c - 1 発現アッセイ； C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞における g l i - 1 発現アッセイ；及び C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞におけるパッチト-1 タンパク質誘導アッセイよりなる群から選択するアッセイにおいて、ヘッジホッグ依存性シグナリング応答を誘

導しないことを特徴とする、請求項 1 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 3】

アンタゴニストが、SEQ ID NO: 2～7 のいずれかと少なくとも 90 % の同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 1 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 4】

アンタゴニストが、成熟ヘッジホッグポリペプチドの Cys-1 に対応する N 末端システインを欠くヘッジホッグポリペプチドである、請求項 3 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 5】

成熟ヘッジホッグポリペプチドの Cys-1 を有する N 末端伸長部位を含む、請求項 3 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 6】

アンタゴニストが、最も N 末端側のアミノ酸残基として成熟ヘッジホッグポリペプチドの Cys-1 を有する N 末端伸長部位を含む、請求項 3 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 7】

アンタゴニストが、成熟ヘッジホッグポリペプチドの Cys-1 に対応する N 末端システインから始まるアミノ酸を最大で 12 個欠いている、請求項 3 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 8】

アンタゴニストが、N 末端システインの他のアミノ酸残基への突然変異を有する、請求項 3 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 9】

他のアミノ酸が、極性アミノ酸又は帯電アミノ酸残基である、請求項 8 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 10】

他のアミノ酸残基が、セリン残基である、請求項 8 又は 9 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 11】

アンタゴニストが、更に、アンタゴニストの C 末端に改変を含む、請求項 3 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 12】

アンタゴニストが、C 末端から最大で 11 アミノ酸残基を失っている、請求項 11 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 13】

改変が、C 末端に結合されたポリペプチドを含み、かつそのポリペプチドを、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、DNA 結合ドメイン、ポリメラーゼ活性化ドメイン、ヒスチジントグ及び免疫グロブリン又はこれらの部分よりなる群から選択する、請求項 11 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 14】

C 末端改変が、C 末端に結合された疎水性部分を含む、請求項 11 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 15】

成熟ヘッジホッグポリペプチドの Cys-1 を、(a) SEQ ID NO: 3 で示される成熟ソニックヘッジホッグポリペプチドの Cys-1 ; (b) SEQ ID NO: 2 で示される成熟インディアンヘッジホッグポリペプチドの Cys-1 ; 及び (c) SEQ ID NO: 4 で示されるの成熟デザートヘッジホッグポリペプチドの Cys-1 よりなる群から選択する、請求項 1 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 16】

アンタゴニストが、ソニック、デザート又はインディアンヘッジホッグ応答性レセプターに結合することができるが、ソニック、デザート又はインディアンヘッジホッグ依存性シグナリング応答を誘導できないポリペプチドを含むアンタゴニストであって、該ポリペプチドはSEQ ID NO: 3と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項1に記載の単離されたヘッジホッグアンタゴニスト。

【請求項17】

ポリペプチドが、成熟ソニックヘッジホッグポリペプチドのCys-1残基に対応する残基から、成熟ソニックヘッジホッグポリペプチドのCys-1残基に対応しない残基に変化されたN末端残基を有する、請求項16に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項18】

アンタゴニストが、デザート、ソニック又はインディアンヘッジホッグ応答性レセプターに結合することはできるが、ソニック、インディアン又はデザートヘッジホッグ依存性シグナリング応答を誘導できないポリペプチドを含むアンタゴニストであって、該ポリペプチドはSEQ ID NO: 4と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項1に記載の単離されたヘッジホッグアンタゴニスト。

【請求項19】

ポリペプチドが、成熟デザートヘッジホッグポリペプチドのCys-1残基に対応する残基から、成熟デザートヘッジホッグポリペプチドのCys-1残基に対応しない残基に変えられたN末端残基を有する、請求項18に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項20】

アンタゴニストが、インディアン、デザート又はソニックヘッジホッグ応答性レセプターに結合することはできるが、インディアン、デザート又はソニックヘッジホッグ依存性シグナリング応答を誘導できないポリペプチドを含むアンタゴニストであって、該ポリペプチドはSEQ ID NO: 2と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項1に記載の単離されたヘッジホッグアンタゴニスト。

【請求項21】

ポリペプチドが、成熟インディアンヘッジホッグポリペプチドのCys-1残基に対応する残基から、成熟インディアンヘッジホッグポリペプチドのCys-1残基に対応しない残基に変化されたN末端残基を有する、請求項20に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項22】

請求項1に記載の単離されたアンタゴニストであって、前記アンタゴニストがSEQ ID NO: 5、6、7、9、10及び11から選択するアミノ酸配列を含むポリペプチドであるアンタゴニスト。

【請求項23】

前記アンタゴニストが下記の特性を有する請求項1に記載のヘッジホッグポリペプチドの単離された機能的アンタゴニストであり：

(i) 単離されたアンタゴニストが、ヘッジホッグレセプターに結合し；そして

(ii) 単離されたアンタゴニストが、APアッセイで試験した場合に、成熟ヘッジホッグタンパク質によるアルカリホスファターゼ(AP)誘導をブロックする、
該アンタゴニストはSEQ ID NO: 1~7又は11のいずれかと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドであるアンタゴニスト。

【請求項24】

ヘッジホッグレセプターが、パッチト-1である、請求項23に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項25】

p115及びg115発現を誘導できないという更なる特性を有する、請求項24に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項26】

成熟ソニックヘッジホッグのCys-1に対応するN末端システインを欠くヘッジホッ

10

20

30

40

50

グポリペプチドを含む、請求項 2 5 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 2 7】

発現に際して、請求項 1、1 6、1 8 又は 2 0 の機能的アンタゴニストをコードする単離された核酸。

【請求項 2 8】

脊椎動物のヘッジホッグファミリーのメンバーであるヘッジホッグポリペプチドをコードする、請求項 2 7 に記載の核酸。

【請求項 2 9】

ヘッジホッグポリペプチドの機能的アンタゴニストをコードする核酸であって、下記よりなる群から選択するポリヌクレオチドを含む当該核酸：

(a) SEQ ID NO: 1 6 によりコードされるポリヌクレオチド；

(b) 発現に際して、SEQ ID NO: 1 6 によりコードされるタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 3 0】

請求項 2 7 の核酸配列を含むベクター。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 3 2】

請求項 3 0 に記載のベクターに含まれる核酸配列によりコードされるヘッジホッグポリペプチドの機能的アンタゴニスト。

【請求項 3 3】

製薬上許容し得るキャリアー中に請求項 1、1 6、1 8、2 0 又は 2 3 に記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項 3 4】

請求項 1 に記載の機能的ヘッジホッグアンタゴニストを製造する方法であって、成熟ヘッジホッグポリペプチドの N 末端システイン残基を、成熟ソニックヘッジホッグの C y s - 1 残基に対応する残基から、成熟ソニックヘッジホッグの C y s - 1 残基に対応しない残基に変化させることを含む当該方法。

【請求項 3 5】

変化させるステップが、ヘッジホッグポリペプチドをタンパク質分解にさらすことを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

機能的ヘッジホッグアンタゴニストタンパク質を製造する方法であって、請求項 3 1 の宿主細胞からタンパク質を発現させてそのタンパク質を精製することを含む当該方法。

【請求項 3 7】

アンタゴニストの一つのアミノ酸残基に、ポリエチレングリコール及びデキストランよりなる群から選択する一つの部分を結合させた、請求項 3 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 3 8】

ヘッジホッグ依存性シグナリング応答を、C 3 H 1 0 T 1 / 2 アルカリホスファターゼアッセイにおいて測定する、請求項 1 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 3 9】

前記アンタゴニストが S E Q I D N O : 2 ~ 7 の何れかと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 1 又は 2 3 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 0】

前記アンタゴニストが S E Q I D N O : 2 ~ 7 の何れかと少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 3 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 1】

前記ポリペプチドが S E Q I D N O : 3 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を有する、請求項 1 6 に記載のアンタゴニスト。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2】

前記ポリペプチドが SEQ ID NO: 4 と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を有する、請求項 1 8 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 3】

前記ポリペプチドが SEQ ID NO: 2 と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を有する、請求項 2 0 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 4】

請求項 3 4 又は 3 5 に記載の方法に従って製造された機能的ヘッジホッグアンタゴニスト。

【請求項 4 5】

請求項 3 6 に記載の方法に従って製造された機能的ヘッジホッグアンタゴニストタンパク質。

【請求項 4 6】

患者のヘッジホッグ依存性シグナリングを阻害するための医薬製剤の製造のための、請求項 3 3 に記載の組成物の使用。

【請求項 4 7】

患者のヘッジホッグ依存性シグナリングを阻害するための医薬製剤の製造のための、請求項 3 0 に記載のベクターの使用。

【請求項 4 8】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 5、6 及び 7 のいずれかから選択するアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 2 2 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【請求項 4 9】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 4 8 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【請求項 5 0】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 4 8 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【請求項 5 1】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 7 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 4 8 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【請求項 5 2】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 2 2 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【請求項 5 3】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 2 2 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【請求項 5 4】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 7 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 2 2 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【請求項 5 5】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 9 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 2 2 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【請求項 5 6】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 10 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 2 2 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【請求項 5 7】

前記アンタゴニストが SEQ ID NO: 11 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項 2 2 に記載の単離された機能的アンタゴニスト。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【0001】

発明の背景

ヘッジホッグタンパク質は、脊椎動物及び無脊椎動物の両者において胚発生の様々な面を調節する細胞外シグナリングタンパク質のファミリーである(総説としては、Perrimon, N. (1995) Cell 80, 517-520及び、Johnson, R.L. 及び Tabin, C. (1995) Cell 81, 313-316を参照されたい)。このファミリーは、様々な動物から得られるメンバーを含み、ソニック、デザート及びインディアンヘッジホッグを含む。最も徹底的に特性決定された哺乳動物の同族体は、ソニックヘッジホッグ(「Shh」)であり、これは、中枢神経系内の底板の誘導及び腹側極性の確立並びに発生中の肢の適当な前後パターンを含む種々の胚誘導事象に関与している(Riddle, R.D. 等(1993) Cell 75, 1401-1416; Echelard, Y. 等(1993) Cell 75, 1417-1471; Roelink, H. 等(1994) Cell 76, 761-775; 及び Roelink, H. 等(1995) Cell 81, 445-455)。これらの効果の媒介において、Shhは、短距離用の接触依存性インデューサー及び長距離用の拡散性モルフォゲンとして作用すると考えられている。Shhは、胚の脊索において発現され、神経管の腹側正中線において底板形成を接触依存様式で誘導する(Riddle等及びRoelink等、Cell, 81:445前書参照)。データは、Shhが、腹側ニューロン例えば中脳におけるドーパミン作動性ニューロン(Wang, M.Z. 等(1995), Nature Med. 1, 1184-1188)及び脊髄における運動ニューロン(Roelink等、Cell 81:445, 前書)のその後の分化を促進する長距離用の拡散性モルフォゲンとしても領域特異的の様式で作用し得ることを示唆している。

10

【0002】

生化学的及び遺伝学的データは、ヘッジホッグレセプターが、パッチされた腫瘍抑制遺伝子の産物であること(Marigo, V. 等(1996) Nature 384, 176-179; Stone, D.M. 等(1996) Nature 384, 129-134)及びスムースンド(Alcedo, J. (1996) Cell 86, 221-232)、キュビタスインターラプタス又はその哺乳動物の対応物のgli (Dominguez, M. 等(1996) Science 272, 1621-1625; Alexandre, C. 等(1996) Genes&Dev. 10, 2003-2013)及びヒューズド(Therond, P.P. 等(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4224-4228)を含む他のタンパク質がヘッジホッグシグナリング経路に含まれることを示唆している。パッチト-1及びgli-1発現の誘導は、ヘッジホッグシグナリングの下流マーカーであり、ヘッジホッグ機能に対する単純マーカーとして働く。第2のパッチト遺伝子、パッチト-2は、ヘッジホッグによっても誘導される(Takabatake, T. 等(1997) FEBS Letts. 410, 485-489)。膜貫通タンパク質のHipも又、ヘッジホッグのレセプターとして同定されている(PCT公開WO 98/12326)。

20

30

【0003】

Shhは、45 kDaの前駆体タンパク質として合成され、これは、自己触媒的に開裂されて、すべての公知のヘッジホッグ生物学的活性(「成熟」ソニックヘッジホッグ)の原因である20 kDaのN末端断片と、自己プロセッシング機構を含む(Lee, J.J. 等(1994) Science 266, 1528-1536; Bumcrot, D.A. 等(1995) Mol. Cell Biol. 15, 2294-2303; Porter, J.A. 等(1995) Nature 374, 363-366) 25 kDaのC末端断片とを生じる。このN末端断片は、そのC末端の脂質係留鎖の付加により膜結合を維持している(Porter, J.A. 等(1996) Science 274, 255-258; Porter, J.A. 等(1995) Cell 86, 21-34)。最近の生化学的データは、この脂質係留鎖をコレステロールと同定した(Porter, J.A. 等(1996) Science 274, 前書)が、その付加は、自己プロセッシングステップ中にC末端ドメインにより触媒される。Shhは又、そのN末端においても、パルミンチン酸により修飾されている(PCT特許出願PCT/US 98/15923及びPepinsky等(1998) J. Biol. Chem., 273:14037-14045に記載されている)。脂質係留鎖は、ヘッジホッグシグナルの組織局在化を制限し、おそらく、ヘッジホッグによる短距離-長距離シグナリングの調節機構の部分として進化してきたのであろう。

40

【0004】

様々な神経の癌を含むある種の病理学的状態は、ヘッジホッグタンパク質の過剰発現により引き起こされる。これらの状態その他に関して、ヘッジホッグレセプタータンパク質に

50

結合し得るがヘッジホッグによるシグナリングを誘出せず、それ故、ヘッジホッグ活性に対するアンタゴニストとして働くヘッジホッグのバージョンを開発することは有用であろう。

【0005】

発明の要約

我々は、成熟ヘッジホッグタンパク質のN末端システインが生物学的活性に重要であること及びN末端の変化を含むあるヘッジホッグの変異体がヘッジホッグ機能をブロックし得ることを発見した。これらの変異体を機能的アンタゴニストとして役立たせることができることを発見した。これらのポリペプチドは、ヘッジホッグレセプター、パッチト-1に結合する能力を有するが、ヘッジホッグ依存性の応答を誘出する能力を有しないか又は減じた能力を有している。

10

【0006】

この発明の一つの面は、ヘッジホッグポリペプチドの単離された機能的アンタゴニストである。かかるヘッジホッグポリペプチドが機能的ヘッジホッグアンタゴニストであるかどうかを決定する一次アミノ酸配列の臨界的特徴は、ヘッジホッグポリペプチドが、(i)成熟ヘッジホッグのCys-1に対応するN末端システインを欠いているか又は(ii)変化した形態の成熟ヘッジホッグのCys-1に対応するN末端システインを含むことである。両方の場合に、このアンタゴニストの構造は、野生型ヘッジホッグの構造に十分に類似していて、C3H10T1/2細胞においてこのタンパク質のヘッジホッグレセプターへの結合を可能にするが、ヘッジホッグ依存性のシグナリング応答の誘導は与えない。このヘッジホッグポリペプチドは、この臨界的な一次アミノ酸配列を含む限り、ヘッジホッグファミリーの任意のメンバーの改変型であってよい。

20

【0007】

それ故、一具体例において、この機能的アンタゴニストは、N末端伸長部分を含む。この部分は、成熟ヘッジホッグポリペプチドのCys-1に対応するN末端システインを含むことができる。この具体例においては、N末端伸長部分は、成熟ヘッジホッグポリペプチドのCys-1に対応するN末端システインが生物学的活性を示すのを効果的に阻止する。このN末端伸長部分は又、成熟ヘッジホッグポリペプチドのCys-1を置き換えることができる。

【0008】

他の具体例において、この機能的アンタゴニストは、成熟ヘッジホッグポリペプチドのCys-1に対応するN末端システインから始まるアミノ酸を最大で約12アミノ酸失っている。

30

【0009】

更に別の具体例において、この機能的アンタゴニストは、成熟ヘッジホッグポリペプチドのCys-1に対応するN末端システインのセリン又はアスパラギン酸等の極性アミノ酸残基又は帯電アミノ酸残基への変異を有する。

【0010】

この発明の他の面は、N末端システインが成熟ヘッジホッグポリペプチドのCys-1に対応するが、もはやこの成熟ペプチドのCys-1の活性を有しない改変形態のN末端システインを含むヘッジホッグポリペプチドを含むヘッジホッグポリペプチドの単離された機能的アンタゴニストである。一具体例において、この機能的アンタゴニストは、N末端システインを酸化形態で有する。

40

【0011】

成熟ヘッジホッグポリペプチドのCys-1は、(a)成熟ソニックヘッジホッグポリペプチドのCys-1；(b)成熟インディアンヘッジホッグポリペプチドのCys-1；及び(c)成熟デザートヘッジホッグポリペプチドのCys-1よりなる群から選択することができる。ヘッジホッグポリペプチドの好適な単離された機能的アンタゴニストは、SEQ ID NO: 5、6、7、8及び9よりなるポリペプチドの群から選択する。

【0012】

50

この発明の更なる面は、少なくとも次の特性を有するを有するヘッジホッグポリペプチドの単離された機能的アンタゴニストである：(i)単離されたタンパク質がレセプターパッチト-1に、成熟ヘッジホッグタンパク質のパッチト-1への結合についての親和性より低い(好ましくは、同じ)親和性で結合すること；及び(ii)単離されたタンパク質が、イン・ビトロでC3H10T1/2細胞ベースのAP誘導アッセイで試験した場合に、アルカリホスファターゼ(AP)の成熟ヘッジホッグタンパク質による誘導をブロックすること。これらの特性を有するアンタゴニストは、成熟ソニック、インディアン又はデザートヘッジホッグのCys-1に対応するN末端システインを欠くヘッジホッグポリペプチドを含むことができる。

【0013】

10

好適具体例において、このアンタゴニストポリペプチドは、SEQ ID NO: 1～8からのアミノ酸配列と少なくとも60%相同なアミノ酸配列を含み、このアンタゴニストポリペプチドは、少なくとも100アミノ酸長である。好ましくは、このアンタゴニストポリペプチドは、機能的アンタゴニスト生物学的活性を示す：即ち(i)この単離されたタンパク質が、成熟ヘッジホッグタンパク質のパッチト-1への結合についての親和性より低い(好ましくは、同じ)親和性でレセプターパッチト-1に結合すること；及び(ii)単離されたタンパク質が、C3H10T1/2細胞ベースのAP誘導アッセイで試験した場合に、APの成熟タンパク質による誘導をブロックすること。

【0014】

単離されたポリペプチド(例えば、RNA又はDNA)も又、請求の範囲に含まれる。この発明の一具体例は、発現に際して、成熟ソニックヘッジホッグのCys-1に対応するN末端システインを欠くヘッジホッグポリペプチドを含む臨界的な一次アミノ酸配列を含む機能的アンタゴニストをコードする単離されたDNA配列である。

20

【0015】

一具体例において、単離されたDNA配列は、成熟ソニックヘッジホッグのCys-1を含むN末端伸長部分を含む機能的アンタゴニストをコードする。他の具体例において、この単離されたDNA配列は、成熟ソニックヘッジホッグのCys-1(最もN末端側のアミノ酸残基)を置き換えるN末端伸長部分を含む機能的アンタゴニストをコードする。

【0016】

他の具体例において、単離されたDNA配列は、成熟ソニックヘッジホッグのCys-1に対応するN末端システインから始まるアミノ酸を最大で約12アミノ酸欠いている機能的アンタゴニストをコードする。

30

【0017】

更に別の具体例において、単離されたDNA配列は、N末端システインの他のアミノ酸残基への突然変異を有する機能的アンタゴニストをコードする。

【0018】

発現に際して、成熟デザート又はインディアンヘッジホッグのCys-1に対応するN末端システインを欠くヘッジホッグポリペプチドを含む臨界的な一次アミノ酸配列を含む機能的アンタゴニストをコードする単離されたポリヌクレオチド(例えば、RNA又はDNA)も又、請求の範囲に含まれる。例えば、この発明の単離されたDNA配列は、成熟デザート又はインディアンのCys-1を含むN末端伸長部分を含む機能的アンタゴニストをコードすることができる。他の具体例において、単離されたDNA配列は、成熟デザート又はインディアンヘッジホッグのCys-1(最もN末端側のアミノ酸残基)を置き換えるN末端伸長部分を含む機能的アンタゴニストをコードする。他の具体例において、単離されたDNA配列は、成熟デザート又はインディアンヘッジホッグのCys-1に対応するN末端システインから始まるアミノ酸を最大で約12個失っている機能的アンタゴニストをコードする。

