

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成 19 年 11 月 8 日 (2007.11.8)

【公表番号】特表 2007-505825 (P2007-505825A)

【公表日】平成 19 年 3 月 15 日 (2007.3.15)

【年通号数】公開・登録公報 2007-010

【出願番号】特願 2006-525791 (P2006-525791)

【国際特許分類】

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 48/00 Z N A

A 6 1 K 31/713

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 9/10

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/15 Z

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 16/18

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 9 月 14 日 (2007.9.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞周期進行を阻害するための方法で用いる、

a) 配列番号 5、7、9、11、13、1、3 にて表される核酸配列、

b) 100 残基にわたり、少なくとも 25% の a) による核酸によってコードされているタンパク質との配列同一性を示し、および / または B L A S T 配列解析プログラムを用い

たコンピュータ補助検索で、最大で  $10^{-5}$  の e 値で検出可能である、ポリペプチドをコードしている核酸配列、

c) 中または高ストリンジエンシーの条件下で、(a) または (b) に対応する配列を持つ核酸分子と、ハイブリッド形成可能な核酸分子の配列、

d) (a)、(b) または (c) で定義したような配列のいずれかのアンチセンス - 配列、

e) (a)、(b)、(c) または (d) の断片、

f) (a)、(b)、(c)、(d) または (e) にて定義したような配列のいずれかに対応する、アンチセンスまたはセンス方向での、2 本鎖 RNA または 1 本鎖 RNA、からなる配列の群から選択される配列を持つ、核酸分子を含む単離核酸分子。

【請求項 2】

該単離核酸分子が、請求項 1 に記載の配列のいずれかに対応する配列を持つ、低分子干渉 RNA を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

該核酸分子が、好適な条件下で、センス - RNA - 鎖およびアンチセンス - RNA - 鎖を含む、2 本鎖 RNA - 分子を産出可能である、少なくとも 1 つの核酸発現ベクター内に含まれ、各 RNA - 鎖が、互いに独立して、19 ~ 31ヌクレオチドの長さを持つか、または

該核酸分子が、第 1 プロモーターの制御下、センス RNA 鎖に対応する核酸を含有する、第 1 発現カセット、および第 2 プロモーターの制御下、アンチセンス RNA 鎖に対応する核酸を含有する、第 2 発現カセットを含む、少なくとも 1 つの核酸発現ベクター内に含まれるか、または

該核酸分子が、1 本鎖 - RNA - 分子を導くプロモーターの制御下、センス RNA 鎖およびアンチセンス RNA 鎖に対応する核酸を含有する発現カセットを含む、少なくとも 1 つの核酸発現ベクター内に含まれ、該 1 本鎖 RNA - 分子が、後方折り畳み、ステムループ構造を形成可能である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

各 RNA 鎖が、互いに独立して、20 ~ 25 の長さ、好ましくは、20 ~ 22ヌクレオチドの長さを有するか、または

各 RNA 鎖が、互いに独立して、26 ~ 28 の長さ、好ましくは 27ヌクレオチドの長さを有する、請求項 2 または 3 のうちいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

細胞周期進行を阻害するための方法で用いる、

(a) 配列番号 6、8、10、12、14、2、4 にて開示されたような配列、

(b) 100 残基にわたり、少なくとも 25 % の (a) による配列のいずれかとの配列同一性を示す配列、

(c) (a) または (b) にて定義したような配列の断片、

からなる群から選択される配列を持つ、ペプチドまたはポリペプチドを含む、単離ペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 6】

細胞周期進行を阻害するための方法で用いる、請求項 5 にて定義したような配列を持つ、少なくとも 1 つのペプチドまたはポリペプチドに対して指向される抗体。

【請求項 7】

医薬品が、増殖性疾患の治療用であり、特に、該疾患が、冠動脈再狭窄または新生物疾患であり、後者が好ましくは、リンパ腫、肺がん、大腸がん、卵巣がんおよび乳がんからなる群より選択される、請求項 1 ~ 6 のうちいずれか 1 項に記載の核酸分子、ペプチド、ポリペプチドまたは抗体。

【請求項 8】

細胞周期進行を活性化するための方法で用いる、

a) 配列番号 5、7、9、11、13、1、3 にて表される核酸配列、

b) 100 残基にわたり、少なくとも 25 % の a) による核酸によってコードされているタンパク質との配列同一性を示し、および / または B L A S T 配列解析プログラムを用いたコンピュータ補助検索で、最大で  $10^{-5}$  の e 値で検出可能である、ポリペプチドをコードしている核酸配列、

c) 中または高ストリンジェンシーの条件下で、( a ) または ( b ) に対応する配列を持つ核酸分子と、ハイブリッド形成可能な核酸分子の配列、

d) ( a )、( b ) または ( c ) で定義したような配列のいずれかの アンチセンス - 配列、

e) ( a )、( b )、( c ) または ( d ) の断片、

f) ( a )、( b )、( c )、( d ) または ( e ) にて定義したような配列のいずれかに対応する、RNA 配列、

からなる配列の群から選択される配列を持つ、核酸分子を含む単離核酸分子。

【請求項 9】

細胞周期進行を活性化するための方法で用いる、

( a ) 配列番号 6、8、10、12、14、2、4 にて開示されたような配列、

( b ) 100 残基にわたり、少なくとも 25 % の ( a ) による配列のいずれかとの配列同一性を示す配列、

( c ) ( a ) または ( b ) にて定義したような配列の断片、

からなる群から選択される配列を持つ、ペプチドまたはポリペプチドを含む、単離ペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 10】

細胞周期進行を活性化するための方法で用いる、請求項 5 にて定義したような配列を持つ、少なくとも 1 つのペプチドまたはポリペプチドに対して指向される抗体。

【請求項 11】

医薬品が、アポトーシスの増加、増殖遅延または傷治癒の遅れによって特徴づけられる疾患の治療用である、請求項 8 ~ 10 のうちいずれか 1 項に記載の核酸分子、ペプチド、ポリペプチドまたは抗体。

【請求項 12】

a) 請求項 1 ~ 4 のうちのいずれか 1 項で定義したような核酸分子または核酸発現ベクター、

b) 請求項 5 にて定義したような配列を含む、ペプチドまたはポリペプチド、

c) ( b ) による、少なくとも 1 つのペプチドまたはポリペプチドに対して指向する抗体、

からなる群より選択される単離核酸分子、ペプチド、ポリペプチドまたは抗体を含む、医薬品。

【請求項 13】

増殖性疾患または異常細胞周期進行に関連した疾患の *in vitro* 診断のための方法で用いる、請求項 1 にて定義したような配列を含む、単離核酸分子、または請求項 5 にて定義したような配列を含む、少なくとも 1 つのポリペプチドに特に結合するリガンドであって、

特に、該疾患が、冠動脈再狭窄または新生物疾患であり、後者が好ましくは、リンパ腫、肺がん、大腸がん、卵巣がんおよび乳がんからなる群より選択される、単離核酸分子またはリガンド。

【請求項 14】

増殖性疾患または異常細胞周期進行に関連した疾患の *in vitro* 診断のための、請求項 1 または 2 にて定義したような単離核酸分子、および / または請求項 5 にて定義したような少なくとも 1 つのポリペプチドに対して指向するリガンドを含む、診断キット。

【請求項 15】

細胞周期進行を阻害、または活性化する薬物の同定および特性化のためのスクリーニングアッセイで用いる、請求項 1 ~ 4 のうちいずれか 1 項で定義されたような、単離核酸分