40

【0019】

他の具体例において、このアンタゴニストポリペプチドは、ここに記載のヘッジホッグアンタゴニスト配列並びに他のN末端及び/又はC末端アミノ酸配列を含む。このアンタゴ

50

ニストポリペプチドは又、SEQ ID NO: 1～4及び5～8からのアミノ酸配列の全部又は断片を、更なるアミノ酸残基に(好ましくは、SEQ ID NO: 1～4及び5～8からの配列をコードするゲノムDNAの5'側のゲノムDNAによりコードされる残基に)読み枠を合わせて融合させて含んでもよい。更に別の好適具体例において、アンタゴニストポリペプチドは、第1のポリペプチド部分と該ポリペプチド部分(例えば、アンタゴニストポリペプチドに無関係なアミノ酸配列を有する第1の付加的ポリペプチド部分)の5'側又は3'側に融合又は結合されたヘッジホッグアンタゴニスト部分とを有するタンパク質である。即ち、この付加的ポリペプチド部分は、例えば、アンタゴニスト部分のN末端又はC末端に融合又は結合されたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、DNA結合ドメイン又はポリメラーゼ活性化ドメイン、ヒスチジンタグ、免疫グロブリン若しくはその部分の何れかであってよい。この発明のポリペプチドは、同義遺伝子の存在、選択的転写事象、選択的RNAスプライシング事象及び選択的翻訳及び非翻訳事象の結果として生じるものを含む。このポリペプチドは、天然の細胞において発現されるヘッジホッグアンタゴニストを発現させたときに存在するのと実質的に同じ翻訳後修飾を生じる系例えば培養細胞において、又は自然の細胞で発現させたときに存在する翻訳後修飾の脱落を生じる発現させることができる。

10

【0020】

この発明の他の面は、N末端システインが成熟ソニックヘッジホッグのCys-1に対応する、修飾形態のN末端システインを含むヘッジホッグポリペプチドを含む機能的アンタゴニストをコードする単離されたDNA配列である。一具体例において、このDNA配列は、N末端伸長部分の一部として含まれるN末端システインを有する機能的アンタゴニストをコードする。

20

【0021】

好適DNA配列は、SEQ ID NO: 1～4及び5～8よりなる群から選択するヘッジホッグポリペプチドをコードする。

【0022】

この発明の更なる面は、少なくとも下記の特性を有するヘッジホッグポリペプチドの機能的アンタゴニストをコードする単離されたDNA配列である：(i)単離されたタンパク質がレセプターパッチト-1に、成熟ヘッジホッグタンパク質のパッチト-1に対する結合親和性より低い但至少とも類似の親和性で結合し；及び(ii)この単離されたタンパク質が、イン・ビトロでC3H10T1/2細胞ベースのAP誘導アッセイで調べたときに、成熟ヘッジホッグタンパク質によるAPの誘導をブロックする。これらの特性を有するアンタゴニストをコードするDNA配列は、最も好ましくは、成熟ソニックヘッジホッグのCys-1に対応するN末端システインを欠くヘッジホッグポリペプチドをコードする。この発明のDNA配列が、ソニックヘッジホッグ、インディアンヘッジホッグ及びデザートヘッジホッグよりなる群から選択する脊椎動物ヘッジホッグポリペプチドをコードするDNA等の脊椎動物ヘッジホッグファミリーのメンバーであるヘッジホッグポリペプチドをコードすることは好ましい。

30

【0023】

ヘッジホッグポリペプチドの機能的アンタゴニストをコードする好適DNA配列は、下記よりなる群から選択するポリヌクレオチドを含む：

40

(a) SEQ ID NO: 16及び17；

(b) 標準的ハイブリダイゼーション条件下で前記の配列の何れかにハイブリダイズし且つヘッジホッグポリペプチドの機能的アンタゴニストの活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；及び

(c) 発現に際して、前記のポリヌクレオチド配列の何れかによりコードされるタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0024】

尚更なる好適具体例において、この発明のアンタゴニストポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、標準的条件下で、SEQ ID NO: 16及び17からの少なくとも12の連続

50

するヌクレオチドに対応するポリヌクレオチドプローブにハイブリダイズする。この発明の他の具体例は、ポリペプチドSEQ ID NO: 1～4及び5～8より選択する群のポリペプチドと少なくとも60%相同であるヘッジホッグポリペプチドをコードするDNA配列を含む。

【0025】

主題のアンタゴニストポリヌクレオチドは、例えば発現ベクターとしての利用に適したヘッジホッグアンタゴニスト遺伝子配列を与えるように、ヘッジホッグアンタゴニスト遺伝子配列に機能的に結合された転写調節配列例えば転写プロモーター又は転写エンハンサー配列の少なくとも1つを含むことができる。

【0026】

従って、この発明の他の面は、発現に際して、成熟ヘッジホッグポリペプチドのCys-1に対応するN末端システインを欠くヘッジホッグポリペプチドを含むコア物理的構造を含む機能的アンタゴニストをコードするDNA配列を含むベクター及びこのベクターを含む宿主細胞である。他の面において、この発明は、発現に際して機能的ヘッジホッグアンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを含む細胞又は細胞の精製調製物を特徴とする。この細胞調製物は、ヒト又は非ヒト細胞例えばマウス、ハムスター若しくはラットの細胞、ウサギの細胞、サル若しくはブタの細胞よりなっておりよい。好適具体例において、これらの細胞は、アンタゴニストトランスジーン例えばアンタゴニスト遺伝子の異質形態を含む。治療用組成物も又、この発明に包含されることが意図される。治療用組成物は、この発明の機能的アンタゴニストポリペプチドを許容し得るキャリアーと共に含む。好ましくは、アンタゴニストポリペプチド及び少なくとも一種の付加的成分例えばキャリアー、希釈剤又は溶剤を含む組成物も又、この発明に含まれる。この付加的成分は、この組成物を、イン・ビトロ、イン・ビボの医薬的利用又は獣医学的利用に有用なものであるものとしてよい。

【0027】

機能的ヘッジホッグアンタゴニストの製造方法は、この発明の更なる面である。一つの方法は、成熟ヘッジホッグポリペプチドの残基Cys-1に対応する残基からのヘッジホッグポリペプチドのN末端システイン残基を成熟ヘッジホッグポリペプチドのCys-1に対応しない残基に変えることを含む。この方法は、単離されたヘッジホッグポリペプチドを、生成する断片がCys-1を含まないようにタンパク質分解にさらすステップを含むことができる。

【0028】

機能的ヘッジホッグアンタゴニストタンパク質の他の製造方法は、機能的アンタゴニストタンパク質を宿主細胞からこの発明のDNA配列とベクターを用いて発現させ、次いで、その発現させたアンタゴニストタンパク質を精製することを含む。機能的ヘッジホッグアンタゴニストタンパク質の更なる製造方法は、ヘッジホッグタンパク質を宿主細胞からこの発明のDNA配列とベクターを用いて発現させ、次いで、その発現されたタンパク質を改変してこの発明のアンタゴニストタンパク質を形成することを含む。この改変は、少なくとも一の化学的部分のヘッジホッグタンパク質への付加(制限はしないが、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)付加及びデキストランの付加)を含むことができる。

【0029】

患者におけるヘッジホッグ依存性シグナリングを阻害する好適な治療方法は、その患者に、この発明の治療用組成物を投与することを含む。それ故、この好適な発明は、病気(例えば、異所的又は望ましくないレベルのヘッジホッグポリペプチドを特徴とする病気)の危険にある哺乳動物例えばヒトを治療する方法を特徴とする。一つの遺伝子治療方法は、その哺乳動物に治療剤(例えば、有効量のアンタゴニストポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)を投与することを含む。他の具体例において、この方法は、その哺乳動物に、有効量のアンタゴニストポリペプチドを投与することを含む。好適具体例において、この病気は、様々な中枢神経系の細胞の過形成及び新生物形質転換の一種である。一般に、この発明のアンタゴニストは、広範囲の細胞、組織及び臓器の機能的性能の調節に有用

10

20

30

40

50

であり、神経防護、神経再生及び神経機能の調節の範囲の治療用途を有している。遺伝子治療における利用のための更なる治療用組成物は、機能的アンタゴニストトランスジーンを含むこの発明のベクタを含む。

【0030】

これらのアンタゴニストポリペプチド及びポリヌクレオチドは、ヘッジホッグ活性をイン・ビボ又はイン・ビトロで調節することのできるペプチド分子の製造に；ヘッジホッグレセプターの活性化の分析に；アンタゴニストを発現する細胞の同定又はアンタゴニスト発現のレベルの評価に有用な抗アンタゴニスト抗体の生成に；ヘッジホッグ活性をイン・ビボ又はイン・ビトロで調節するのに利用できるヘッジホッグのアンタゴニスト断片の製造に有用である。

10

【0031】

発明の詳細な説明

I. 定義

この発明を今から下記の詳細な説明を参照しながら説明するが、それは、下記の定義を含む：

「アミノ酸」－ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質のモノマーユニット。天然のペプチド、ポリペプチド及びタンパク質中には、20種類のアミノ酸が見出され、そのすべてはL-異性体である。この用語は又、アミノ酸の類似体、修飾アミノ酸残基、並びにタンパク質アミノ酸及びそれらの類似体のD-異性体をも包含する。

20

【0032】

「タンパク質」－本質的に20種類のアミノ酸の任意のものよりなる任意のポリマー。しばしば「ポリペプチド」を比較的大きいポリペプチドに関して用い、「ペプチド」を小さいポリペプチドに関して用いるが、これらの用語の当分野での使用は、重複しており変更される。用語「タンパク質」は、ここで用いる場合、別途記載のない限り、ペプチド、タンパク質及びポリペプチドをいう。

【0033】

「N末端」－成熟形態のタンパク質の第一番目のアミノ酸(アミノ酸番号1)をいい、「成熟形態」のタンパク質は、任意のシグナルその他の配列の除去後の一次アミノ酸配列よりなる。

【0034】

「N末端システイン」は、ヘッジホッグタンパク質のN末端を占める任意のシステインをいう。「成熟」ソニックヘッジホッグN末端断片のCys-1 (SEQ ID NO: 3のアミノ酸残基番号1)は、シグナル領域を含む遺伝子配列によりコードされるアミノ酸残基1～23が除去されて「成熟」タンパク質を形成するので、ソニックヘッジホッグ遺伝子配列の残基番号24に対応する。特に、

30

【0035】

「N末端システイン」は、ヒトソニックヘッジホッグポリペプチド配列において占めるのと同じ位置を、ヘッジホッグポリペプチドにおいて占める。特に、「N末端システイン」は、SEQ ID NO: 2～4における第1のアミノ酸残基としてのアミノ酸残基番号1をいう。他のヘッジホッグタンパク質のN末端システインは、成熟ソニックヘッジホッグのCys-1に正確には対応し得ないということは理解されよう。例えば、シグナル配列の異なる長さ及び配列のために、ソニックヘッジホッグ配列の残基番号24のシステイン(シグナル配列の除去後の成熟形態の[SEQ ID NO: 3]のCys-1)は、インディアンヘッジホッグの残基番号28のシステイン(SEQ ID NO: 2の最初のアミノ酸残基)に対応し、デザートヘッジホッグの残基番号23のシステイン(SEQ ID NO: 4の最初のアミノ酸残基)に対応する。これらのタンパク質の最大の相同性は、これらのシステイン(成熟タンパク質中のCys-1)を図1に示したように整列させることにより得られる。それにもかかわらず、当業者は、成熟タンパク質の任意所定の「N末端システイン」の正確な残基番号がヘッジホッグファミリーの異なるメンバー間で僅かに変動し得ることを認めよう。更に、当業者は、所定のヘッジホッグポリペプチドのどの残基が実際にN末端残基であるのかを測定す

40

50

ることができよう。本発明は、この変化性により制限されることを意図していない。

【0036】

「N末端伸長部分」は、N末端システインからの5'伸長をいい、少なくとも1つの個別のユニット(「エレメント」)を含む。N末端伸長部分のエレメントの1つ(例えば、アミノ酸残基)は、成熟ヘッジホッグポリペプチドのN末端システインを置き換えることができる。

【0037】

「機能的アンタゴニスト」は、タンパク質の機能をイン・ビトロ又はイン・ビボで阻害することのできる因子(例えば、ヘッジホッグタンパク質)をいう。更に、この用語は、C3H10T1/2細胞におけるヘッジホッグ依存性応答の誘出には不活性であるが、ヘッジホッグレセプターへの結合についてヘッジホッグと競争するヘッジホッグタンパク質を包含する。

10

【0038】

「断片」は、単離されたアンタゴニストに適用する場合、アンタゴニスト活性を保持していれば、単一アミノ酸程に小さくてもよい。それは、少なくとも約10残基、一層典型的には少なくともやく40残基、好ましくは約100残基長であってよい。断片は、当業者に公知の方法により生成することができる。単離されたヘッジホッグの生物学的活性を示す候補断片の能力も、ここに記載したような当業者に公知の方法によって評価することができる。

【0039】

20

この発明のヘッジホッグアンタゴニストの「機能的同等物」は、ヘッジホッグアンタゴニストと異なるアミノ酸残基を有してよいが、それにもかかわらず機能的アンタゴニストとして作用する因子である。

【0040】

「遺伝子の融合」—2つ以上のタンパク質又はその断片の、それらをコードするポリヌクレオチド分子の遺伝子発現による、個々のペプチド主鎖の共直線的な共有結合をいう。

【0041】

「変異体」—生物の遺伝物質の任意の変化、特に野生型ポリヌクレオチド配列における任意の変化(即ち、欠失、置換、付加又は変化)又は野生型タンパク質における任意の変化。

【0042】

30

「野生型」—タンパク質のエキシソンの天然のポリヌクレオチド配列若しくはその部分、又はイン・ビボで正常に存在する通りのタンパク質配列若しくはその部分。

【0043】

「成熟」ヘッジホッグタンパク質—「成熟」は、プロセッシングを受けたN末端ドメインを含む野生型配列をいう。例えば、ヒトソニックヘッジホッグ(Shh)の残基24~197、ヒトインディアンヘッジホッグ(Ihh)の残基23~197、ヒトデザートヘッジホッグ(Dhh)の残基28~203。成熟ヘッジホッグタンパク質の天然型は翻訳後修飾を受けるが、ここで用いる組換えバージョンの幾つかは、これらの修飾を欠くが、尚活性であり、成熟と呼ぶ。

【0044】

40

用語「ポリヌクレオチド配列」と「ヌクレオチド配列」は、交換可能に用い、ここで用いる場合、断片及び同等物を含むことができる。用語「同等物」は、機能的に同等なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列をいう。「同等な」ヌクレオチド配列は、少なくとも1ヌクレオチドの置換、付加又は欠失により異なる配列例えば対立遺伝子変異体を含み、遺伝コードの縮重のためにこの発明のヘッジホッグアンタゴニストをコードするヌクレオチド配列と異なる配列を含む。

【0045】

「標準的ハイブリダイゼーション条件」—0.5×SSC~約5×SSC及び65℃に実質的に等しいハイブリダイゼーション及び洗浄の両方のための塩及び温度条件。用語「標準的ハイブリダイゼーション条件」は、それ故、ここで用いる場合、操作的定義であり、

50

ハイブリダイゼーション条件の範囲を包含する。一層高緊縮の条件は、例えば、ブラスクリンバッファー(0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%フィコール400; 0.2%ウシ血清アルブミン、50mMトリス-HCl(pH7.5); 1M NaCl; 0.1%ピロリン酸ナトリウム; 1%SDS); 10%デキストラン硫酸及び100(g/ml変性超音波処理済サケ精子DNAを用いて65℃で12~20時間ハイブリダイズさせ、75mM NaCl/7.5mMクエン酸ナトリウム(0.5×SSC)/1%SDSで65℃で洗浄する。一層低緊縮の条件は、例えば、ブラスクリンバッファー、10%デキストラン硫酸及び110(g/ml変性超音波処理済サケ精子DNAを用いて55℃で12~20時間ハイブリダイズさせ、300mM NaCl/30mMクエン酸ナトリウム(2.0×SSC)/1%SDSで、55℃で洗浄する。Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York, 6.3.1-6.3.6節(1989)も参照されたい。

10

【0046】

「発現制御配列」—遺伝子に機能的に結合された場合に、その遺伝子の発現を制御し、調節するポリヌクレオチド配列。

【0047】

「機能的に結合された」—ポリヌクレオチド配列(DNA、RNA)は、発現制御配列がそのポリヌクレオチド配列の転写及び翻訳を制御し、調節する場合に、機能的に発現制御配列に結合される。用語「機能的に結合された」は、適当な開始シグナル(例えば、ATG)を発現されるべきポリヌクレオチド配列の前に有すること及び、発現制御配列の制御下でのポリヌクレオチド配列の発現及びそのポリヌクレオチド配列によりコードされる所望のポリペプチドの生成を可能にする正しい読み枠を維持することを包含する。

20

【0048】

「発現ベクター」—宿主細胞に導入された場合に、少なくとも一つの遺伝子の発現を可能にするポリヌクレオチド例えばDNAプラスミド又はファージ(他の一般的例の内)。このベクターは、細胞中で、複製することができてもできなくてもよい。

【0049】

「単離された」(「実質的に純粋な」と交換可能に用いる)—ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド即ちポリヌクレオチド配列に適用する場合、その起源又は操作により、(i)それが天然において結合しているすべてのポリヌクレオチドと結合してなく(例えば、宿主細胞中で発現ベクター又はその部分として存在し);又は(ii)それが天然において結合していた部分以外のポリヌクレオチド又は他の化学的部分に結合されており;又は(iii)天然に存在しないRNA若しくはDNAポリヌクレオチド、ゲノムポリヌクレオチドの部分、cDNA又は合成ポリヌクレオチドを意味する。「単離された」は、更に、(i)イン・ビトロで例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅され;(ii)化学合成され;(iii)クローニングにより組換え技術で生成され;又は(iv)開裂及びゲル分離等により精製されるポリヌクレオチド配列を意味する。従って、「実質的に純粋なポリヌクレオチド」は、それが得られた生物の天然のゲノムにおいて通常隣接しているコード配列の一方又は両方と直接隣接していないポリヌクレオチドである。実質的に純粋なDNAは又、更なるヘッジホッグ配列をコードするハイブリッド遺伝子の部分である組換えDNAをも包含する。

30

40

【0050】

「単離された」(「実質的に純粋な」と交換可能に用いる)—ポリペプチドに適用する場合は、その起源又は操作によって、(i)発現ベクターの一部の発現産物として宿主細胞中に存在し;又は(ii)それが天然で結合していたもの以外のタンパク質又は他の化学的部分に結合しており;又は(iii)天然に存在しないポリペプチド又はその部分を意味する。

「単離された」は、更に、(i)化学合成された;又は(ii)宿主細胞で発現されて結合タンパク質から精製されたタンパク質を意味する。この用語は、一般に、天然において共存していた他のタンパク質及びポリヌクレオチドから分離されたポリペプチドを意味する。好ましくは、このポリペプチドは、それを精製するために用いた物質例えば抗体又はゲル

50

マトリクス(ポリアクリルアミド)からも分離されている。

【0051】

「異質プロモーター」—ここで用いる場合、これは、自然には遺伝子又は精製ポリヌクレオチドと結合していないプロモーターである。

【0052】

「相同な」—ここで用いる場合、これは、用語「同一」と同義語であり、2つのポリペプチド、分子間の又は2つのポリヌクレオチド間の配列類似性をいう。2つの比較する配列の両方のある位置が同じ塩基又はアミノ酸モノマーサブユニットで占められていれば(例えば、2つのDNA分子の各々のある位置がアデニンで占められており、又は2つのポリペプチドの各々のある位置がリジンで占められていれば)、それぞれの分子は、その位置で相同である。2つの配列の間の相同性パーセンテージは、それらの2つの配列により共有されるマッチング位置又は相同位置の数を比較した位置の数で除したものを100倍したものの関数である。例えば、2つの配列中の10の位置の内の6がマッチし又は相同であるならば、これらの2つの配列は、60%相同である。例えば、DNA配列CTGACTとCAGGTTは、50%相同性を共有している(6の全位置の内の3がマッチしている)。一般に、比較は、2つの配列を最大の相同性を与えるように整列させて行う。かかるアラインメントは、例えば、Needleman等,J.Mol Biol.48:443-453(1970)の方法を用いて与えることができ、便利にコンピュータープログラム例えばAlignプログラム(DNAstar, Inc.)により実行することができる。相同な配列は、同一の又は類似のアミノ酸残基を共有しており、類似の残基は、整列された参照配列中の対応するアミノ酸残基についての保存的置換体であり、又は「許された点突然変異」である。この点について、参照配列中の残基の「保存的置換」は、対応する参照残基に物理的又は機能的に類似する置換である(例えば、類似の大きさ、形状、電荷、共有結合又は水素結合を形成する能力を含む化学的特性等を有するもの)。特に好適な保存的置換は、Dayhoff等、5:Atlas of Protein Sequence and Structure, 5: 前書、3, 22章:354-352, Nat.Biomed.Res.Foundation, Washington, D.C. (1978)で「許容される点突然変異」について規定された基準を満たすものである。