子、または核酸発現ベクター、または請求項 5 にて定義されたような配列を含む、少なくとも 1 つのポリペプチドに対して指向する抗体。

【請求項 16】

細胞周期進行を阻害、または活性化する相互作用薬物に関するスクリーニングアッセイで用いる、請求項 5 にて定義されたような配列を持つポリペプチド。

【請求項 17】

a) 請求項 1 ~ 4 のうちいずれか 1 項で定義したような核酸分子または核酸発現ベクターの、宿主細胞または宿主器官への形質導入、  
b) 阻害または活性化分子に対する少なくとも 1 つの候補が存在する、または存在しないかいずれかで、段階 a) の核酸によってコードされるか、または対応する、ポリペプチドまたは RNA の過剰発現を許容する条件下での、段階 a) にて得た、宿主細胞または宿主器官の培養、  
c) 培養された該細胞または器官における細胞周期進行の解析、およびそれによる、細胞周期進行の阻害剤または活性剤の同定、  
の段階を含む、細胞周期進行を阻害、または活性化する、阻害または活性化分子の同定および特性化のためのスクリーニング方法。

【請求項 18】

a) 宿主細胞内で、請求項 1 にて定義したような核酸分子配列によってコードされたポリペプチドを、組み換え体的に発現させること、  
b) 該組み換え体的に発現した段階 (a) のポリペプチドを、単離し、任意に精製すること、  
c) 試験基質を任意に標識化すること、および / または該組み換え体的に発現したポリペプチドを標識化すること、  
d) 該組み換え体的に発現したポリペプチドを、固体相に固定化すること、  
e) 該固定化ポリペプチドと、少なくとも 1 つの試験基質を接触させること、  
f) 任意に一回以上の洗浄段階、  
g) 固体相にて固定化したポリペプチドに対する、少なくとも 1 つの試験基質の結合を検出すること、および  
h) 細胞周期進行の阻害または活性化のための、機能アッセイを実施すること、  
の段階を含む、試験基質のライブラリーからの、細胞周期進行を阻害、または活性化する相互作用分子の同定および特性化のためのスクリーニング方法。

【請求項 19】

細胞周期進行の阻害剤または活性剤が、請求項 17 または 18 によって同定され、適切な量で合成され、薬理的組成物中に処方されるか、または細胞周期進行の阻害剤または活性剤が、請求項 17 または 18 によって提供され、薬理的組成物内に処方される、薬理的組成物の調製方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

本問題は、細胞周期進行の阻害のための、医薬品の製造のために、  
a) 配列番号 5、7、9、11、13、1、3 にて表される核酸配列、  
b) 100 残基にわたり、少なくとも 25 % の a) による核酸によってコードされているタンパク質との配列同一性を示し、および / または BLAST 配列解析プログラムを用いたコンピュータ補助検索で、最大で  $10^{-5}$  の e 値で検出可能である、ポリペプチドをコードしている核酸配列、  
c) 中または高ストリンジェンシーの条件下で、(a) または (b) に対応する配列を持つ核酸分子と、ハイブリッド形成可能な核酸分子の配列、

d) (a)、(b)または(c)で定義したような配列のいずれかのアンチセンス - 配列、  
e) (a)、(b)、(c)または(d)の断片、  
f) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)にて定義したような配列のいずれかに  
対応する、アンチセンスまたはセンス方向での、2本鎖RNAまたは1本鎖RNA、  
からなる配列の群から選択される配列を持つ、核酸分子を含む単離核酸分子の利用によっ  
て解決される。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

さらに好ましい実施形態によると、核酸分子は、中/高ストリンジェンシーの条件下、  
(a)または(b)の核酸配列とハイブリッド形成可能である、ヌクレオチド配列を含む  
。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0036】