【0053】

この発明の「ヘッジホッグタンパク質」は、少なくともSEQ ID NO: 2~4よりなる一部分を有することにより定義される。この用語は又、ヘッジホッグポリペプチド又はヘッジホッグポリペプチドの機能的変異体又はヘッジホッグポリペプチド若しくは機能的変異体の生物学的活性を有する類似体をも意味する。

【0054】

用語「ペプチド」、「タンパク質」及び「ポリペプチド」は、ここでは、交換可能に用いられる。用語「ポリヌクレオチド配列」及び「ヌクレオチド配列」も又、ここでは、交換可能に用いられる。用語「ヘッジホッグ断片」は、「ヘッジホッグ」と交換可能に用いられる。

【0055】

ヘッジホッグ分子は、それが、次の特性の少なくとも一つを有するならば、「生物学的活性」を有する:(i)その分子は、ここに規定したヘッジホッグ共通基準を満たし(SEQ ID NO: 4)且つそのレセプターパッチト-1に結合する能力を有し又は、発現に際してこの特性を有するポリペプチドをコードすること;(ii)その分子は、ここに規定したヘッジホッグ共通基準を満たし又は、発現に際してこの特性を有するポリペプチドをコードすること;及び(iii)C3H10T1/2細胞においてアルカリホスファターゼ活性を誘導すること。

【0056】

本発明の実施は、別途指示しない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、微生物学、組換えDNA、タンパク質化学及び免疫学の慣用的技術を用いるが、これらは、当分野の技術範囲内である。かかる技術は、文献に記載されている。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版、(Sambrook, Fritsch 及び Maniatis編), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; DNA Cloning, 第I及びII巻(D.N.Glover編), 1985; Oligon

10

20

30

40

50

nucleotide Synthesis, (M.J.Gait編)、1984; 米国特許第4, 683, 195号(Mullis等); Polynucleotide Hybridization (B.D.Hames及びS.J.Higgins編)、1984; Culture of Animal Cells (R.I.Freshney編). Alan R.Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1989; A Practical Guide to Molecular Cloning (B.Perbal), 1984; Methods in Enzymology, 第154及び155巻(Wu等編)、Academic Press, New York; Gene Transfer Vector for Mammalian Cells (J.H.Miller及びM.P.Calos編), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer及びWalker編), Academic Press, London, 1987; Handbook of Experimental Immunology, 第I-IV巻 (D.M.Weir及びC.C.Blackwell編), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986を参照されたい。

10

【0057】

この発明の他の特徴及び利点は、下記の詳細な説明及び請求の範囲から明らかとなろう。別に指示しない限り、発明の詳細な説明中で引用したすべての参考文献を本明細書中に参考として援用する。発明の背景中の参考文献は、従来技術ではない。

【0058】

II. ヘッジホッグタンパク質の一般的特徴

本発明の機能的アンタゴニストは、単離されたヘッジホッグタンパク質から得ることができる。従って、ソニック、インディアン又はデザートを機能的アンタゴニストに変換することができる。

【0059】

単離されたヘッジホッグタンパク質は、ヘッジホッグファミリーの天然の又は組換えのタンパク質であり、無脊椎動物又は脊椎動物起源から得ることができる(下記参照)。脊椎動物のヘッジホッグタンパク質のファミリーのメンバーは、キイロショウジョウバエヘッジホッグ(hh)遺伝子によりコードされるタンパク質と相同性を共有している(Mohler及びVani, (1992) Development 115, 957-971)。今日まで、マウスのゲノムライブラリーとcDNAライブラリーの組み合わせたスクリーニングは、デザートヘッジホッグ(Dhh)、ソニックヘッジホッグ(Shh)及びインディアンヘッジホッグ(Ihh)と呼ばれる3つの哺乳動物hh対応物を同定しており、これらは、他の哺乳動物例えばヒト並びに魚類及び鳥類にも存在する。他のメンバーは、ムーンラットヘッジホッグ(Mhh)並びにティギューウィングルヘッジホッグ(Twhh)及びハリモグラヘッジホッグ(Ehh)を包含する。

20

30

【0060】

ヘッジホッグ遺伝子は、糖タンパク質をコードし、これは、開裂されて、シグナリングの原因である約20kDaのN末端ドメイン(SEQ ID NO: 2~4及び図1)及び約25kDaのカルボキシ末端断片を生じる。この20kDaの部分を含む様々な他の断片が、「単離されたヘッジホッグタンパク質」の定義内にあると考えられる。これらの配列並びにそれらの化学的及び物理的特性を開示している刊行物には、Hall等(1995) Nature 378, 212-216; Ekker等(1995) Current Biology 5, 944-955; Fan等(1995) Cell 81, 457-465; Chang等(1994) Development 120, 3339-3353; Echelard等(1993) Cell 75, 1414-1430 34-38; PCT特許出願WO 95 23 223 (及び)が含まれる。

【0061】

ヘッジホッグ同族体には、対立形質的、系統発生的相当物などの、自然に存在するあらゆる天然ヘッジホッグ蛋白質; 又はムテイン又は突然変異蛋白質などの、天然に起こる、化学的に合成した、あるいは組換えによる、他の変異体、活性を有する新規なヘッジホッグ同族体などが含まれる。アンタゴニストの作成に特に有用なヘッジホッグポリペプチドは、配列番号2~4である。

40

【0062】

III. ヘッジホッグアンタゴニスト

本発明のポリペプチドで最も好ましいものは、天然又は組換えヘッジホッグ蛋白質(例えば、上記したSonic、Indian又はDesertヘッジホッグ蛋白質から得られる、脊椎動物科蛋白質などの、単離ヘッジホッグ)の生物学的活性に対するアンタゴニ

50

トである。機能的なアンタゴニストは、少なくとも以下の特性を有する。(i) 単離蛋白質は、成熟ヘッジホッグ蛋白質による *patched-1* への結合に比べて、おそらくはより少ない親和性で、しかし好ましくは少なくとも同程度の親和性で、受容体 *patched-1* に結合する。(ii) CR310T1/2細胞を用いた生体外アルカリホスファターゼ (AP) 誘導アッセイで試験した時、単離蛋白質は、成熟ヘッジホッグ蛋白質による AP 誘導を阻害する。本発明のアンタゴニストは更に以下の特徴を有してもよい。(iii) *ptc-1* 及び *gli-1* 発現を誘発することができない。

【0063】

当業者は、ヘッジホッグアンタゴニストと推定されるものについて、これらの特徴を容易に調べることができるであろう。より具体的に述べると、マウスの胚繊維芽細胞系 C3H10T1/2 は、ヘッジホッグ応答性の間充織幹細胞系である。細胞をヘッジホッグで処理することによって、*gli-1* 及び *patched-1* (公知のヘッジホッグ依存性シグナル伝達の指標) のアップレギュレーションが起こり、さらにアルカリホスファターゼ活性が誘導される。これが軟骨細胞/骨芽細胞系統に細胞が分化したことの指標となる。本発明者らは幾つかのヘッジホッグ変異体の系統パネルを作成し研究した結果、ある種の変異体は、C3H10T1/2細胞におけるヘッジホッグ依存性応答の誘導について不活性であるだけでなく、その機能について成熟ヘッジホッグと競合する、すなわち機能的アンタゴニストとして作用することを発見した。

【0064】

A. アンタゴニストとしてのN末端改変ヘッジホッグポリペプチド

本発明者らはN末端を改変したある種のヘッジホッグ変異体は、ヘッジホッグ依存性応答を誘導する能力を持たないが、ヘッジホッグ受容体である *patched-1* に結合する能力を保持しているため、ヘッジホッグ機能を阻害するということを発見した。

【0065】

ヘッジホッグポリペプチド (すなわち *Sonic*、*Indian* 又は *Desert* ヘッジホッグ) が、ヘッジホッグの機能的アンタゴニストであるかどうかを決定する主要な一次アミノ酸配列は、成熟ヘッジホッグの *Cys-1* に相当するN末端システイン残基である (図1参照)。ヘッジホッグポリペプチドがこのN末端システインを完全に欠損しているか、このN末端システインを改変した形状で有している (例えば化学的に改変するか、N末端の伸長基の部分として) 限りは、得られるポリペプチドはヘッジホッグの機能的アンタゴニストとして作用することができる。これに関して、N末端システインが「*Cys-1* に相当する」ということは、(a) N末端システインが成熟 *Sonic*、*Indian* 又は *Desert* ヘッジホッグの *Cys-1* である、又は (b) N末端システインが、成熟 *Sonic*、*Indian* 又は *Desert* ヘッジホッグの *Cys-1* と同じ位置を占める、ということを意味している。例えば仮に *Sonic* ヘッジホッグが、本明細書に記すように変化したさもなくば改変した、*Cys-1* に相当するN末端システインを有するとすると、そのヘッジホッグは、他のあらゆるヘッジホッグ同族体の活性に拮抗することになる。本発明者らは *Sonic* 及び *Indian* ヘッジホッグの活性に拮抗する *Sonic* ヘッジホッグ蛋白質、並びに *Sonic* ヘッジホッグの活性に拮抗する *Desert* ヘッジホッグ蛋白質を作成した。従って当業者は、本発明に詳述する方法に従って、*Sonic*、*Desert* 又は *Indian* ヘッジホッグの活性に拮抗する *Indian* ヘッジホッグ蛋白質を作成することが可能であることが理解されるであろう。

【0066】

こうしたN末端改変の例を本明細書に記載するが、当業者は、ここに記載のアンタゴニストの構造を、例えば断片又は類似体を作成することによって改変することができるし、新たに作成した構造体について、アンタゴニスト活性を有するかどうかを試験することができるであろう。断片及び類似体の作成及び試験を可能にする従来方法の例は下記に詳述する。これらの又は類似の方法を用いて、アンタゴニストポリペプチドの断片及び類似体を作成及びスクリーニングすることができる。従って本発明に含まれる変異体は幾つも存在する。

【0067】

1. N末端伸長

本発明のアンタゴニストポリペプチドは、N末端システインがN末端伸長基に結合した、ヘッジホッグポリペプチド配列を含んでいてもよい。従って例えば、単離アンタゴニストポリペプチドは、下記の特徴を有する組換え融合蛋白質であってもよい（ただしこれに限定されるものではない）。（a）ヘッジホッグポリペプチド本体の5'側に位置することができ、ヘッジホッグとは関係のない少なくとも1個の要素（例えばアミノ酸残基）を含む第一のN末端ポリペプチド部分を有する。（b）本発明のヘッジホッグアンタゴニストの一部である、SonicヘッジホッグのCys-1に相当するN末端システインに、又はヘッジホッグアンタゴニストの一部に連結する。このN末端伸長基（例えば第一のN末端ポリペプチド部分）の例としては、ヒスチジントグ、マルトース結合蛋白質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、DNA結合領域、又はポリメラーゼ活性化領域が挙げられる。機能的アンタゴニストは、成熟ヘッジホッグのCys-1に置き換わる要素又は成熟SonicヘッジホッグのCys-1に相当するN末端システインを含む、N末端伸長基を有していてもよい。そのようなアンタゴニストは、配列番号1で表わされる。ここではCys-1自体は改変されていないが、N末端伸長基部分としての要素（すなわち、アミノ酸残基）に結合している。理論に拘泥されることは望まないが、この蛋白質がアンタゴニスト特性を有するのは、N末端伸長基（ヒスチジントグ）が、伸長基が存在しない場合には機能するN末端システインが機能するのを阻害することが理由だと思われる。

10

【0068】

2. N末端欠失

他の態様において、機能的アンタゴニストは、成熟ヘッジホッグのCys-1に相当するN末端システインに始まる約12個未満のアミノ酸を欠損する。最初の連続するアミノ酸残基が約12個以上欠失している場合には、機能的アンタゴニストにならないことが判明した。約10個の連続したアミノ酸を欠失したものが、好適な機能的アンタゴニストとして作用する。しかし、10個未満の連続した残基を欠失させても、アンタゴニスト機能は保持されていた。更に、少なくとも合計約3個の残基を欠失させる場合には、不連続の残基を様々な組合わせで欠失させることもできる。

20

【0069】

以下、幾つかのそのようなSonicヘッジホッグアンタゴニスト：Shh（“N-10”）（配列番号5：N末端領域の最初の10個のアミノ酸を欠損する）；Shh（“N-9、C-3”）（配列番号6：N末端システインに始まる最初の9個のアミノ酸残基を欠損し、C末端からの最後の3個の残基を欠損する）；Shh（“N-5”）（配列番号7：N末端システインに始まる最初の5個のアミノ酸残基を欠損する）について述べる。

30

【0070】

これらの構造を調べることによって、ヘッジホッグ蛋白質のN末端が有する機能の重要性が明らかになる。全ての変異体は、patched-1への結合能については成熟Sonicヘッジホッグ（Shh）と区別がつかなかったが、生体外のC3H10T1/2AP誘導アッセイでは不活性であった。“N-10”（配列番号5）変異体については、ptc-1及びgli-1発現の誘導能についても試験したが、不活性であった。これらN末端変異体の全てがヘッジホッグ依存性シグナル伝達を誘導することができなかった。

40

【0071】

3. N末端突然変異体

更に他の態様においては、機能的アンタゴニストは、N末端システインが突然変異で他のアミノ酸残基に置換されている。どのアミノ酸残基を用いてもよい。当業者は本明細書の開示に従うことによって、突然変異を行い、得られる突然変異体の作用を調べることができる。その一例として、N末端システインがセリン残基で置換されたShh（“C1S”）（配列番号8）が挙げられる。この突然変異体は、patched-1への結合能について成熟Shhと区別がつかないが、C3H10T1/2AP誘導アッセイにおける機能を試験した場合、成熟ShhによるAP誘導を阻害した。配列番号8のShhを、ptc

50

－ 1 及び g l i－ 1 発現の誘導能についても試験したところ、不活性であった。

【 0 0 7 2 】

4. N末端システイン改変

ヘッジホッグの一次アミノ酸配列は生物学的活性にとって重要な C y s－ 1 を含んでいるので、ある種の他の改変によって、ヘッジホッグ蛋白質の不活性なアンタゴニスト変異体が得られると予想される。本発明の他の特徴は、ヘッジホッグポリペプチドの、単離された機能的アンタゴニストであり、これはシステインが改変されていることを除いては、成熟 S o n i c ヘッジホッグの C y s－ 1 に相当する N末端システインを含む、ヘッジホッグポリペプチドを包含する。本発明のアンタゴニストポリペプチドは、N末端システインの生体内又は生体外での化学的変性、並びにアセチル化、メチル化、リン酸化、アミド化、カルボキシル化又は糖化といった様々な変化を含む、配列ではない改変を有してもよい。例えば機能的アンタゴニストは、酸化した N末端システインを有することができる。機能的アンタゴニストは、N末端伸長基の一部として包含することによって、効果的に改変できる N末端システインを有することができることが本発明者らによって示されている。

【 0 0 7 3 】

B. 他の態様

本発明のアンタゴニストポリペプチドは、配列番号 1～ 8 及び 1 1 のアミノ酸配列と、少なくとも 6 0 % の相同性を有するアミノ酸配列を含むことができる。アンタゴニストポリペプチドは、配列番号 1～ 4、 5～ 8 及び 1 1 の、少なくとも 1 0 0 個の連続するアミノ酸を含むことができる。アンタゴニストポリペプチドは、少なくとも以下の機能的アンタゴニスト特性を有する。(i) 単離蛋白質は、成熟ヘッジホッグ蛋白質による p a t c h e d－ 1 への結合に比べて、おそらくはより少ない親和性で、しか好ましくは少なくとも同程度の親和性で、受容体 p a t c h e d－ 1 に結合する。(i i) C H 3 1 0 T 1 / 2 細胞を用いた生体外アルカリホスファターゼ (A P) 誘導アッセイで試験した時、単離蛋白質は、成熟ヘッジホッグ蛋白質による A P 誘導を阻害する。

【 0 0 7 4 】

本発明のポリペプチドは、同義遺伝子の存在、代替的な転写現象、代替的な R N A スプライシング現象、及び代替的な翻訳及び翻訳後現象の結果生じるものを含む。ポリペプチドは、合成によって全体を作成することができるし、あるいは蛋白質が自然に存在する細胞内で発現された時と実質的に同じ翻訳後修飾が得られる系 (例えば培養細胞) 内で、又は自然に存在する細胞内で発現された時に翻訳後修飾が省略される系内で発現することもできる。

【 0 0 7 5 】

好ましい態様においては、単離されたアンタゴニストは下記の特徴を 1 つ以上有するポリペプチドである。

(i) 配列番号 2～ 8 のアミノ酸と、少なくとも 6 0、より好ましくは 9 0、最も好ましくは 9 5 % の配列同一性を有する；

(i i) 改変された N末端システインを有するか、あるいは N末端システインを欠損するか、ヘッジホッグの C y s－ 1 に相当する N末端システインとは異なる N末端システインを有する；

(i i i) C H 3 1 0 T 1 / 2 細胞中で、成熟ヘッジホッグによるアルカリホスファターゼ誘導を阻害する；

【 0 0 7 6 】

(i v) 成熟ヘッジホッグ蛋白質による p a t c h e d－ 1 への結合に比べて、おそらくはより少ない親和性で、しかし好ましくは少なくとも同程度の親和性で、受容体 p a t c h e d－ 1 と結合または相互に作用する；

(v) 生体外の C H 3 1 0 T 1 / 2 細胞中で、 p t c－ 1 及び g l i－ 1 の発現を誘導することができない；

(v i) C H 3 1 0 T 1 / 2 アッセイで、 A P を誘導することができない。

【 0 0 7 7 】

その上更に、本発明の単離されたヘッジホッグアンタゴニストは、ヘッジホッグとは関係のないC末端配列を更に含む、組換え融合蛋白質であってもよい。したがって、アンタゴニストポリペプチドは、配列番号1～4及び5～8のアミノ酸配列全てまたは断片が読み枠内でアミノ酸残基にさらに融合したものを含んでもよい。本発明のポリペプチドの一例としては、第一のポリペプチド部分及びヘッジホッグアンタゴニスト部分を有する蛋白質が挙げられる。このアンタゴニスト部分は、第一のポリペプチド部分と5'又は3'側で融合又は結合している。従って、まず、追加のポリペプチド部分は、アンタゴニストポリペプチドと関係のないアミノ酸配列を有する。追加のポリペプチド部分の例としては、アンタゴニスト部分のN又はC末端と融合又は結合した、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、DNA結合領域又はポリメラーゼ活性化領域、ヒスチジンタグ、免疫グロブリン又はその部分が挙げられる。さらなる改変ポリペプチドの例としては、ポリエチレングリコール(PEG)及び/又はデキストランなどの化学基を有するものが挙げられる。そのような化学基の追加は、N末端システインに特異的であってもよいし、アンタゴニストポリペプチドの他のアミノ酸残基との結合を通じてよい。PEG又はデキストランといった基や、免疫グロブリン融合体等の構造体を用いれば、治療用に用いられるアンタゴニスト蛋白質の効能半減期を延長させることができる。

10

【0078】

IV. アンタゴニストポリペプチドの発現及び作成

ここに記載した全長ヘッジホッグポリペプチド及びアンタゴニストポリペプチドは、当分野で公知の方法のうち好適なものであればどのような方法を用いても作成できるということを当業者は理解されるであろう。そのような方法としては、蛋白質を直接合成する方法から、上記したアンタゴニストポリペプチド配列を直接コードするDNA配列を作成し、これらのアンタゴニスト配列を好適な形質転換宿主内で発現させる方法まで、多岐に渡るものが挙げられる。あるいは、本発明の機能的アンタゴニストポリペプチドは、全長ヘッジホッグ蛋白質を発現させてから、機能的アンタゴニストを形成するように適当に改変することによって得てもよい。

20

【0079】

A. 機能的アンタゴニストの直接発現

一般に、ヘッジホッグ配列(アンタゴニストであるかどうかに関わらず)を作成するために、ヘッジホッグのアミノ酸配列全体を用いて逆に翻訳した遺伝子を作成することができる(Maniatis他、上述参照)。更に、全長ヘッジホッグをコードするヌクレオチド配列を含むDNAオリゴマーを合成してもよい。例えば、所望のヘッジホッグポリペプチド部分をコードする小さなオリゴヌクレオチドを幾つか合成して連結してもよい。個々のオリゴヌクレオチドは通常、相補的組合せのため5'又は3'に張り出し部分がある。ヘッジホッグcDNAは、配列番号1～8及び11のヘッジホッグポリペプチドをコードする標識付けしたDNA断片でヒトcDNAライブラリーをスクリーニングし、オートラジオグラフィで正のクローンを同定することによって、得ることができる。プラーク精製及びハイブリダイゼーションを更に行う場合も、従来の方法を用いて行うことができる。

30

【0080】

全長ヘッジホッグポリペプチドをコードするDNA配列が得られたら、DNAを改変又は突然変異誘発させて(例えばC及びD章; Zoeller他(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-66、及び米国特許第4,588,585号参照)、機能的アンタゴニストポリペプチドを発現させることができる。組換え方法において、ヘッジホッグポリペプチドの内部断片又は末端断片は、単離ヘッジホッグポリペプチドをコードするDNA配列の一端(末端断片用)又は両端(内部断片用)から1個以上のヌクレオチドを除去することによって、作成することができる。突然変異誘発したDNAを発現することによってポリペプチド断片を得て、生物学的活性を試験する。「末端ニブリング」エンドヌクレアーゼで切断することによって、断片の配列をコードするDNAを作成することもできる。蛋白質断片をコードするDNAは、ランダム剪断、制限

40

50

酵素切断、又はそれらの組み合わせによっても作成することができる。同様のDNA配列を作成する他の方法として、オリゴヌクレオチド合成装置を用いて化学的に合成する方法が挙げられる。そのようなオリゴヌクレオチドは、好ましくは所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づいた構造をもつものであり、好ましくは目的の組換えポリペプチドが内部で作成される宿主細胞に都合のよいコドンが選択される。

【0081】

従って、単離されたポリヌクレオチド（例えばRNA又はDNA）は本発明の範囲に含まれる。これらには、配列番号16及び17及び配列番号1～8及び11をコードする配列が含まれる。本発明の単離ポリヌクレオチドは、N末端システインがN末端伸長基で置換されたヘッジホッグポリペプチド配列を含む、機能的ヘッジホッグアンタゴニストをコードすることができる。従って例えば、単離されたDNA配列は、下記の特徴を有する組換え融合蛋白質をコードすることができる（ただしこれに限定されるものではない）。(a) ヘッジホッグポリペプチド本体の5'側に位置することができ、ヘッジホッグとは関係がなくヘッジホッグのN末端システインを置換する、少なくとも1個の要素（例えばアミノ酸残基）を含む、第一のN末端ポリペプチド部分を有し、(b) ヘッジホッグアンタゴニスト、又はヘッジホッグアンタゴニストの部分である第二のポリペプチドに連結する。本発明の単離ポリヌクレオチドは、成熟ヘッジホッグポリペプチド（例えばSonicヘッジホッグ）のCys-1を含みうるN末端伸長基を有する、機能的アンタゴニストをコードすることもできる。

【0082】

単離DNA配列は、発現に際して、成熟ヘッジホッグ（例えば成熟Sonicヘッジホッグ）のCys-1に相当するN末端システインを欠損した、ヘッジホッグポリペプチドを包含する一次アミノ酸配列を含む、機能的アンタゴニストをコードすることができる。例えば、単離DNA配列又はその部分（例えば配列番号16）は、成熟SonicヘッジホッグのCys-1に相当するN末端システインに始まる約12個未満のアミノ酸を欠損した、機能的アンタゴニスト（配列番号5～7参照）をコードすることができる。N末端システインを他のアミノ酸残基に置換した突然変異を有する機能的アンタゴニストをコードする、本発明の単離ポリヌクレオチド（例えば配列番号17）を作成することもできる。単離DNA配列は、N末端伸長基を含む機能的アンタゴニストをコードすることもできる（配列番号1）。

【0083】

ヘッジホッグポリペプチドの機能的アンタゴニストをコードするDNA配列の好ましいものとしては、(a) 配列番号16及び17；(b) 標準的ハイブリダイゼーション条件下で、上記した全ての配列にハイブリダイズし、ヘッジホッグポリペプチドの機能的アンタゴニストの活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド；及び(c) 上記した全てのポリヌクレオチド配列にコードされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド、からなる群より選ばれるポリヌクレオチドが挙げられる。更に、本発明のアンタゴニストポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号16及び17の少なくとも12個の連続するヌクレオチド、より好ましくは配列番号16及び17の少なくとも20個の連続するヌクレオチドに相当するポリヌクレオチドプローブに、標準的条件下でハイブリダイズする。

【0084】

一度（合成、指定部位突然変異誘発、又は他の方法によって）作成したら、目的とする特定の単離ポリペプチドをコードするDNA配列を、発現ベクターに挿入し、所望の宿主内での蛋白質発現に適した発現制御配列に、操作可能に連結させる。正しく連結が行われたかどうかは、ヌクレオチド配列決定、制限酵素地図作成、及び好適な宿主内での生物学的活性を有するポリペプチドの発現によって、確認することができる。当分野で知られるように、トランスフェクトされた遺伝子を宿主内で高いレベルで発現させるためには、選択された発現宿主内で機能を有する転写及び翻訳発現制御配列に、その遺伝子を操作可能に連結する必要がある。

【0085】

発現制御配列及び発現ベクターは、宿主に応じて選択される。様々な発現宿主／ベクターの組み合わせを用いることができる。真核細胞宿主に有用な発現ベクターの例としては、SV40、ウシパピローマウィルス、アデノウィルス及びサイトメガロウィルスから得た発現制御配列を包含するベクターが挙げられる。バクテリア宿主に有用な発現ベクターの例としては、pCR1、pBR322、pMB9などの、大腸菌から得たプラスミド及びその誘導体といった、公知のバクテリアプラスミド；M13及び繊維状一本鎖DNAファージといった、広い宿主範囲のプラスミドなどが挙げられる。好ましい大腸菌ベクターの例としては、λファージpLプロモーターを含むpLベクター（米国特許第4,874,702号）、T7ポリメラーゼプロモーターを含むpETベクター（Studier他、Methods in Enzymology 185:60-89、1990）及びpSP72ベクターが挙げられる。酵母菌に有用な発現ベクターの例としては、動原体プラスミドが挙げられる。

10

【0086】

更に、多種多様なあらゆる発現制御配列をこれらベクター内で用いることができる。そのような有用な発現制御配列には、上記した発現ベクターの構造遺伝子に関連した発現制御配列が含まれる。有用な発現制御配列の例としては、SV40又はアデノウィルス、lac系、trp系、TAC又はTRC系の初期及び後期プロモーター、ラムダファージ（例えばpL）のメジャーオペレーター及びプロモーター領域、fd外殻蛋白質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の糖分解酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼ（Pho5等）のプロモーター、酵母菌α交配系のプロモーター、原核細胞又は真核細胞遺伝子及びそれらのウィルスの発現を制御することが知られる他の配列、それらの様々な組み合わせが挙げられる。ここに記載した単離ヘッジホッグポリペプチドを大量に作成するには、好適な宿主であればどのようなものを用いることができる。宿主の例としては、バクテリア、菌類（酵母菌など）、植物、昆虫、哺乳類又は他の適当な動物の細胞又は細胞系、並びにトランスジェニック動物又は植物が挙げられる。これらの宿主のより具体的な例としては、大腸菌株（実施例1）、シュードモナス属株、バチルス属株、ストレプトミセス属株、菌類株、酵母菌株（例えばPichia；実施例3）；ヨトウガ（SF9）及びHigh Five TM等の昆虫細胞；チャイニーズハムスター卵巣（CHO）、NS/O細胞等のマウス細胞、ミドリザル細胞COS1、COS7、BSC1、BSC40及びBMT10、ヒト細胞等の動物細胞；及び植物細胞といった、公知の真核細胞及び原核細胞宿主が挙げられる。

20

30

【0087】

全てのベクター及び発現制御配列は、所与の単離ポリペプチドを発現するために同等に機能する訳ではないことは理解されよう。同様に、同じ発現系で、全ての宿主が同等に機能する訳ではない。しかし、当業者はこれらのベクター、発現制御系及び宿主から適当な組み合わせを選択して実験を行うことができる。例えば、目的の単離ポリペプチドを大規模な動物培養で作成するためには、発現ベクターの数を制御する必要がある。増幅可能ベクターは、当分野において公知である（例えばKaufman及びSharp（1982）Mol. Cell. Biol. 2、1304-1319及び米国特許第4,470,461号及び第5,122,464号参照）。DNA配列を発現制御配列に操作可能に連結させるには、DNA配列上流の正しい読み枠内に、翻訳開始シグナルを設ける必要がある。発現される特定のDNA配列がメチオニンで始まっていない場合、開始シグナルを置くことによって産生物のN末端に追加のアミノ酸（メチオニン）が置かれることになる。これによって、発現されたアンタゴニストの中心となる構造体が確実に保持される。

40

【0088】

形質転換した宿主によって産生された蛋白質は、好適な方法であればどのようなものを用いても精製することができる。そのような標準的方法の例としては、クロマトグラフィー（例えばイオン交換、親和性及びサイズ排除カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、示差溶解度（differential solubility）、又は他の標準的な蛋白質精製方法が挙げられる

50

。免疫親和性クロマトグラフィーにおいては、S o n i c ヘッジホッグ等の蛋白質又は関連蛋白質に応答するように作成し、固定支持体に固着した抗体を包含する親和性カラムに、蛋白質を結合させることによって、蛋白質を単離することができる。あるいは、ヘキサヒスチジン、マルトース結合領域、インフルエンザ外殻配列及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等の、親和性タグを蛋白質に付着させ、適当な親和性カラムを通過させて、容易に精製することができる。単離した蛋白質は、蛋白質分解、質量分析法、核磁気共鳴及びX線結晶構造解析等の方法を用いて、物理的に特徴付けることができる。

【0089】

B. 全長ポリペプチドからのアンタゴニストの作成

ヘッジホッグアンタゴニスト活性を有する単離ヘッジホッグ蛋白質断片（例えば配列番号2～4）は、当業者に公知の方法を用いても効率的に作成できる。実施例に詳述する方法で、未反応のヘッジホッグ蛋白質から機能的ヘッジホッグアンタゴニストを作成する。

【0090】

ペプチドは蛋白質分解酵素によって特異的に切断される。こうした酵素の例としてはプラスミン、トロンビン、トリプシン、キモトリプシン又はペプシンが挙げられる（ただしこれらに限定されるものではない）。これらの酵素はそれぞれペプチド結合の種類に応じて特異的に作用する。トリプシンは、塩基性アミノ酸、通常はアルギニン又はリジンに由来するカルボニル基を有するペプチド結合の加水分解を触媒する。ペプシン及びキモトリプシンはトリプトファン、チロシン及びフェニルアラニン等の芳香族アミノ酸由来のペプチド結合の加水分解を触媒する。蛋白質分解酵素に切断されやすい部位の切断を防ぐことによって、別の切断蛋白質断片セットを作成することができる。例えば、弱塩基溶液中でのε-アミノ酸群であるリジンとエチルトリフルオロオチオアセテートとの反応によって、隣接するペプチド結合がトリプシンによる加水分解の影響をもはや受けない、ブロックアミノ酸残基を生じる。蛋白質を改変して、蛋白質分解酵素の影響を受けやすいペプチド連結が得られる。例えば、システイン残基をα-ハロエチルアミンでアルキル化することによって、トリプシンで加水分解されるペプチド連結が得られる（L i n d l e y (1956) N a t u r e 178, 647）。加えて、化学試薬を用いて、特異的な残基でペプチド鎖を切断することが出来る。例えば、プロモシアンは、メチオニン残基においてペプチドを切断する（G r o s s 及び W i t k i p (1961) J. A m. C h e m. S o c. 83, 1510）。従って、改質剤、蛋白質分解酵素及び／又は化学試薬の様々な組み合わせを用いて蛋白質を処理することによって、蛋白質を、望ましい長さの重複することのない断片に分割するか、或いは望ましい長さの重複する断片に分割することができる。

【0091】

C. 科学的合成方法

ヘッジホッグアンタゴニストは、メリーフィールド固相Fm o c又はt-B o c化学作用等の当分野で公知の方法を用いて、化学的に合成することもできる（M e r r i f i e l d, R e c e n t P r o g r e s s i n H o r m o n e R e s e a r c h 23: 451 (1967) 参照）。アンタゴニストを作成し試験する従来方法の例は、下記に述べる。これらの又は類似の方法を用いて、生物学的活性を有する単離ポリペプチド（例えばヘッジホッグ）の断片及び類似体を作成し、スクリーニングすることができる。ヘッジホッグアンタゴニストは、ヘッジホッグキメラを作成する化学的方法及び組換え方法を組み合わせて用いることによって、作成することもできる。

【0092】

D. 他のアンタゴニストDNA及びペプチド配列の作成

1. ランダム突然変異誘発方法

配列番号2～8の全体又は部分を含む、ヘッジホッグの機能的アンタゴニストのアミノ酸配列変異体は、蛋白質又はその特定の部分をコードするDNAをランダム突然変異誘発させることによって調製することができる。突然変異を誘導する有用な方法として、PCR突然変異誘発及び飽和突然変異が挙げられる。以下に挙げるそのような方法の例は、本発明の範囲を限定するものではなく、単に代表的な方法を例証するものである。この点につ

10

20

30

40

50

いて、当業者は、他の方法も有用であると理解できるであろう。

【0093】

PCR突然変異誘発：例えばLeung他(1989) Technique 1、11-15 参照。

飽和突然変異誘発：Mayers他(1989) Science 229、242に記載の方法参照。

縮重オリゴヌクレオチド突然変異誘発：例えばHarang, S. A. (1983) Tetrahedron 39、3; Itakura他(1984) Ann. Rev. Biochem. 53、323及びItakura他、Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Symposium on Macromolecules、pp. 273-289 (A. G. Waton編) エルゼビア社、アムステルダム(1981) 参照。

【0094】

2. 指定突然変異誘発法

部位を指定する方法は、N末端システイン(又は機能的同等物)を効果的に除去し、ヘッジホッグの機能的アンタゴニストの中心構造を作成する、別の方法である。非ランダム、又は指定された突然変異誘発を行うことによって、単離ポリペプチドをコードする特異的配列又はポリヌクレオチド配列の特異的部分における突然変異を得て、単離ポリペプチドの公知のアミノ酸配列残基の欠失、挿入又は置換を含む変異体を得られる。

【0095】

アラニンスキャニング突然変異誘発：Cunningham及びWells(1989) Science 244、1081-1085 参照。

オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発：例えばAdelman他(1983) DNA 2、183 参照。オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発を用いて、N末端システインを他のアミノ残基、好ましくはセリン残基に突然変異させた機能的アンタゴニストをコードする単離DNA配列を遺伝子工学処理して、機能的アンタゴニストを作成した(配列番号17：実施例7)。

【0096】

カセット突然変異誘発：Wells他(1985) Gene 34、315 参照。組み合わせ突然変異誘発：例えばLadner他、WO 88/06630 参照。

主題であるアンタゴニストヘッジホッグ蛋白質の突然変異体をセットで作成する方法が存在し、そのような方法は、ヘッジホッグ蛋白質の生物学的活性の潜在的な機能的アンタゴニストである変異体配列(例えば相同体)を同定するのに特に有用であることが当業者には理解されよう。そのようにして得たアンタゴニスト突然変異体セットを含んでいる組み合わせライブラリーをスクリーニングして、例えば、アンタゴニストとして作用できる新規なヘッジホッグ相同体を作成することができる。このようにして得たヘッジホッグ相同体は、例えばpatched受容体に結合するが、いかなる生物学的応答も誘導しないという模倣能を有し、従って本物のヘッジホッグ又はヘッジホッグアゴニストの作用を阻害するという点で、アンタゴニストとして作用する。

【0097】

本方法の1つの特徴においては、ヘッジホッグアンタゴニスト群のアミノ酸配列を整列させて、好ましくは可能な限り高い相同性を示す。そのような変異体群としては、例えば1以上の種から得たヘッジホッグアンタゴニストが挙げられる。整列したアンタゴニスト配列の各位置に現れるアミノ酸は、組み合わせ配列の縮重群をなすように選択される。

【0098】

例証的な態様においては、公知である脊椎動物ヘッジホッグ蛋白質各種の成熟蛋白質の、N末端約168残基の整列(すなわち最初の10個のアミノ酸残基を欠損する蛋白質)を用いて、配列番号9によって表わされる機能的アンタゴニストポリペプチドの縮重セットが得られる。ここで配列番号9における縮重位置「Xaa」のそれぞれは、あるヘッジホッグ蛋白質のその位置に現れるアミノ酸であってもよいし、或いはライブラリーを拡張す

10

20

30

40

50

るためには、各Xaaが、それらの位置に天然で生じるアミノ酸の保守的置換であるアミノ酸残基から選択されたものであってもよい。

【0099】

例えば、Xaa(6)はPhe、His又はTyrを表すが、Lys、Arg又はHisであってもよい；Xaa(7)はPro又はAlaを表すが、Ser、Thr、Tyr、Trp又はPheであってもよい；Xaa(9)はLys、Arg又はHisのいずれかのアミノ酸を表す；Xaa(10)はVal又はThrを表すが、Met、Cys、Ser又はThrであってもよい；そしてXaa(11)はAla又はValを表すが、Leu、Ile、Ser又はThrであってもよい。各Xaa残基は、配列番号9に記載される残基であってもよいし、当業者に公知のように、保守的置換されたものであってもよい。より拡張したライブラリーにおいては、各Xaaを、あらゆるアミノ酸から選択することができる。様々な方法で、上記した潜在的なヘッジホッグアンタゴニスト相同体のライブラリーを作成することができる。作成した突然変異遺伝子産物をスクリーニングする様々な方法が当分野において知られている。

【0100】

大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングする方法は、一般に：遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター内にクローンし；適当な細胞を得られるベクターのライブラリーで形質転換し；所望の活性（例えばこの場合はアンタゴニスト活性、又は下流細胞内蛋白質に対する活性）の検出によって、検出した産物の遺伝子をコードするベクターが比較的容易に行える条件下で遺伝子を発現する、という工程が含まれる。そのような方法は、ヘッジホッグ受容体が「餌」蛋白質として用いられ、ヘッジホッグアンタゴニストの変異体のライブラリーが「魚」蛋白質として発現される2ハイブリッド系、並びにアンタゴニスト候補が細胞又はウィルス粒子表面上に呈示される様々な呈示ライブラリーを含む。特定の細胞又はウィルス粒子が有する、呈示された産生物を介して適当な受容体蛋白質へ結合する能力は、「パニングアッセイ」によって検出される（例えばLadner他、WO88/06630；Ladner他、PCT公開番号WO90/02909；Garrard他、PCT公開番号WO92/09690；Marks他(1992) J. Biol. Chem. 267:16007-16010；Griffiths他(1993) EMBO J 12:725-734；Clackson他(1991) Nature 352:624-628；Barbas他(1992) PNAS 89:4457-4461）、Charbit他(1986) EMBO 5、3029-3037）、Schorr他(1991) Vaccines 91、pp. 387-392）、Agterberg他(1990) Gene 88、37-45、Thiry他(1989) Appl. Environ. Microbiol. 55、984-993）；Kuwayama他(1988) Bio/Tech. 6、1080-1083）；Hansson他(1992) J. Bacteriol. 174、4239-4245及びKlauser他(1990) EMBO J. 9、1991-1999）；Cull他(1992) PNAS USA 89:1865-1869参照）。

【0101】

F. 単離アンタゴニストポリペプチドの他の変異体

本発明に含まれる単離分子の例としては、突然変異体、自然突然変異体、誘発突然変異体、本発明の機能的アンタゴニスト等のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに、高又は低緊縮条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされる蛋白質が挙げられる。ここに記載した全ての変異体はアンタゴニストの生物学的機能を保持することが期待される。具体的には、生物学的に活性を有する断片又は類似体は、配列番号5～8及び11に示すペプチド、又は配列番号2～4のヘッジホッグペプチドの生物学的活性に拮抗するペプチドの特徴である生体内又は生体外活性を有するものである。最も好ましくは、アンタゴニストは全ての生体内又は生体外アッセイにおいて、配列番号5～8及び11のアンタゴニスト活性の、少なくとも10%、好ましくは40%以上、最も好ましくは少なくとも90%の活性を有する。