このDNAまたはRNA配列が、特定のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプ  
ローブに「ハイブリッド形成」するかどうかを決定するために好適な実験条件は、 $5 \times S$   
 $S C$  (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)緩衝液中、10分間のハイブリッド形成と  
、 $5 \times S S C$ 、 $5 \times D e n h a r d t$ 溶液、 $0.5\%$   $S D S$ および $100 mg/ml$ の  
還元超音波処理サケ精子DNA (M a n i a t i s ら, 1989)の溶液中でのフィルタ  
ーの前ハイブリッド形成、それに続く、 $10 ng/ml$ 濃度のランダムプライム化 (F e  
i n b e r g, A . P . a n d V o g e l s t e i n, B . (1983), A n a l .  
B i o c h e m . 132: 6 - 13)、 $^{32}P$ -dCTP標識化 (特異的活性  $> 1 \times 10^9$   
c p m /  $\mu g$ ) プローブを含む同様の溶液中での、およそ45 にて12時間のハイブリ  
ッド形成に関して試験するために、DNAまたはRNAを含むフィルターの予浸が伴う。  
ついでフィルターを2回、30分間、 $2 \times S S C$ 、 $0.5\%$   $S D S$ 中、少なくとも55  
(低ストリンジェンシー)、少なくとも60 (中ストリンジェンシー)、好ましくは  
少なくとも65 (中/高ストリンジェンシー)、より好ましくは、少なくとも70 (高  
ストリンジェンシー)、またはもっとも好ましくは、少なくとも75 (非常に高スト  
リンジェンシー)で、2回洗浄する。プローブが選択した条件下でハイブリッド形成する  
分子を、 $x$ 線フィルムまたは「リン撮像装置」を用いて検出する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

好ましい実施形態において、本発明は、以上で同定した核酸配列に関して、 $s i R N A$   
を産出可能なベクター系の利用に関し、そこで、配列は、1本鎖RNA分子を導くプロモ  
ーターの制御下、センスRNA鎖の、およびアンチセンスRNA鎖の配列を含む発現カセ  
ットを含む、少なくとも1つの核酸発現ベクターに含まれ、1本鎖RNA分子は、後方折  
り畳み (back-folded)、ステムループ構造を形成可能である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

本ベクター系（また、Tuschl, Nature Biotechnology, Vol. 20, pp. 446 - 448にて記述された）にて、単一RNA鎖のみが、単一のプロモーターの制御下で産出され、そこで、RNA分子鎖は、最終2本鎖siRNA分子のセンスおよびアンチセンス鎖両方を含む。この構造により、ステムループ形成下、相補的センスおよびアンチセンス配列のハイブリッド形成によって、RNA鎖の後方折り畳みが導かれる。最後に、この折り畳み後方ステムループ構造の細胞内処理によって、siRNAができる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

本発明による他の好ましい実施形態において、「核酸発現ベクター (nucleic acid expression vector)」には、1本鎖のRNA分子へ導く単一のプロモーターの制御下、センスRNA鎖の、およびアンチセンスRNA鎖の配列を含む発現カセットが含まれる。この1本鎖RNA分子はそれによって、後方折り畳みステムループ構造を形成可能である。これらの発現した「ヘアピンRNA分子 (hairpin RNA - molecule)」が続いて、細胞内処理の後にsiRNAとなる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0097

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0097】

他の態様において、本発明は、細胞周期進行を活性化する医薬品の製造において、

a) 配列番号5、7、9、11、13、1、3にて表される核酸配列、

b) 100残基にわたり、少なくとも25%のa)による核酸によってコードされているタンパク質との配列同一性を示す、および/またはBLAST配列解析プログラムを用いた、コンピュータ補助検索で、最大で $10^{-5}$ のe値で検出可能である、ポリペプチドをコードしている核酸配列、

c) 中または高ストリンジェンシーの条件下で、(a)または(b)に対応する配列を持つ核酸分子と、ハイブリッド形成可能な核酸分子の配列、

d) (a)、(b)または(c)で定義したような配列のいずれかのアンチセンス - 配列、

e) (a)、(b)、(c)または(d)の断片、

f) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)にて定義したような配列のいずれかに対応する、DNA配列、

からなる配列の群から選択される配列を持つ、核酸分子を含む、単離核酸分子の利用に関する。