【0102】

好ましい類似体の例としては、1個以上の保守的アミノ酸置換によって又は1個以上の非保守的アミノ酸置換によって、あるいは単離蛋白質の生物学的活性を損なわない欠失又は挿入によって、ここに開示した配列とは異なる配列を有する、生物学的に活性なアンタゴニスト断片が挙げられる。保守的置換は一般に1個のアミノ酸をそれに類似した特徴を有する他のアミノ酸に置換することを含み、以下に挙げるグループ内で行われる。バリン、アラニン及びグリシン；ロイシン及びイソロイシン；アスパラギン酸及びグルタミン酸；アスパラギン及びグルタミン；セリン及びトレオニン；リジン及びアルギニン；並びにフェニルアラニン及びチロシン。非極性疎水性アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンがある。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンがある。陽電荷（塩基性）アミノ酸にはアルギニン、リジン及びヒスチジンがある。陰電荷（酸性）アミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸がある。他の保守的置換は、当業者に公知のものである。例えば、アミノ酸アラニンについては、保守的置換をD-アラニン、グリシン、 β -アラニン、L-システイン及びD-システインのいずれかから行うことができる。リジンについては、置換をD-リジン、アルギニン、D-アルギニン、ホモアルギニン、メチオニン、D-メチオニン、オルニチン又はD-オルニチンのいずれかで行うことができる。

10

【0103】

一般に、単離ポリペプチドの機能的特性に変化を与えられると思われる置換は以下のものである：(i) 極性残基、例えばセリン又はトレオニンを疎水性残基、例えばロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン又はアラニンと置換した（又はその逆の）場合；(ii) システイン残基（すなわち、1個以上の他の内部システインを更に含んでもよいN末端システイン）を他の残基と置換した（又はその逆の）場合；(iii) 陽性の側鎖を有する残基、例えばリジン、アルギニン又はヒスチジンを、陰性の側鎖を有する残基、例えばグルタミン酸又はアスパラギン酸と置換した（又はその逆の）場合；あるいは(iv) 嵩高い側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンを、そのような側鎖を有さない残基、例えばグリシンと置換した（又はその逆の）場合。

20

【0104】

G. ペプチド模倣体 (Mimetics)

30

本発明は、例えばペプチド又は非ペプチドの拮抗剤といった、模倣体の生成も提供する。ペプチド模倣体は、例えばヘッジホッグによる天然リガンド（例えば受容体）への結合を分断することによって、ヘッジホッグ蛋白質の生物学的活性に拮抗することができる。受容体ポリペプチドの分子認識に重要な役割を果たす、又はヘッジホッグ依存性シグナル伝達を促進する能力の阻害に重要な役割を果たす、目的のアンタゴニストポリペプチドの残基は、検出が可能であり、それを用いてアンタゴニスト由来ペプチド模倣体を作成することができる（例えば「網膜芽腫遺伝子蛋白質に結合するヒトパピローマウィルス蛋白質の、ペプチド阻害剤」欧州特許出願EP-412,762A及びEP-B31,080A参照）。例えば、スキヤニング突然変異誘発を用いて、ヘッジホッグ依存性シグナル伝達を促進する能力の阻害に関与する特定のアンタゴニストポリペプチドのアミノ酸残基地図を作成することができる。これらの残基を模倣し、従ってヘッジホッグの機能を阻害することのできるペプチド模倣体化合物（例えばジアゼピン又はイソキノリン誘導体）を作成することができる。

40

【0105】

重要な残基の非加水分解性ペプチド類似体は、ベンゾジアゼピンを用いて作成することができる（例えばFreidinger他、Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall編、ESCOM出版：オランダ国ライデン、1988参照）、アゼピン（例えばHuffman他、Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall編、ESCOM出版：オランダ国ライデン、1988参照）、置換 γ ラクタム環（Garvey他、Pepti

50

des: Chemistry and Biology、G. R. Marshall 編、ESCOM 出版: オランダ国ライデン、1988)、ケトメチレン模擬ペプチド (Ewenson 他 (1986) J. Med. Chem. 29: 295; 及び Ewenson 他、in Peptides: Structure and Function (第9回アメリカペプチドシンポジウム議事録、Pierce Chemical 社、イリノイ州ロックランド、1985)、 β -回転ジペプチドコア (Nagai 他 (1985) Tetrahedron Lett. 26: 647); 及び Sato 他 (1986) J. Chem. Soc. Perkin Trans 1: 1231) 及び β -アミノアルコール (Gordon 他 (1985) Biochem Biophys Res Commun 126: 419); 及び Dann 他 (1986) Biochem Biophys Res Commun 134: 71)。

10

【0106】

V. 機能的拮抗作用の試験

多くの生物検定が、ヘッジホッグ活性を調べるのに用いられてきたが、C3H10T1/2 細胞系を用いれば、一次細胞培養又は臓器外植を扱うという煩雑な操作を必要とせずに、ヘッジホッグ機能を単純に調べることができる。マウスの胚繊維芽細胞系 C3H10T1/2 は、ある決まった条件下で、含脂肪細胞、軟骨細胞及び骨芽細胞に分化することのできる間充織幹細胞系である (Taylor, S. M. 及び Jones, P. A.、Cell 17: 771-779 (1979) 及び Wang, E. A. 他、Growth Factors 9: 57-71 (1993))。骨形態発生蛋白質は C3H10T1/2 細胞の骨細胞系統への分化を誘導し、アルカリホスファターゼ誘導がこの工程のマーカーとして用いられている (Wang 他、上述)。Shh は C3H10T1/2 細胞に対して同様の効果を有し (Kinto, N. 他、FEBS Lett. 404: 319-323 (1997))、Shh によるアルカリホスファターゼ誘導は、生体外での効力を定量的に測定するのに用いられている。Shh 処理を行って、gli-1 及び ptc-1 発現の増加を投与量に依存させることもできる (これは PCR を持ちいた分析によって容易に検出することができる)。

20

【0107】

IV. 用途

A. 一般

一般に、ここに記載したヘッジホッグの機能的アンタゴニスト蛋白質は、治療、診断及び研究において有用である。ヘッジホッグ蛋白質の通常の生物学的活性に拮抗させることによって、本発明の化合物を生体内及び生体外の両方の組織培養における組織の操作、例えば組織分化に用いることができる。例として、精子産生の障害が挙げられる。他の用途として、組織中の上皮細胞の成長又は分化を障害すること、特に動物の毛の成長を障害することが挙げられる (実施例 8 参照)。また、アンタゴニストを用いて、発生時の現象におけるヘッジホッグの役割、並びに成人組織におけるヘッジホッグの正常な細胞性機能を調べることができる。そのような方法は細胞培養内で用いられるだけでなく、ある種のトランスジェニック動物内でも用いることができる。

30

【0108】

治療目的で用いる場合には、アンタゴニストは一般的な用途に適した方法で用いられ、全身及び局所投与を含む様々な投与形態に調合することができる。方法及び調合については Remington's Pharmaceutical Sciences (Meadel 出版社、ペンシルバニア州イーストン) に記載がある。全身投与の場合は、筋肉内、静脈内、腹腔内及び皮下などの注射が好ましい。アンタゴニストの溶液を調合することができるが、ハanks 溶液やリンガー溶液などの生理学的に適合性のある担体に調合するのが好ましい。凍結乾燥の形状も挙げられる。

40

【0109】

具体的には、治療する疾病、患者個人の状態、単離ポリペプチドの投与部位、投与方法及び医者に知られる他の要因を考慮に入れた有効な診療に沿った方法で、治療に用いられる

50

蛋白質組成物を調合し、投与量を決定する。本発明の蛋白質の治療用投与は、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、骨液内、胸骨内、髄腔内、肝臓内、病変内及び頭蓋内の注射又は輸液法等の、非経口投与が好ましい。あるいはタブレット類、市販されている液剤用の噴霧器、乾燥粉末、凍結乾燥化又はエロゾル化したリポソーム吸入薬などの形態をとることができる。液剤を粉末剤から再構成して用いることもできるし、局所塗布用にクリーム of 形状にすることもできる。

【0110】

ここに記載した蛋白質組成物は、薬学的に受容可能な担体を含む無菌医薬組成物として投与することができる。この担体は、数多く存在する公知の担体のどれであってもよく、例としては水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、イオン交換剤、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清蛋白質、リン酸塩などの緩衝物、グリシン、ソルビン酸カリウム、硫酸プロタミンなどの飽和野菜脂肪酸・水・塩又は電解質の部分グリセリド混合物、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三珪酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースに基づく物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、蠟、ポリエチレンーポリオキシプロピレンーブロック重合体、ポリエチレングリコール及び羊毛脂などや、これらの組み合わせが挙げられる。

【0111】

投与量は、医者によく知られているように、用いる蛋白質の特性（例えば結合活性、生体内原形質での半減期）、調合物における蛋白質の濃度、投与経路、投与部位及び投与期間、患者の臨床上の寛容性、患者の病理学上の状態などに依存する。一般に、1人の患者につき、1投与あたり約 0.5×10^{-6} モル未満からの蛋白質の用量が好ましいが、用量はもちろん蛋白質の性質にも依存する。一連の投与の間に投与量を変えることもできる。

【0112】

本発明の発明アンタゴニストポリペプチドは、ヘッジホッグ蛋白質の過度な発現により特徴付けられる疾病の治療、又はより一般的には、ヘッジホッグ蛋白質の機能に拮抗することが望まれる状態の治療に、特に有用である。ある種の基底細胞癌は、ヘッジホッグの過度な発現に関係し（O r o 他（1997）S c i e n c e 276: 817-821）、ある種のヒト腫瘍、例えば乳癌、髄芽細胞腫がS h h 遺伝子において発癌性突然変異を有することが判明しており（E p s t e i n 他、米国特許第5,759,811号）、本発明のアンタゴニストをそのような疾病の治療に用いることができるだろう。

【0113】

治療目的で本発明の蛋白質を用いる例として、本発明の治療用アンタゴニストを、中枢神経系の新生細胞又は細胞の過形成形質転換といった様々な疾患を有する患者に投与することができる。ある種のヘッジホッグ蛋白質は、神経性細胞腫瘍の発生に関与していることがある。従って、本発明のヘッジホッグアンタゴニストを、例えば悪性神経膠腫、髄芽細胞腫、神経外胚葉腫瘍及び脳室上皮腫の治療に用いることができるであろう。

【0114】

更に、神経系が発達する間およびおそらくは成人期間においても神経分化を制御する能力をヘッジホッグ蛋白質が有すということから、ヘッジホッグアンタゴニストが、正常細胞の維持、機能動作及び成熟；損傷細胞の修復及び再生；並びに変性及び早期死について、成人のニューロン制御を促進することが予想される。

蛋白質を調合し、蛍光透視法又はラジオグラフィーにおいて不透明である物質などの検出可能なマーカーに結合させ、被験者に投与して組織を映像化することもできる。これらの複合体をセイヨウワサビペルオキシダーゼなどの物質に結合させて、免疫細胞化学的染色を行い、組織片上でヘッジホッグリガンドについて正の細胞領域を視覚化することもできる。

【0115】

B. 遺伝子治療

本発明の単離ポリヌクレオチドを遺伝子治療プロトコルの一部として用いて、アンタゴニスト形状のヘッジホッグポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与することでもできる。本発明は、ヘッジホッグポリペプチドの機能に拮抗させるための、特定の細胞型における生体内トランスフェクション及びアンタゴニストポリペプチド発現用の発現ベクターを特徴とする。アンタゴニストポリペプチドの発現用構造体は、生物学的に有効である担体、例えば生体内で細胞にポリヌクレオチドを効果的に投与することのできる調合又は組成物であればどのようなものを用いても投与することができる。

【0116】

工程には、目的の遺伝子を、ウィルスベクター（組換えレトロウィルス、アデノウィルス、アデノ関連ウィルス及び単純性疱疹ウィルス）あるいは組換えバクテリアプラスミド又は真核細胞プラスミドへ挿入することが含まれる。ウィルスベクターは細胞に直接トランスフェクトする。プラスミドDNAは、陽イオン性リポソーム（リポフェクチン）又はその誘導体（例えば抗体連結体）、ポリリジン連結体、グラマシジンS、人工ウィルスエンベロープ、又はそのような他の細胞内担体を利用して投与することができるし、遺伝子構造体の直接注射又は生体内のCaPO₄沈殿などによって投与することもできる。

【0117】

生体内条件で細胞内へポリヌクレオチドを導入する好ましい方法は、アンタゴニストポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えばcDNAを含むウィルスベクターを用いるものである。ウィルスベクターを用いて細胞を感染させることには、標的細胞の大部分がポリヌクレオチドを受容できるという利点がある。加えて、ウィルスベクター内にコードされる分子、例えばウィルスベクターに含まれるcDNAは、ウィルスベクターポリヌクレオチドを取り込んだ細胞内で効率的に発現される。

【0118】

様々なウィルスベクターを用いて、外来遺伝子の生体内投与、特にヒトへの投与を行うための組換え遺伝子投与系とすることができる。これらのベクターを用いると、遺伝子が細胞内に効率よく投与され、運搬されたポリヌクレオチドは安定的に宿主の染色体DNA内に組み込まれる（Miller, A. D. (1990) Blood 76: 271 参照）。組換えレトロウィルスの作成、及びそれらウィルスによる生体外又は生体内での細胞への感染プロトコルについては、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. 他（編）Greene Publishing Associates (1989)、9章10-14及び他の標準的実験マニュアルを参照されたい。好適なレトロウィルスの例は、当業者に公知のものが挙げられる。環境栄養性及び両栄養性レトロウィルス系を調製するのに好適なパッケージングウィルス系の例としては、Crip、Cre2及びAmが挙げられる。レトロウィルスは、様々な遺伝子を様々な細胞型（例えば上皮細胞など）に生体外及び／又は生体内で導入するのに用いられて来た（例えばEglitis他（1985）Science 230: 1395-1398; Danos及びMulligan（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6460-6464; Wilson他（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3014-3018; Armentano他（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6141-6145; Huber他（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8039-8043; Ferry他（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8377-8381; Chowdhury他（1991）Science 254: 1802-1805; van Beusechem他（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7640-7644; Kay他（1992）Human Gene Therapy 3: 641-647; Dai他（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10892-10895; Hwu他（1993）J. Immunol. 150: 4104-4115; 米国特許第4, 868, 116号; 米国特許第4, 980, 286号; PCT出願番号WO 89/07136; PCT出願番号WO 89/02468; PCT出願番号WO 89/05345; 及びPCT出願

10

20

30

40

50

番号WO92/07573参照)。

【0119】

本発明で有用な他のウィルス遺伝子運搬系は、アデノウィルス由来ベクターを用いるものである(例えばBerkner他(1988)Bio Techniques 6:616; Rosenfeld他(1991)Science 252:431-434;及びRosenfeld他(1992)Cell 68:143-155参照)。アデノウィルス株Ad 5d1324型又は他のアデノウィルス株(例えばAd 2、Ad 3、Ad 7など)に由来する、好適なアデノウィルスは、当業者に公知のものである。組換えアデノウィルスは分裂していない細胞に感染することができず、上皮細胞を含む幅広い種類の細胞型を感染させることができるという点で、ある種の条件においては有利である(Rosenfeld他(1992)、上述参照)。

10

【0120】

目的の遺伝子投与に有用な他のウィルスベクター系には、アデノ関連ウィルス(AAV)がある。アデノ関連ウィルスは、効率的かつ生産的な生活環を達成するのにアデノウィルス又はヘルペスウィルス等の他のウィルスをヘルパーウィルスとして必要とする、自然に存在する欠損ウィルスである(Muzyczka他、Curr. Topics in Micro. and Immunol. (1992) 158:97-129参照)。様々なポリヌクレオチドが、AAVベクターを用いる様々な細胞型に導入されている(例えばHermonat他(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470; Tratschin他(1985)Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081; Wondisford他(1988)Mol. Endocrinol. 2:32-39; Tratschin他(1984)J. Virol. 51:611-619;及びFlotte他(1993)J. Biol. Chem. 268:3781-3790参照)。

20

【0121】

上に例証したようなウィルスを用いる運搬方法に加えて、ウィルスを用いない方法を使って動物組織内でアンタゴニストポリペプチドを発現させることができる。ウィルスを用いないで遺伝子を運搬する方法の殆どが、巨大分子の吸収及び細胞内輸送を行うのに哺乳類細胞が用いている通常の機能に依存している。好ましい態様においては、本発明におけるウィルスを用いない投与系は、目的のアンタゴニスト遺伝子の吸収を標的細胞の環内経路に依存している。この種の遺伝子投与系の例としては、人工ウィルスエンベロープ、tat蛋白質由来複合体が挙げられる(米国特許第5,747,641号参照)。代表的な態様においては、アンタゴニストポリペプチドをコードする遺伝子は、表面に陽電荷を生じる(或いは更に、標的組織の細胞表面抗原に対する抗体でタグ付けした)リポソーム(例えばリポフェクチン)に封入することができる(PCT公開番号WO91/06309;日本国特許出願第1047381号;及び欧州特許公開番号EP-A-43075参照)。

30

【0122】

臨床用途では、治療用アンタゴニスト遺伝子用の遺伝子運搬系を、当分野で公知の各方法を任意の数だけ組み合わせたものによって患者に導入することができる。例えば、遺伝子運搬系を医薬として調製したものを、静脈内注射によって全身投与すると、転写調節配列による受容体遺伝子の発現又はその組換えの制御から来る、遺伝子運搬賦形剤、細胞型又は組織型発現によって与えられるトランスフェクトの特異性から、標的細胞中で蛋白質の特異的な形質導入が支配的に起こる。他の態様にあっては、組換え遺伝子の初期投与は、非常に局所的な投与で限定されたものである。例えば遺伝子運搬賦形剤を、カテーテルによって(米国特許第5,328,470号)又は定位注射によって(Chen他(1994)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3054-3057)導入する。

40

【0123】

遺伝子治療用構造体の薬学的調整物は、許容可能な希釈剤中の遺伝子運搬系から実質的に

50

構成することができるし、遺伝子運搬賦形剤を封入した、緩効性基質を包含することもできる。あるいは、組換え細胞から、レトロウィルスベクターなどの完全な遺伝子運搬系が未反応で得られる場合には、医薬調整物は、遺伝子運搬系を形成する細胞1個以上を包含することができる。

本発明を下記実施例によって例証するが、これら実施例によって限定されるものではない。

【0124】

実施例1：大腸菌でのSonicヘッジホッグの作成

A. 大腸菌内での発現

成熟SonicヘッジホッグのN末端システインから174アミノ酸残基まで伸長するヒトSonicヘッジホッグN末端領域(Shh)蛋白質(配列番号3)を、成熟Shh配列のN末端システインに隣接する構造体内に工学的にエンテロキナーゼ切断部位を組み込んだ6ヒスチジンタグ付き融合蛋白質(ヒスチジンタグ-Shh)(配列番号1参照)の形で、pET11d発現ベクター内にサブクローンした。(アンピシリン耐性遺伝子を有する)プラスミドを、大腸菌株BL21(DE3)plysSに移転した。この系においては、IPTGはT7RNAポリメラーゼの発現を誘発し、ポリメラーゼが、目的の遺伝子を含む移転されたプラスミドのT7プロモーター領域に結合する。標的遺伝子産物が大腸菌にとって十分な毒性を有する場合には、ポリメラーゼによって得られるこの基底レベルは、プラスミドを十分に防ぐことができる。(クロラムフェニコール耐性遺伝子を含む)第二のプラスミドplysSは、誘発していない条件下でポリメラーゼと結合し転写を低減させる、低レベルのT7リゾチームを産生する。この系を用いることによって、プラスミドを毒性の有無に関わらず確実に維持及び発現させることができる。形質転換バクテリアを、A₅₅₀が0.5になるまで育成し、1mM IPTGで誘発したのち更に2時間育成した。培養基のアリコートにSDS-PAGEにかけた。ゲルをクーマシーブルーで染色し、ヘッジホッグの発現レベルをデンストメトリーで定量した。全蛋白質の4-5%がヘッジホッグであるというのが典型的な発現レベルであった。バクテリアの残余を遠心分離で集め、-70℃で貯蔵した。plysSプラスミドの非存在下では、ヘッジホッグの発現レベルは低かった。誘導の後SDS-PAGE中に溶解物をクーマシーブルーで染色したところ、ヘッジホッグを示すバンドは現われなかった。このことは、ヘッジホッグの発現が、全蛋白質の1%未満であることを意味している。

【0125】

精製において、特に記さない場合には、全ての工程4℃で行った。全蛋白質の4-5%でShhを発現する細胞からのバクテリア菌糸塊を解凍し、溶解緩衝液(25mMリン酸ナトリウム(pH8)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM PMSF、0.5mM DTT)に1:4(w/v)の割合で再懸濁し、Gaulinプレス(APV Rannie製、デンマーク国コペンハーゲン)に12,000psiにて2回通過させて溶解した。ホモジェネートを19,000gで60分間遠心分離し、得られた溶解物にMES 0.5M(pH5)を、1:10(v/v)の割合で添加した。この溶解物を、25mMリン酸ナトリウム(pH5.5)、150mM NaClで予め平衡させた、SP Sepharose(R) Fast Flow(Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ)カラム(4g大腸菌湿潤重量/ml樹脂)に、pH5.5で充填した。カラムをカラム体積(CV)4倍分の平衡緩衝液で洗浄し、さらに3CVの25mMリン酸ナトリウム(pH5.5)、200mM NaCl、0.5mM DTTで洗浄し、同じ緩衝液中に800mM NaClで、ヒスチジンタグ-Shhを溶出した。溶出分画を280nmでの吸光度及びSDS-PAGEで分析した。SP Sepharose(R)溶出からの分画を含むピークのShhプールにイミダゾール(pH7の1M原液)及びNaCl(5M原液)を添加して、それぞれ最終濃度を20mM及び1Mとし、これを、25mMリン酸ナトリウム(pH8)、1M NaCl、20mMイミダゾール、0.5mM DTTで予め平衡させた、Ni-NTAアガロース(Qiagen、カリフォルニア州サンタクララ)カラム(20mg/ml樹脂)に充填した。カラムを5CV

の同じ緩衝液で洗浄し、3 CVの25 mMリン酸ナトリウム (pH 8)、1 M NaCl、200 mMイミダゾール、0.5 mM DTTでヒスチジンタグーShhを溶出した。Niカラムからの溶出プール中の蛋白質量を、280 nmにおける吸光度によって測定した。Niアガロース溶出液に等量の2.5 M硫酸ナトリウムを室温で添加し、得られた物質を、25 mMリン酸ナトリウム (pH 8)、400 mM NaCl、1.25 M硫酸ナトリウム、0.5 mM DTTで予め平衡させた、フェニルSephacrose (R) Fast Row (Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ) カラム (20 mg/ml 樹脂) に充填した。室温にて25 mMリン酸ナトリウム (pH 8)、400 mM NaCl、0.5 mM DTTでヒスチジンタグーShhを溶出した。ほとんどの場合、0.5 kg (湿潤重量) のバクテリアペーストから、2~3 gのヒスチジンタグーShhを回収した。産生物を0.2 µmフィルターで濾過し、アリコートをして-70 °Cで貯蔵した。ヒスチジンタグーShhの純度をSDS-PAGEで測定したところ約95%であった。精製した産生物の特徴を更に調べるために、試料を電子スプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) で評価した。蛋白質の約50%が、N末端メチオニンを欠いていた。

10

【0126】

ヒスチジンタグーShh及びヒスチジンタグを除去した産生物のESI-MSデータを表1に示す。MS分析として、精製した特定ヘッジホッグのアリコートを狭孔C₄カラム (Vydac、カタログ番号214TP104、内径0.46×25 cm) にて逆相HPLCにかけた。ピークの画分を、280 nmにおける吸光度によって同定し、電子スプレーイオン源を備えたMicromass Quattro II三重四極子質量分析計に注入した。6 µl (1 pmol/µl) のHPLC-精製ヘッジホッグを、10 µl/mmの割合で、シリンジポンプ内の水50%、アセトニトリル50%、及び0.1%蟻酸を溶媒として、イオン源に直接注入した。試料注入を通じて走査を行った。Micromass Mass Lynxデータシステムを用いて、得られた全てのスペクトルデータをプロファイルモードにためて処理した。平均残基質量を用いて、質量値を計算した。

20

【0127】

【表1】

表1. ESI-MSによる天然及び末端切断Shh変異体の特徴

蛋白質	質量 (Da)	
	計算値	測定値
ヒスチジントグーShh (−Met)	21433.82	21434
(未反応)	21565.01	21565
Sonicヘッジホッグ	19560.02	19560
Indianヘッジホッグ	19676.1	19675
Desertヘッジホッグ	19733.2	19732
Shh (N-10)	18543.83	18544
Shh (N-9/C-3)	18498.83	18498
Shh (N-5)	19089.47	19089
Shh (N-8)	18828.19	18827
Shh (C-9)	18788.19	18789
Shh (C1S)	19543.96	19542

【0128】

6ヒスチジントグを切断除去するために、エンテロキナーゼ (Biozyme、カリフォルニア州サンディエゴ) を1:1000の酵素:Shh比 (w/w) でヒスチジントグーShhと共に28℃で保温した。未切断のヒスチジントグーShh及び結合していないヒスチジントグを、第二のNi-NTAアガロースカラム (20mg Shh/ml 樹脂) に通過させて消化することによって除去した。充填に先だって、消化にイミダゾール (pH 7の1M原液) 及びNaCl (5M原液) を添加し、最終濃度をそれぞれ20mM及び600mMとした。この物質を、25mMリン酸ナトリウム (pH 8)、600mM NaCl、20mMイミダゾール、0.5mM DTTで予め平衡させたNi-NTAカラムに充填し、通過させた液を集めた。カラムを1CVの同じ緩衝液で洗浄し、通過流と共にプールした。MES (pH 5の0.5M原液) をNiアガロース未結合画分に添加して最終濃度を50mMとし、2容量分の水を添加した。この物質を、5mMリン酸ナトリウム (pH 5.5); 150mM NaCl、0.5mM DTTで予め平衡させた、第二のSP Sepharose (R) Fast Flowカラム (20mg/ml 樹脂) に充填した。カラムを3CVの平衡緩衝液と、300mM NaClを含む1CVの同じ緩衝液で洗浄した。Shhを5mMリン酸ナトリウム (pH 5.5)、800mM NaCl、0.5mM DTTで溶出した。得られた原子吸光分析データは、Shhがこの段階で0.5モル当量のZn²⁺を含んでいることを示した。等モル濃度のZnCl₂をShh溶出に添加し、蛋白質を5mMリン酸ナトリウム (pH 5.5)、150mM NaCl、0.5mM DTTで透析した。得られたShhは、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 及びESI-MSによって>98%の純度を持ち、原子吸光分析によって0.9~1.1 Zn²⁺/Shhを含んでいることが示された。

【0129】

ヒスチジントグの除去とそれに続く精製で得られる精製Shhは、ESI-MSによって測定した予想質量と同じ質量を有することが示された (表1)。予備実験ではヒスチジントグを有さない完全な構造体としてShhが発現された。Shhの発現レベルは低く、得

られた蛋白質は過度に酸化されていた。その結果、大腸菌中でも発現したヘッジホッグ変異体は、ヒスチジンタグ融合体として産生された。

【0130】

実施例2：アンタゴニストの機能についての試験

外来ヘッジホッグ蛋白質に応答する様々な細胞系が同定されている。これらの応答には、*ptc-1*及び*gli-1* mRNAの誘導 (Takabatake他、Febs. Lett. 410: 485-489 (1997))、*patched-1*発現の誘導 (Nakamura他、Biochem. Biophys. Res. Comm. 237: 465-469 (1997))、融合体のリン酸化 (Theond他、Proc. Nat. Acad. Sci. 93: 42245-4228 (1996)) などがあり、軟骨細胞／碎骨細胞系統については、アルカリホスファターゼ活性の誘導などがある。本研究においては、C3H10T1／2細胞系を、ヘッジホッグシグナル伝達のレポーターとして用いた。下記に述べるアッセイにおいて、成熟Sonicヘッジホッグが*patched-1*に結合し、シグナルを発生させることができるのに対し、様々なヘッジホッグ変異体は、成熟蛋白質と同等の親和性で*patched-1*に結合するが、特定の機能的読み出しに対しては不活性であることがわかっている。ヘッジホッグのこれらの形態は不活性であっただけでなく、野生型Sonicヘッジホッグと機能について効果的に競争しており、従ってアンタゴニストとして作用した。そのようなアンタゴニストの特異的な例は、実施例3～7に記載する。

【0131】

A. C3H10T1／2細胞におけるアルカリホスファターゼ活性の測定

多能性間充細胞系C3H10T1／2 (Reznikoff, C. A. 他、Cancer Research 33, 3231-3238 (1973)) を、American Type Cell Collection (ATCC) から得て、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) にて組織培養を37℃で維持した。AP誘導のアッセイ用に、5,000細胞／ウェルで96ウェルプレートに細胞を培養し、24時間後に2倍連続希釈した精製ヘッジホッグ蛋白質を培養に添加し、更に5日間培養した。10mMジエタノールアミン (pH 9.5)、0.5mM $MgCl_2$ 中で37℃にて30分培養して細胞を溶解し、溶解液中に色素産生基質p-ニトロフェニルホスフェート (pNPP) を用いて、アルカリホスファターゼ (AP) 活性について調べた。溶解物をpNPPで30分間培養し、96ウェルプレートリーダー (PerSeptive Biosystems、マサチューセッツ州フレイミングハム) にて405nmで数値を読んだ。APは、軟骨細胞／骨芽細胞系統への分化のマーカーである。C3H10T1／2アッセイにおけるShhの用量反応は、0.1～10µg/mlの範囲で観察された。

【0132】

大腸菌から得た、ヒスチジンタグ付き蛋白質として発現され後にタグが除去されたヒト成熟ヘッジホッグ (配列番号3) について、AP活性を読み出しとして用いるC3H10T1／2アッセイによって機能を調べた。このアッセイにおいて、Shhは、80nMのEC50、250nMの最大シグナルでの用量依存応答を示した (図2)。この活性は、抗ヘッジホッグ中和mAb 5E1によって中和することができる (データ示さず)。

【0133】

他の形態のヘッジホッグは、C3H10T1／2アッセイで機能を調べた結果、不活性であるか、実質的に減少した活性を有することが示された (図2)。これらには、ヒトShh (N-10) (配列番号6、実施例3)、ラットShh (N-8) (実施例4)、Shh (N-9／C-3) (実施例6)、Shh (N-5) (実施例6)、Shh (N-8) (実施例6) 等の先端切断型；C1S Shh (実施例5) 等のN末端改変型；及びヒスチジンタグ-Shh (実施例7) 等のN末端伸長型がある。

これに対して、C末端から最後の9残基だけ欠けて発現されたShh変異体 (表1における「Shh (C-9)」：配列番号10) は、成熟体に比べて、C3H10T1／2活性

10

20

30

40

50

の減少は見られない (図 2)。

【0134】

B. RT-PCRによるC3H10T1/2細胞におけるptc-1及びgli-1誘導の測定

Trizol法 (Chomczynski, P. 及びSacchi, N., Anal. Biochem. 162:156 (1987)) によって、全RNAを調製した。マウス白血病ウィルス逆転写酵素を用いて37℃、45分間で第一のcDNA鎖を合成した。続いて、下記条件のPCRを27サイクル (ptc-1) 又は29サイクル (gli-1) 行なって増幅した。95℃で3.5分、アニーリングを62℃で1分 (patched-1) 又は64℃で20秒 (gli-1)、72℃で1分 (ptc-1) 又は20秒 (gli-1)。プライマーは下記のものを用いた。

10

【0135】

Ptc-1 5' - CATTGGCAGGAGGAGTTGATTGTGG - 3' (配列番号12)

5' - AGCACCTTTTGTAGTGGAGTTTGGGG - 3' (配列番号13)

Gli-1 5' - CGGGGTCTCAAACTGCCCAAGCTT - 3' (配列番号14)

5' - GGCTGGGTCACTGGCCCTC - 3' (配列番号15)

【0136】

ptc-1及びgli-1はそれぞれ270bp及び386bpのPCR産物を検出することによって調べた。2日後にShhによるptc-1及びgli-1 RNAの誘導は最大になった (ptc-1 RNAは2倍、gli-1 RNAは5倍)。アッセイを5日後に終了した時、ptc-1及びgli-1 mRNAのレベルは両方とも、2日目のレベルより低下していた。

20

【0137】

C. C3H10T1/2細胞を持ちいたアッセイにおける、patched-1蛋白質の誘導

C3H10T1/2細胞をT75フラスコ内で増殖させ (3×10^6 個)、Sonicヘッジホッグ ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) 又はShh (N-10) (配列番号6) ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) と共に培養した。0、1、2、3又は4日後に、上澄液を捨て、細胞をPBSで洗浄した。Brj 96 (Sigma Chemical社、ミズーリ州セントルイス)、mM HEPES (pH 7.4)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM PMSF、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ アプロチニン、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ オーフェナントロリン、10mMベンザミジン (benzamidine)、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ペプスタチンA、0.2 mg/ml バナジン酸ナトリウム、4mg/ml フッ化ナトリウムを含む、氷上の緩衝液に30分漬けて細胞を溶解した。溶解物を10,000gで15分間遠心分離し、上澄を親和精製したウサギ抗patched-1抗体及び蛋白質A-Sepharose (R) と共に静置した。

30

【0138】

抗体の免疫原として、Matt Scott博士 (スタンフォード大学から進呈) により提供された大腸菌構造体から精製した、GST-C末端ネズミpatched断片 (残基1237-1414) を用いた。抗体を、第一の非特異性GST樹脂と、第二のGST-patched C末端樹脂の2段階精製にかけた。ペレット形成の後、ペレットを溶解緩衝液で5回洗浄したのち、SDSを含む電気泳動緩衝液中で5分間沸騰した。試料を縮小 (reducing) 4~20% SDS-PAGEゲル上で泳動させ、ニトロセルロースに転写した (100Vで2時間)。抗patched-1 C末端抗体をプローブにしてブロッティングを行い、蛋白質A-アルカリホスファターゼ及びピアスウルトラスーパーシグナル基質を用いてバンドを視覚化した。

40

【0139】

Mr = 250,000のpatched蛋白質は、Shhによる処理前ではかろうじて検

50

出できるレベルであったが、Shh処理の結果、用量及び時間に依存して増加することが示された。Shhは、2日目にpatched-1蛋白質応答の最大値（発現にして約5倍の増加）を誘導した。5日後にも、patched蛋白質発現は上昇したままであり、この時点でアッセイを終了した。

【0140】

D. Islet-1誘導アッセイ

中間神経板外植片を、第10期の鶏胚の尾側領域から切除した。運動ニューロンを誘導するために、中間神経板外植片をコラーゲンゲルに植え、ヘッジホッグ蛋白質を添加してN2培地で48時間培養した。Islet-1+運動ニューロンのマーカーであるIslet-1を、Islet-1特異モノクローナル抗体で検出した。神経板外植片を1%パラホルムアルデヒドを用いて4℃で1～3時間固定した。外植片を一次抗体と4℃で一晩培養し、ビオチン化した抗マウスIgGと共に4℃で一晩培養し、最後にCy3-複合ストレプトアビジンと共に4℃で一晩培養した。外植片を洗浄して顕微板に乗せた。外植片を蛍光光学部品を備えた顕微鏡で観察し、陽性反応を示した核を数えた。

10

【0141】

Shh及びShhの末端切断変異体は、神経管外植片におけるIsl-1発現を比較可能用量応答で誘発することができた（データは示さず）。Shh、並びにShh N-b、Shh N-9及びShh N-5の変異体のEC₅₀は、～2 nMであった。islet-1アッセイにおけるこの活性は、ヘッジホッグアンタゴニスト属に共通の特徴を示しているようである。

20

【0142】

E. patched-1結合アッセイ

Myctag-patched-1で一時的にトランスフェクトしたヒト腎胚芽293細胞を用いて、結合実験を行った。直接結合は、293/patched-1細胞（1×10⁶/ml）をヒトShh-Ig融合蛋白質（5 nM）（Shhは、ヒトIgG1の、Fcヒンジ部に向って残基197の後の、C_H2C_H3部分の枠内で融合する；Jakubowski他、Cell Commun. 3:131-142）と培養することによって調べた。細胞を洗浄したのち、フィコエリトリン（PE）標識化ロバ抗ヒトIgGと保温した。細胞を固定して、FACSにて読み出した。競合結合用に、160 nMのShh又は他の蛋白質を添加し、一連の2倍希釈で力価を求めた。

30

【0143】

FACSを用いたアッセイを用いて、SonicヘッジホッグN末端領域が明らかにpatched-1に結合するIC₅₀を調べたところ、～3.5 nMであった。Shhの末端を切断した変異体（表1）は、同様の親和性で結合した（図4）。C1Sアンタゴニスト（配列番号8）（実施例5参照）は、わずかに高い親和性（～1 nM）で結合した。

【0144】

F. アンタゴニストとしてのヘッジホッグ変異体の評価

C3H10T1/2アッセイを用いて、野生型Shh機能を阻害する能力を評価することによって、試料の持つヘッジホッグ機能のアンタゴニスト性について試験した。全てのウェルに、試験試料の連続希釈に加えて2 µg/mlの成熟Shhを入れたことを除いては、本実施例のセクションAと実質的に同様にしてアッセイを行った。アンタゴニストの存在下で、Shh誘導AP活性における減少を用いることで阻害を測定することができ、読み出しに用いることによって、APの阻害を検定した。図3に示すデータは、patched-1に結合したがC3H10T1/2アッセイにおいて非活性又は低い活性しか有さなかった全てのヘッジホッグ変異体が、成熟Shhと競合し、従って機能的アンタゴニストであることを示している。

40

【0145】

実施例3

Pichia pastoris内で生成されるShhからのアンタゴニストの検出

ヒトShhの最初の10個のアミノ酸が欠けているN-10変異体を、Pichia pastoris

50

中で、成熟した *Sonic* ヘッジホッグの N 末端断片（配列番号 3）をコードする構造体の発現により生成した。すべての方法及び *Pichia pastoris* に対する成長培地は製造業者から提供されている *Invitrogen* 社製品マニュアルに記載されている。

【0146】

pUB55-1 の作製:

pUB55 は分泌シグナルとして α 因子 *PrePro* 領域を有するヒト *Sonic* ヘッジホッグ N 末端領域（配列番号 3）を含んでいる。pUB55 は pPIC9（カリフォルニア州サンジェゴの *Invitrogen* 社製）の *SPH1* 部位に挿入された pUC4-K のカナマイシン遺伝子（*HincII-HincII* 断片）による pPIC9 誘導体である pCCM73 中で構成された。Ear1-Not1 からのヒト *Sonic* ヘッジホッグをコードする配列は、停止コドンと Not1 部位をコード配列中に Gly197 に続く Not 部位とを有する pEAG543 から得られた。プラスミド pCCM73 は *XhoI* と *NotI* で切断され、pEAG543 の Ear1-Not1 と *XhoI-EarI* 断片を構成するオリゴヌクレオチド [5' TCG AGA AAA GAT GCG GAC CGG GCA GGG GGT 3'; 配列番号 18 及び 5' CGA ACC CCC TGC CCG GTC CGC ATC TTT TC 3'; 配列番号 19] で結合され、*Sonic* ヘッジホッグをフレーム中の α 因子リーダ配列に近接させて配置するための適当なコード配列を作る。

【0147】

UB66-1 の作製:

pUB55-1 を *StuI* で消化し、10 μ g の DNA を *Invitrogen* 社の指示する方法により *Pichia pastoris* GS115 細胞に形質転換した。*His⁺* 形質転換体は MD プレート上で選択し、捕集し、それを増殖形質転換体のための選択を行うために YPD/G418 プレート上に広げた。株を 10 ml の BMGY 培地で 30°C で 2 日間生育し、次いで細胞を 2% メタノールを含む 2 ml の BMMY 中に再懸濁させ、30°C でさらに 2 日間生育した。発現は上記の SDS-PAGE 分析により評価した。スケールアップ及び発酵のためにクローン UB66-1 を選択した。

【0148】

形質転換したイーストは 10 リットルの発酵器中 30°C で 5 日間生育した。その時点で、細胞は遠心分離により除去した。発現は 200-400 mg/l であったが、蛋白質の大部分（80% 以上）は蛋白質分解された。遠心分離の後、培養液の上澄みを 3 容積の水で希釈し、それを 25 mM のリン酸ナトリウム pH 5.4、150 mM の NaCl で平衡させた SP Sepharose FF カラム（商品名）に装入した。カラムを、各々 25 mM リン酸ナトリウム pH 5.4、200 mM の NaCl、及び 1 CV の 25 mM リン酸ナトリウム pH 5.4、400 mM の NaCl での、3 $\times$ 1 カラム容積 (CV) の順次の洗浄工程に付した。

【0149】

洗浄後、蛋白質分解により最初の 10 アミノ酸が欠損した事後翻訳的に切り出した *Sonic* ヘッジホッグ変異体 N-10（配列番号 5）を、25 mM リン酸ナトリウム pH 5.5 中 450 mM NaCl で溶出し、6 画分の 0.5 CV を捕集した。完全な *Sonic* ヘッジホッグを 650 mM 及び 800 mM の NaCl でさらに溶出した。これらの画分のすべては還元及び非還元条件下に *ESI-MS* 及び *SDS-PAGE* により特徴を調べた。それぞれの画分を 0.2 μ m の膜を通して濾過し、等分し、-70°C で保存した。90% 以上の *Shh* を N-10 変異体として含む画分 450-1 ないし 450-3 を、後の全ての検査に使用した。表 1 に示した配列番号 5 に対する *ESI-MS* データは、予想された質量を示した。450 mM の塩に曝した後の溶出画分は N-10 変異体と完全な *Sonic* ヘッジホッグの混合物を含んでいた。

【0150】

Pichia からの成熟 *Shh* は C3H10T1/2 アッセイで作用したが、N-10 形態（配列番号 5、表 1 の N-10）は C3H10T1/2 アッセイで不活性であった（図 2）。

patched-1 結合試験では、N-10 変異体は成熟 Shh に対するそれに比肩できる親和性をもって patched-1 に結合する能力を保持した。N-10 変異体は成熟蛋白質の親和性をもって patched-1 に結合したが、C3H10T1/2 アッセイにおいてヘッジホッグシグナルを出すことが出来なかったため、その蛋白質は成熟生成物のアンタゴニストとして作用すると考えられた。この可能性を調べるために、C3H10T1/2 細胞で競合を調べた。すなわち Shh を一定の $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、変異体の 8 個 2 倍系列の希釈物を全てのウェルに、完全な Shh の添加に先立つ予備培養工程で、または Shh の添加と同時に細胞を収容したウェルに直接に、添加した。C3H10T1/2 アッセイでは、N 末端から 10 個のアミノ酸が欠けている、Phicia 中で生成した Shh 切断変異体 (“Shh(N-10)”：配列番号 5) は、約 250 nM の IC_{50} で成熟蛋白質 Shh (図 3) による AP 活性の誘導を遮断することができた。

10

【0151】

実施例 4： 昆虫細胞で生成した Shh からのヘッジホッグアンタゴニストの検出
 ラットの最初の 8 個の N 末端アミノ酸が欠けている Shh-N の N-8 変異体を、High Five 昆虫細胞 (商品名) 中で、ラット Shh-N (ラットの遺伝子配列中の 25-198 残基) をコードする cDNA の発現により発生させた。Sf-900 II 培地 (Life Technology 社製, Gaithersburg, MD) 2.4×10^6 細胞/ ml の密度に成長させた昆虫細胞の $20 \times 100 \text{ ml}$ の培地に、細胞あたり 4 感染ウイルスの感染倍率で、ラット Shh の cDNA をコードするバキュロウイルスで感染させた。 28°C で 48 時間培養後に、細胞を遠心分離により収集し、 1.2 リットルの 10 mM Na_2HPO_4 pH 6.0、 150 mM NaCl 、 0.5 mM PMSF に再懸濁させ、次いで遠心分離により収集した。細胞を次に 1.2 リットルの 10 mM Na_2HPO_4 pH 6.0、 150 mM NaCl / 0.5 mM PMSF に再懸濁し、遠心分離により収集し、次いで -70°C で保存した。

20

【0152】

細胞 (37.5 g) を解凍して、これを 300 ml の 10 mM Na_2HPO_4 pH 6.5、 150 mM NaCl 、 0.5 mM PMSF、 $5 \mu\text{M}$ のペプスタチン、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のロイペプチン、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の EM に再懸濁し、次いで 30 ml の 10% の Triton X-100 を添加した。この混合物を 30 分間氷上で培養し、次いで粒状物を 1500 G で 10 分間遠心分離して除去した。

30

その上澄み (330 ml) に 33 ml の 0.5 M MES (pH 5.0) を添加し、そして全体の試料を、 5 mM Na_2HPO_4 pH 5.5、 150 mM NaCl 、 0.5 mM PMSF、 0.1% NP-40 中で平衡化した SP-Sepharose 高速流樹脂 (Pharmacia 社, Piscataway, NJ) の 37.5 ml カラム ($2.5 \text{ cm} \times 7.7 \text{ cm}$) に装入了。一旦装入したら、カラムを 5 mM Na_2HPO_4 pH 5.5、 150 mM NaCl 、 0.5 mM PMSF、 0.1% NP-40 の $2 \times 37.5 \text{ ml}$ 等分液で洗浄し、次いで 50 ml の 5 mM Na_2HPO_4 pH 5.5、 300 mM NaCl 、 0.5 mM PMSF、 0.1% NP-40 で洗浄した。

【0153】

結合した蛋白質を $10 \times 12.5 \text{ ml}$ 画分の 5 mM Na_2HPO_4 pH 5.5、 800 mM NaCl 、 0.5 mM PMSF、 0.1% NP-40 で溶出した。ラット Shh-N (ウエスタンブロット分析で確認) を含有する画分をプールし (体積 67.5 ml)、次いで、 135 ml の 50 mM HEPES pH 7.5 と混合した。試料全体を次に、アンチヘッジホッグモノクローナル抗体 5E1 が 4.0 mg 抗体/ ml 膨潤ゲルの濃度で結合している 3 ml の Sepharose 4B と混合した。 4°C で 2 時間培養した後、樹脂をカラムに充填し、 $10 \times 4.2 \text{ ml}$ のリン酸塩緩衝塩水 pH 7.2、 1% オクチルグリコシドで洗浄し、次いでラット Shh-N を、 $10 \times 1.0 \text{ ml}$ 画分の 25 mM NaH_2PO_4 pH 3.0、 300 mM NaCl 、 1% オクチルグリコシドで溶出して、 $100 \mu\text{l}$ の 1 M HEPES pH 7.5 を収容した試験管に入れた。

40

【0154】

50

この生成した蛋白質のHPLC及びESI-MS分析の結果、約80%がN-8変異体であり、残りの20%がN末端システイン残基でミリスチン酸、パルミチン酸及びアラキジン酸変性を有する全長蛋白質の混合物であった。N-8変異体をHPLCにより脂肪族アクリル化形態のものから分離した。N-8変異体はC3H10T1/2アッセイにおいて不活性であり、同じアッセイにおいて成熟Shh活性を遮断するアンタゴニストとして作用した(図2~3)。

【0155】

実施例5：直接発現によるアンタゴニストの生成

N末端システインがセリンに変異したSonicヘッジホッグN末端領域変異体(C1S：DNAに対する配列番号17)はE. Coli中でヒスタグ(標識)した蛋白質として発現され、精製され、成熟蛋白質に対して上述したようにして特性を決定された(表1参照)。C1S変異体はC3H10T1/2アッセイにおいて減少した活性を有し(図2)、成熟した蛋白質に対して機能性アンタゴニストとして作用した。ヒトShhのN末端システインをセリンで置換したもの(C1S：配列番号8)はC3H10T1/2アッセイにおいて活性を実質的に失う。このアンタゴニストの能力(EC₅₀)は濃度が成熟蛋白質に比して3倍高くシフトし、最大AP活性(効率)は3番低い。C1S変異体はまたヒトShhによるAP誘導を0.5mMのIC₅₀で遮断することができる。(データは示さない)。

【0156】

ある場合には、本発明のアンタゴニストを生成させるのに使用される他の改変手段と関連してC末端から1個以上のアミノ酸を除去するのに有用であり得る。他の例では、C末端のアミノ酸延長が本発明のアンタゴニストの生成に使用できる。この目的で、最後のアミノ酸9個が欠けたSonicヘッジホッグN末端に変異体をコードするポリヌクレオチド(Shh(C-9)：配列番号10)を創出した。コードされた蛋白質はE. Coli中でヒスタグ蛋白質として発現され、生成され、成熟蛋白質に対して上述したと同様にして特性が決定された(表1参照)。配列番号10の蛋白質はC3H10T1/2アッセイにおいて成熟蛋白質に比肩しうる活性を有し(図2)、ShhにおけるC末端配列は重要な機能を有しないことを示した。

【0157】

実施例6：ヘッジホッグ蛋白質アンタゴニストの蛋白質分解による生成

限定された蛋白質分解はShhアンタゴニストを成熟した蛋白質から生成するのに使用できる別の方法を提供する。多くの酵素が断片の生成に利用できるが、本発明者はプラスミン、トロンビン及びエンテロキナーゼについてこのアプローチの成功を見た。

【0158】

N末端からアミノ酸CGPGRGF GKを欠き且つC末端から残基SGGを欠いているShhのN-9/C-3変異体(配列番号6)が、ヒスタグShhをウシプラスミン(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)と共に、Shh対酵素比10対1(重量比)で、50mM Tris-HCl pH7.4中、20℃にて3時間培養することにより生成された。消化物を同一バッファー中でオボインヒビターカラム(Pierce, Rockford, IL)に通すことにより、プラスミンを除去した。開裂しなかったヒスタグShhは、試料を25mM Na₂HPO₄ pH8.0、1M NaCl、20mM イミダゾール、0.5mM DTT中のNi²⁺ NTAアガロースカラム(Qiagen, Santa Clarita, CA)に通すことにより除去し、残りの蛋白質はpH5.5でSP Sepharose FF(商品名)に成熟Shhとして捕捉し溶出することにより濃縮した。等モルのZnCl₂をこのShh変異体に添加し、これら蛋白質を5mMのリン酸ナトリウムpH5.5、150mM NaCl、0.5mM DTTに対して透析した。最終生成物はESI-MS(表1)とN末端配列決定により特性を決定した。

【0159】

N末端から残基CGPGRを欠いているShhのN-5変異体(配列番号7)が、ヒスタグShhをビオチニル化トロンビン(Novagen, Madison, WI)と共に50mM Tris

10

20

30

40

50

s-C1 pH 7.4 中、Shh 対酵素比 10 : 1 (重量比) で、20℃にて3時間培養することにより生成された。ビオチニル化トロンピンは、消化物をストレプトアバジンアガロスカラムを通すことにより除去した。このN-S 変異体を精製し、N-9/C-3 変異体に関して述べたと同様に分析した。

【0160】

Shh のN-8 変異体 (配列番号 11) が、ヒスタグ Shh の変異形 (Gly-8 が Arg: “G8R-Shh” で置換されたもの) をエンテロキナーゼ (Biozyme, San Diego, CA) と共に、25mM Na_2HPO_4 pH 8.0、400mM NaCl、0.5mM DTT 中、ヒスタグ G8R-Shh : エンテロキナーゼ比 525 : 1 (重量比) で、28℃にて2時間培養することにより生成された。完全な G8R 変異体蛋白質 (変位蛋白質の開始部位直近のエンテロキナーゼ部位で開裂) 及びN-8 切断形 (Arg-8 のC末端で開裂) を含有している流出物は、次にBiorad (商品名) (Hercules, CA) Bio-Scale S2 陽イオン交換カラムで精製して、上記2つの形態に分離し、エンテロキナーゼを分離した。これら蛋白質を5mM Na_2HPO_4 pH 5.5、0.5mM DTT 中で、150mM~1.0M NaCl の直線勾配で溶出した。N-8 形態の変異体は完全な G8R 変異体蛋白質よりも充分低い NaCl 濃度でカラムから溶出した。N-8 形態の変異体を5mM Na_2HPO_4 pH 5.5、150mM NaCl、0.5mM DTT で十分に透析した後、-80℃で保存した。

【0161】

N-9/C-3 (配列番号 6) 及び配列番号 7 (表1のN-5) はいずれも C3H10T1/2 アッセイで不活性である (図2)。Shh のN-9/C-3 (配列番号 6) 及びN-S (配列番号 7) 切断変異体は、成熟蛋白質により誘導される AP 活性を遮断し (図3)、いずれも約 80nM の IC_{50} を有する。対照蛋白質 BSA または免疫グロブリンアイソタイプ G (IgG) の添加は AP 活性の Shh 誘導を遮断しなかった (データは示さない)。Shh のN-9/C-3 切断変異体 (配列番号 6) は実施例2に記載したアッセイで試験したときに p c t -1 を誘導することが出来なかった (データは示さない)。これらの切断された Shh 変異体は、Shh に対するものに比肩できる量的応答で中性試験管植片中で Isl-1 発現を誘導することが出来た (データは示さない)。Shh と変異体に対する EC_{50} は Isl-1 伝導アッセイで約 2nM であった。

【0162】

実施例7: その他のアンタゴニスト

ヒト Shh のN末端システインをセリン (C1S: 配列番号 8) で置換すると (C1S: 配列番号 8)、AP 誘導で評価したとき C3H10T1/2 アッセイで活性をほぼ実質的に失う (図2)。この C1S 変異体の能力 (EC_{50}) は野生型に対して3倍高濃度側にシフトする。C1S 変異体はまた 0.5mM の IC_{50} でヒト Shh による AP 誘導を遮断することができる。ヘッジホッグN末端システインのある種の化学改変 (修飾) もまたアンタゴニスト変異体を精製することが期待される。

【0163】

ヒスタグ Shh (配列番号 1) のようなN末端延長を有する Shh 変異体は C3H10T1/2 アッセイにおいて不活性であり (図2)、アンタゴニストとして作用できる (図3)。Sonic ヘッジホッグ蛋白質以外のヘッジホッグ蛋白質はこれらのアッセイにおいてアンタゴニストとして作用できる。Indian ヘッジホッグのN末端領域 (その遺伝子配列によりコードされた Cys 23-197 残基)、及びDesert ヘッジホッグのN末端 (その遺伝子配列によりコードされる Cys 28-203 アミノ酸残基) は、Sonic ヘッジホッグ蛋白質に関して述べた方法によりヒスタグ蛋白質として発現され、そして精製された。得られる生成物は同様に98%以上の純度を有し、表1にまとめたESI-MS データはこれらの生成物に対して期待される物質を示した。

【0164】

C3H10T1/2 アッセイにおいて、Indian ヘッジホッグ (Ihh) はSonic ヘッジホッグよりも能力が劣り、 EC_{50} が約 1mM である (図2)。同じアッセイでD

10

20

30

40

50

e s e r t ヘッジホッグ(D h h)は不活性である。ここで精製されたS h hのN末端切断変異体(例えばN-9/C-3とN-10)もまたC3H10T1/2アッセイにおいてI h hを遮断することができる(データは示さない)。

【0165】

発明者はC3H10T1/2アッセイでI n d i a nヘッジホッグ及びD e s e r tヘッジホッグの各種変異体を試験した。本発明の開示に基づいて当業者はI h h及びD h hの切断変異体(既に説明したものを含む)を生成することが出来るであろう。S h hの切断変異体について生成した方法と同様にして生成されるこれらのI h h及びD h hの切断変異体は、野生型の蛋白質S h h及びI h hによるAP活性を遮断することを期待できる。

【0166】

D e s e r tヘッジホッグ自体はまたアンタゴニストとして作用し、C3H10T1/2アッセイにおいてS h hまたはI h h活性を遮断できる。C1S変異体、ヒスタッグS h h、I h h及びD h hは全てp a t c h e d-1レセプタにS o n i cヘッジホッグに比肩し得る親和性をもって結合する(図4)。S o n i cヘッジホッグに対すると同様な方法で生成されたI h h及びD h hの切断変異体はS h hまたはI h h蛋白質によるAP活性の誘導を遮断することができる。

【0167】

D h h自体もまたアンタゴニストとして作用して、C3H10T1/2アッセイにおいてS o n i cヘッジホッグまたはI n d i a nヘッジホッグの活性を遮断できる。C1S変異体、ヒスタッグS h h、I h h、及びD h hは全てp a t c h e d-1レセプタにS o n i cヘッジホッグに比肩し得る親和性をもって結合する(図4)。

【0168】

実施例8: H hアンタゴニストを使用する毛成長の抑制

ヘッジホッグ及びそのレセプタp a t c h e d (p t c)は皮膚(たとえば毛小泡体)(Iseki et al. (1996) Biochem.Biophys.Res.Comm.218,688-693; St-Jaques et al. (1998)

Current Biology 8, 1058-1068)の上皮及び/又は間充細胞成分に発現される。上皮及び皮膚間充細胞の間の二方向相互作用は毛小泡体の発達を指令する。この相互作用を阻害すると、毛及び又は上皮組織の構造(例えばガット)を生じる増殖及び/又は分化の変動を生じることが予期される。例えばS h h(N-10)のようなヘッジホッグアンタゴニストを毛小泡体細胞の成長及び分化の抑制に使用することができる。毛の成長とは、細胞分割により毛繊維の形成と伸長が起きることを指す。本発明のアンタゴニストを試験する技術が入手でき且つ知られている。一つの動物モデルは妊娠したマウスを本発明のアンタゴニストで処理してアンタゴニストを胎盤を通して胎児に与え、胚及び新生マウスに対して各種の試験を行うことを可能にする。

マウスはJackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) 及び Charles River Laboratoriesから入手した。B a l b/c 及びC57b1/6を使用した。

【0169】

A. 不治マウスにおける毛小泡体(F o l l i c l e)の形態形成の遮断

マウスにおける体毛の発達は胚時期13.5日で開始することが示されたので、E12.5の妊娠マウスに本発明のアンタゴニストを注射した。ヘッジホッグ蛋白質に結合するが10T1/2細胞の分化を遮断しない対照ヘッジホッグを使用した。処理したマウス及び処理しないマウスの子孫に対して組織学的検査を行った。E18.5の発達段階にあるマウスの組織分析は、上皮細胞由来の基質細胞が対照マウスで内側毛根鞘の形態形成を行うことを示したが、この過程は同じ発達段階にあるアンタゴニストで処理したマウスでは存在せず最初の週を通じて遅延状態に留まることが分かった。

【0170】

より加齢した不治マウスの遮断

本発明のアンタゴニスト蛋白質を毛成長サイクルの第2(年齢3週)及び第4(年齢9週)成長期にあるマウスに投与した。毛成長に対する影響をはっきりさせるために、これらのマウスの背中の毛を剃った。結果は対照マウスの背中の毛は3週間で完全に修復したが

10

20

30

40

50

、アンタゴニストで処理した毛の成長は完全に阻止された。

【0171】

B. 誕生後の遮断

本発明者はさらに、より発達した段階でのアンタゴニストの投与により、毛形態形成を維持するにはヘッジホッグシグナル伝達が必要であることを示す。この点を実行するために、マウスを誕生後の毛小泡体の形態形成が始まった段階でアンタゴニストの投与をおこなった。アンタゴニストで処理したマウスでは体毛が形成されたが、毛は短かく、毛成長の遅延があることが示唆された。

【0172】

C. 遮断の逆行

無毛表現型アンタゴニストによる処理の撤回により逆行できるかどうかを調べるために、皮下注射でアンタゴニストを投与された数匹の子犬での投与を中止した。本方法は毛成長サイクルの動的機構を変化して直接に毛小泡細胞の増殖を直接禁止し及び／又は直接幹細胞の分化を変化させるための手段を提供する。例えば、本方法は毛成長の禁止が望まれる領域の皮膚に、動物の毛小泡体寸法及び／又は毛成長速度を減少するに十分な量のヘッジホッグアンタゴニスト（例えばShh(N10)）を投与することよりなる。このような効果は可逆的または非可逆的である。例えば、本発明の方法は毛の異常な過剰成長又は濃密成長（例えば多毛症）により特徴付けられる毛発病の治療に使用できる。ヘッジホッグアンタゴニストは、異常な多毛症である男性型多毛症の処置に使用できる。本方法はまた脱毛期間を延長する方法も提供する。

【0173】

本発明のアンタゴニストは上皮由来の組織の分化を抑制するために使用できる。これらの分子形は上皮組織を含む過剰形成状態及び／又は新生状態を処置するための各種治療の分化治療の基礎を提供できる。例えば、本発明の薬剤としてのアンタゴニストは、角化症のような過剰成長表皮状態の処置、或いは、基底細胞の悪性腫瘍や扁平上皮細胞の悪性腫瘍のような各種皮膚癌における高増殖率で特徴づけられる新生上皮細胞状態の処置などを意図している。ヘッジホッグアンタゴニストは、温熱又は放射線治療を受けていて通常は頭髮の喪失を生じるような患者に使用できる。ヘッジホッグアンタゴニストはしばしば上皮細胞に対して細胞増殖抑制的であり、細胞毒性が無く、このような薬剤は、放射線誘導壊死のような、効果のためには細胞サイクルのS期に進行することを要求する細胞毒性を有する薬剤から毛小泡体細胞を保護するのに使用できる。このように、治療中に細胞サイクルを抑制することにより、本発明の処置は、細胞死プログラムの活性化から生じるであろう壊死から、毛小泡体細胞を保護することができる。本発明の方法による処置は、毛小泡体細胞を休止状態にすることにより保護を行う。治療が終わったら、処置を中止して処方体細胞の増殖の抑制を解除する。

【0174】

配列の説明

SEQ ID NO: 1 は、pET11bベクター中にサブクローン化されたcDNAによりコードされるhisタグ付きソニックヘッジホッグN末端ドメイン融合タンパク質(遺伝子工学により構築物中に成熟Shh配列のCys1の直ぐ隣りにエンテロキナーゼ開裂部位を有する6ヒスチジンタグ付き融合タンパク質として)である。

MGSSHHHHHHSSGDDDDKCGPGRGFGKRRHPKKLTPLAYK
QFIPNVAEKT LGASGRYEGKISRNSERFKELTPNYPDIIFKDEENTGADRLMTQRCK
DKLNALAI SVMNQWPGVKLRVTEGWDEDGHHSEESLHYEGRAVDITTSRDRSKYGM
LARLAVEAGFDWVYYESKAH IHCSVKAENSVAAKSGG

SEQ ID NO: 2 は、ヒトインテグリンヘッジ ホッグ タンパク質のN末端断片である。

CGPGRVVGSRRRPPRKLVPPLAYKQFSPNVPEKTLGASGR
YEGKIARSSERFKELTPNYPDIIFKDEENTGADRLMTQR
CKDRLNSLAISVMNQWPGVKLRVTEGWDEDGHHSEESL
HYEGRAVDITTSRDRNKGLLARLAVEAGFDWVYYES
KAHVHCSVKSEHSAAKTGG

10

SEQ ID NO: 3 は、ヒトゾニクヘッジ ホッグ タンパク質のN末端断片である。

CGPGRGFGKRRHPKKLTPLAYKQFIPNVAEKT LGASGRYE
GKISRNSERFKELTPNYPDIIFKDEENTGADRLMTQRCK
DKLNALAI SVMNQWPGVKLRVTEGWDEDGHHSEESLHY
EGRAVDITTSRDRSKYGM LARLAVEAGFDWVYYESKAH
IHCSVKAENSVAAKSGG

20

SEQ ID NO: 4 は、ヒトデザートヘッジ ホッグ タンパク質のN末端断片である。

CGPGRGFPVGRRRYARKQLVPLLYKQFVPGVPERTLGASGP
AEGRVARGSERFRDLVPNYPDIIFKDEENSGADRLMTERC
KERVNALAI SVMNMWPGVRLRVTEGWDEDGHHQAQDSLH
YEGRALDITTSRDRNKGLLARLAVEAGFDWVYYESRNH
VHVSVKADNSLAVRAGG

SEQ ID NO: 5 は、最初の10個のN末端アミノ酸を欠くゾニクヘッジ ホッグ 機能的アンタゴニスト
（「Shh(N-10)」）である。

30

RHPKKLTPLAYKQFIPNVAEKT LGASGRYEGKISRNSERFKE
LTPNYPDIIFKDEENTGADRLMTQRCKDKLNALAI SVMNQW
PGVKLRVTEGWDEDGHHSEESLHYEGRAVDITTSRDRSKYGM
LARLAVEAGFDWVYYESKAHI HCSVKAENSVAAKSGG

SEQ ID NO: 6 は、最初の9個のN末端アミノ酸及び最後の3個のC末端アミノ酸を欠く
ゾニクヘッジ ホッグ 機能的アンタゴニスト（「Shh(N-9, C-3)」）である。

RRHPKKLTPLAYKQFIPNVAEKT LGASGRYEGKISRNSERFKE
 LTPNYNPDIIFKDEENTGADRLMTQRCKDKLNALAI SVMNQWP
 GVKLRVTEGWDEDGHHSEESLHYEGRAVDITTS DRDRSKYGML
 ARLAVEAGFDWVYYESKAHIHCSVKAENSVAAK

SEQ ID NO: 7 は、最初の5個のN末端アミノ酸を欠くソニックヘッジホッグ機能的アンタゴニスト
 (「Shh(N-5)」)である。

GFGKRRHPKKLTPLAYKQFIPNVAEKT LGASGRYEGKISRNSERFK
 ELTPNYNPDIIFKDEENTGADRLMTQRCKDKLNALAI SVMNQWPG
 VKLRVTEGWDEDGHHSEESLHYEGRAVDITTS DRDRSKYGMLARL
 AVEAGFDWVYYESKAHIHCSVKAENSVAAKSGG

10

SEQ ID NO: 8 は、N末端システインがセリン残基で置換されたソニックヘッジホッグ機能的アンタゴニスト
 (「C1S」)である。

SGPGRGFGKRRHPKKLTPLAYKQFIPNVAEKT LGASGRYEGKISRNSE
 RFKELTPNYNPDIIFKDEENTGADRLMTQRCKDKLNALAI SVMNQWP
 GVKLRVTEGWDEDGHHSEESLHYEGRAVDITTS DRDRSKYGMLARL
 AVEAGFDWVYYESKAHIHCSVKAENSVAAKSGG

SEQ ID NO: 9 は、「N-10」ヘッジホッグアンタゴニストのコンセンサス配列であり、
 「Xaa」は3つのタンパク質の間で異なるアミノ酸を示す。

20

R R Xaa6 Xaa7 Xaa8 K Xaa9 L Xaa10 P	L Xaa11 Y K Q F Xaa12 P Xaa13 V
Xaa14 E K T L G A S G R	Xaa15 E G K Xaa16 Xaa17 R Xaa18 S E
R F K Xaa19 L Xaa20 P N Y N	P D I I F K D E E N
Xaa21 G A D R L M T Xaa22 R	C K Xaa23 Xaa24 Xaa25 N S L A I
Xaa26 V M N Xaa27 W P G V K	L R V T E G W D E D
G H H Xaa28 Xaa29 Xaa30 S L H Y	E G R A V D I T T S
D R D R Xaa31 K Y G Xaa32 L	A R L A V E A G F D
W V Y Y E S Xaa33 Xaa34 H Xaa35	H Xaa36 S V K Xaa37 Xaa38
Xaa39 S Xaa40	A A Xaa41 Xaa42 G G

30

ここに

Xaa6はP、H又はY;	Xaa7はP又はA;	Xaa8はR又はK;
Xaa9は何れかのアミノ酸;	Xaa10はV又はT;	Xaa11はA又はL;
Xaa12はS、I又はV;	Xaa13はN又はG;	Xaa14はP又はA;
Xaa15はY又はA;	Xaa16はI又はV;	Xaa17はA又はS;

40

Xaa18はS,N又はG;	Xaa19はE又はD;	Xaa20はT又はV;
Xaa21はT又はS;	Xaa22はQ又はE;	Xaa23はD又はE;
Xaa24はR又はK;	Xaa25はL又はV;	Xaa26はS又はA;
Xaa27はQ又はM;	Xaa28はS又はA;	Xaa29はE又はQ;
Xaa30はE又はD;	Xaa31はN又はS;	Xaa32はL又はM;
Xaa33はK又はR;	Xaa34はA又はN;	Xaa35はV又はI;
Xaa36はC又はV;	Xaa37はS又はA;	Xaa38はE又はD;
Xaa39はH又はN;	Xaa40はA,V又はL;	Xaa41はK又はR;そして
Xaa42はT,S又はA.		

SEQ ID NO: 10 は、最後の9 アミノ酸が無いソニックヘッジホッグ N末端ドメイン変異体(「Shh (C-9)」)である。

10

```
CGPGRGFGKRRHPKKLTPLAYKQFIPNVAEKTGASGRYEGKISRNSE
RFKELTPNYPNDIIFKDEENTGADRLMTQRCKDKLNALAISVMNQWP
GVKLRVTEGWDEDGHHSEESLHYEGRAVDITTSRDRSKYGMLARL
AVEAGFDWVYYESKAHIHCSVKA
```

SEQ ID NO: 11 は、「N-8」ソニックヘッジホッグアンタゴニスト(「Shh (N-8)」)である。

```
KRRHPKKLTPLAYKQFIPNVAEKTGASGRYEGKISRNSERFKELTPN
YNPDIIFKDEENTGADRLMTQRCKDKLNALAISVMNQWPGVKLRVTE
GWDEDGHHSEESLHYEGRAVDITTSRDRSKYGMLARLAVEAGFDW
VYYESKAHIHCSVKAENSVAAKSGG
```

20

SEQ ID NO: 12 及び 13 は、ptc-1 用 PCR プライマー対ヌクレオチドである。

5'-CATTTGGCAGGAGGAGTTGATTGTGG-3' (SEQ ID NO: 12)

5'-AGCACCTTTTGAGTGGAGTTTGGGG-3' (SEQ ID NO: 13)

SEQ ID NO: 14 及び 15 は、gli-1 用 PCR プライマー対ヌクレオチドである。

5'-CGGGGTCTCAAACCTGCCAGCTT-3' (SEQ ID NO: 14)

5'-GGCTGGGTCACTGGCCCTC-3' (SEQ ID NO: 15)

SEQ ID NO: 16 は、成熟(「N-10」)ソニックヘッジホッグのDNA配列である。

30

1 AGGCACCCCCAAAAGCTGACCCCTTTAGCCTACAAGCAGTTTATCCCCAATGTGGCCGAG

61 AAGACCCTAGGCGCCAGCGGAAGGTATGAAGGGAAGATCTCCAGAACTCCGAGCGATT

121 AAGGAACCTACCCCCAATTACAACCCCGACATCATATTTAAGGATGAAGAAAACACCGGA

181 GCGGACAGGCTGATGACTCAGAGGTGTAAGGACAAGTTGAACGCTTTGGCCATCTCGGTG

241ATGAACCACTGGCCAGGAGTGAACTGCGGGTGACCGAGGGCTGGGACGAAGATGGCCAC

301 CACTCAGAGGAGTCTCTGCACTACGAGGGCCGCGCAGTGGACATCACCACGTCTGACCGC

40

361 GACCGCAGCAAGTACGGCATGCTGGCCCCGCTGGCGGTGGAGGCCGGCTTCGACTGGGTG
 421 TACTACGAGTCCAAGGCACATATCCACTGCTCGGTGAAAGCAGAGAACTCGGTGGCGGCC
 481 AAATCGGGAGGC 492

SEQ ID NO: 17 は、成熟「CIS」ソニックヘッジホッグのDNA配列である。

1 TCGGGCCCCGGGCAGGGGGTTCTGGGAAGAGGAGGCACCCCCAAAAGCTGACCCCTTTAGCC
 61 TACAAGCAGTTTATCCCCAATGTGGCCGAGAAGACCCTAGGCGCCAGCGGAAGGTATGAA
 121 GGGAAGATCTCCAGAACTCCGAGCGATTTAAGGAACTCACCCCCAATTACAACCCCGAC
 181 ATCATATTTAAGGATGAAGAAAACACCGGAGCGGACAGGCTGATGACTCAGAGGTGTAAG
 241 GACAAGTTGAACGCTTTGGCCATCTCGGTGATGAACCAAGTGGCCAGGAGTGAACTGCGG
 301 GTGACCGAGGGCTGGGACGAAGATGGCCACCACTCAGAGGAGTCTCTGCACTACGAGGGC
 361 CGCGCAGTGGACATCACCACGTCTGACCGCGACCGCAGCAAGTACGGCATGCTGGCCCCG
 421 CTGGCGGTGGAGGCCGGCTTCGACTGGGTGTACTACGAGTCCAAGGCACATATCCACTGC
 481 TCGGTGAAAGCAGAGAACTCGGTGGCGGCCAAATCGGGAGGC 522

SEQ ID NO: 18及び19 は、オリゴヌクレオチドライゲーション配列である。

5' TCG AGA AAA GAT GCG GAC CGG GCA GGG GGT 3': SEQ ID NO: 18
 5' CGA ACC CCC TGC CCG GTC CGC ATC TTT TC 3': SEQ ID NO: 19

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトインディアン、ソニック及びデザートヘッジホッグ(それぞれ、SEQ ID NO: 2、3及び4)よりなる様々なヒトヘッジホッグタンパク質のN末端断片のアラインメント。

【図2】 ヒトソニックヘッジホッグN末端ドメイン及び変異体のC3H10T1/2アッセイ。huShh及び変異体の活性を、アルカリホスファターゼ誘導を測定するC3H10T1/2アッセイにおいて評価した。

10

20

30

40

S h h (—■—)、S h h (C-9) (—□—)、I h h (—□—)、
D h h (—△—)、h i s タグ付き S h h (—×—)、S h h
(N-5) (—◆—)、S h h (N-9/C-3) (—○—)、S h
h (N-10) (—|—)、S h h (C1S) (—) 及び S h h
(N-8) (—▲—)

の一連の2倍希釈物を細胞と5日間インキュベートして、生じたアルカリホスファターゼ
活性(A P)を、A P発色性基質p-ニトロフェニルホスフェートを用いて405nmで測
定した。与えた数値は、二連の測定の結果を反映している。

【図3】 S h h-N及び切り詰めた変異体のレセプター結合アッセイにおける分析。S
h h (■)、I h h (□)、D h h (△)、h i s タグ付き S h h (×)、S h h (N-5) (◆)、
S h h (N-9/C-3) (○)、S h h (N-10) (|)、S h h (C1S) (—) 及び S h h (N-8) (▲)
のパッチトに結合する相対的効力を、パッチトトランスフェクトしたEBN
A-293細胞につき、FACS分析により評価した。試験試料の一連の希釈物をEBN
A-293細胞とインキュベートし、洗浄してから、結合パーセントをこれらの試料が細
胞への結合をS h h-I gと競争する能力により測定した。結合したS h h-I gを平均
蛍光により定量した。このデータを非線形回帰により双曲線に当てはめた。

【図4】 S h h変異体によるS h h活性のC3H10T1/2ブロッティングアッセイ。
A PのS h h誘導をブロックするS h h変異体の能力を評価した。D h h、S h h (N-
5)、S h h (N-10)、S h h (N-9/C-3)、h i s タグ付き S h h-N及びS h
h (N-8)の一連の2倍希釈物をS h h (2 µg/ml)と30分間インキュベートしてか
ら、C3H10T1/2アッセイにおける分析にかけた。

【図1】

【図2】

Figure 1: ヒトヘッジホッグタンパク質のN末端断片のアラインメント

Indian	CGPGRVVGSR	RRPRK-LVP	LAYKQSPNV	FEKTLGASGR	YEGKIASSE
Sonic	CGPGRGFG-K	RRHEKK-LTP	LAYKQSPNV	AEKTLGASGR	YEGKISRSE
Desert	CGPGRGFGVR	RRYARKQLVP	LLYKQFVGV	FEKTLGASGP	AEGRVARGSE

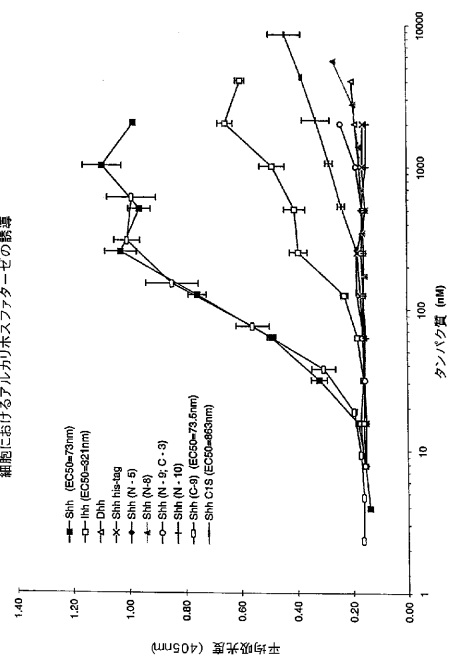
51					
Indian	RFKELTPNYN	FDIIFKDEEN	TGADRLMTQR	CKDKLNALAI	SYMNQWPGVK
Sonic	RFKELTPNYN	FDIIFKDEEN	TGADRLMTQR	CKDKLNALAI	SYMNQWPGVK
Desert	RFKELTPNYN	FDIIFKDEEN	SGADRLMTQR	CKERYNALAI	AVMNMWPGVR

101					
Indian	LRVTEOWDED	GHHSEESLHY	EGRAVDITTS	DRDRNKYGLL	ARLAVEAGFD
Sonic	LRVTEOWDED	GHHSEESLHY	EGRAVDITTS	DRDRNKYGLL	ARLAVEAGFD
Desert	LRVTEOWDED	GHHSEESLHY	EGRAVDITTS	DRDRNKYGLL	ARLAVEAGFD

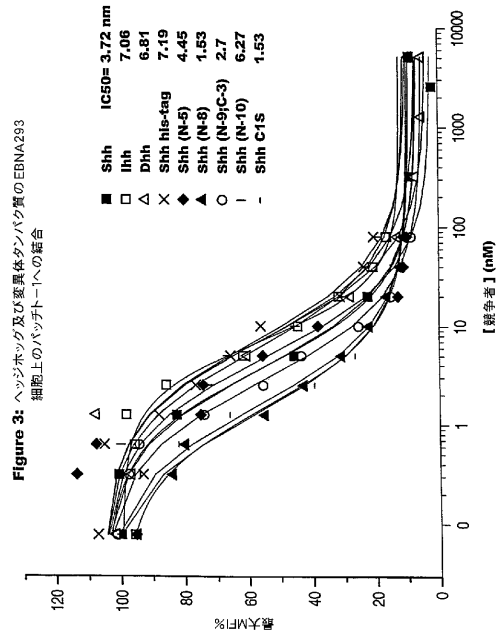
151					
Indian	WVYTESKAHV	HCSVKAENSV	AAKTGG	SEQ ID NO. 2	
Sonic	WVYTESKAHV	HCSVKAENSV	AAKTGG	SEQ ID NO. 3	
Desert	WVYTESKAHV	HCSVKAENSV	AAKTGG	SEQ ID NO. 4	

-により示したギャップはアラインメントを容易にするために加えた

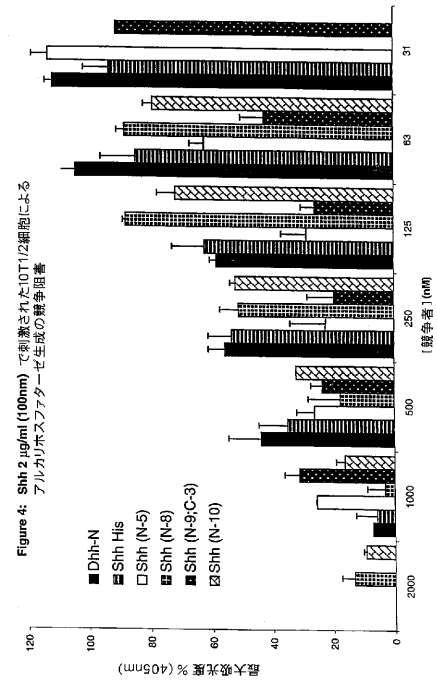
Figure 2: ヒトヘッジホッグタンパク質及び変異体によるC3H10T1/2細胞におけるアルカリホスファターゼの誘導



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 0 7 K</i>	<i>17/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 17/08
<i>C 0 7 K</i>	<i>17/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 17/10
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/15</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/15
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/19
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 1/21
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i> 37/02
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 21/00 C
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/42</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i> 1/42

(72)発明者 エレン エイ. ガーバー
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ、ケンブリッジ、ドネル ストリート 1 4
 (72)発明者 ブレーク アール. ペッピンスキー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ、アーリントン、ファルマス ロード 3 0

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 J.Biol.Chem.,1998,273(22),p.14037-45
 Nature,1996,384(6605),p.129-34
 Nature,1995,378(6553),p.212-6

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C12N 15/00-15/90
 CApus/BIOSIS/MEDLINE(STN)
 PubMed
 WPI