

【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 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 18 年 6 月 1 日 (2006.6.1)

【公表番号】特表 2002-511263(P2002-511263A)

【公表日】平成 14 年 4 月 16 日 (2002.4.16)

【出願番号】特願 2000-543606(P2000-543606)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 R 1/645 (2006.01)

C 1 2 R 1/19 (2006.01)

C 1 2 R 1/91 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 14/705

C 0 7 K 16/00

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/68

C 1 2 N 5/00 A

C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:645

C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19

C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91

【手続補正書】

【提出日】平成 18 年 4 月 4 日 (2006.4.4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a) F i g 1 (配列番号：2) のアミノ酸 1 ~ 約 1 2 0 3 の配列を含む p a t c h e d - 2 ポリペプチドをコードする DNA 分子、又は (b) (a) の相補鎖に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有し、p a t c h e d - 2 の生物学的活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含んでなる単離された核酸。

【請求項 2】 (a) A T C C 寄託番号 2 0 9 7 7 8 (記号：p R K 7 . h p t c 2 . F l a g - 1 4 0 5) の c D N A によってコードされるのと同じ成熟ポリペプチドをコードする DNA 分子、又は (b) (a) の DNA 分子の相補鎖に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する DNA を含んでなる単離された核酸。

【請求項 3】 A T C C 寄託番号 2 0 9 7 7 8 (記号：p R K 7 . h p t c 2 . F l a g - 1 4 0 5) の c D N A の配列をコードするヒト p a t c h e d - 2 を含んでなる請求項 2 に記載の単離された核酸。

【請求項 4】 請求項 1 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 5】 当該ベクターで形質転換された宿主細胞に認識されるコントロール配列に作用可能に結合した請求項 4 に記載のベクター。

【請求項 6】 請求項 4 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 7】 哺乳動物である請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 8】 前記細胞が C H O 細胞である請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】 原核生物である請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 0】 前記細胞が大腸菌細胞である請求項 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 1】 前記細胞が酵母菌細胞である請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 2】 サッカロミセスセレビシシアエである請求項 1 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 3】 請求項 9 に記載の宿主細胞を、脊椎動物 p a t c h e d - 2 の発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から p a t c h e d - 2 を回収することを含んでなる p a t c h e d - 2 ポリペプチドの製造方法。

【請求項 1 4】 F i g 1 (配列番号：2) のアミノ酸残基 1 ~ 1 2 0 3 を含んでなる単離された天然配列ヒト p a t c h e d - 2 ポリペプチド。

【請求項 1 5】 A T C C 登録番号 2 0 9 7 7 8 (記号：p R K 7 . h p t c 2 . F l a g - 1 4 0 5) の下で寄託された p a t c h e d - 2 生物学的活性を有するヌクレオチドにコードされる単離された天然配列ヒト p a t c h e d - 2 ポリペプチド。

【請求項 1 6】 異種アミノ酸配列に融合した脊椎動物 p a t c h e d - 2 ポリペプチド P a t c h e d - 2 を含んでなるキメラ分子。

【請求項 1 7】 前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である請求項 1 6 に記載のキメラ分子。

【請求項 1 8】 前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンの定常領域である請求項 1 7 に記載のキメラ分子。

【請求項 1 9】 D h h シグナル伝達経路における D h h の機能を阻止、防止、阻害及び / 又は中和する p a t c h e d - 2 のアンタゴニスト。

【請求項 2 0】 生物有機化学的小分子である請求項 1 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 2 1】 アンチセンスヌクレオチドである請求項 1 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 2 2】 D h h シグナル伝達経路において p a t c h e d - 2 の正常な機能発現を刺激又は促進する p a t c h e d - 2 のアゴニスト。

【請求項 2 3】 P t c h - 2 (配列番号：2) の S m o (配列番号：1 7) 活性化を防止する請求項 2 2 に記載のアゴニスト。

【請求項 2 4】 生物有機化学的小分子である請求項 2 2 に記載のアゴニスト。

【請求項 2 5】 生物有機化学的小分子である請求項 2 4 に記載のアゴニスト。

【請求項 2 6】 p a t c h e d - 2 生物学的活性のアンタゴニスト又はアゴニストのためのスクリーニング方法において、

(a) 培地中で p a t c h e d - 2 発現標的細胞を候補化合物及び D h h に暴露し、そして

(b) 細胞を D h h の p a t c h e d - 2 への結合について分析するか、又は

(c) 処理した細胞のフェノタイプ又は機能変化を評点化し、

そして、当該結果を候補化合物に暴露していない対照細胞と比較することを含んでなる方法。

【請求項 27】 p a t c h e d - 2 生物学的活性のアンタゴニスト又はアゴニスト分子のためのスクリーニング方法において、

(a) p a t c h e d - 2 リガンド及び p a t c h e d - 2 生物学的活性を有する化合物を候補アンタゴニスト又はアゴニストに暴露し、そして

(b) 基質をリガンドの化合物への結合について分析し、そして、

当該結果を候補分子に暴露していない対照反応と比較することを含んでなる方法。

【請求項 28】 特定の疾患が D h h シグナル伝達によって変調されるか否かを決定する診断方法において、

(a) 試験細胞又は組織を培養し、

(b) p a t c h e d - 2 変調 D h h シグナル伝達を阻害できる化合物を投与し、そして、

(c) 試験細胞における p a t c h e d - 2 への D h h 結合又は D h h 変調フェノタイプ効果のレベルを分析することを含んでなる方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

(発明の概要)

一実施態様では、本発明は、(a) F i g 1 のアミノ酸 1 ~ 1 2 0 3 の配列を含む p a t c h e d - 2 ポリペプチドをコードする D N A 分子、又は (b) (a) の D N A 分子の相補鎖に対して少なくとも約 8 0 % の配列同一性を有し； p a t c h e d - 2 の生物学的活性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。配列同一性は、好ましくは > 9 1 %、より好ましくは約 9 2 %、最も好ましくは約 9 5 % である。一態様において、単離された核酸は、F i g 1 のアミノ酸残基 1 ~ 約 1 2 0 3 の配列を有するポリペプチドに対して少なくとも > 9 1 %、より好ましくは少なくとも約 9 2 %、さらに好ましくは少なくとも約 9 5 % の配列同一性を有する。さらなる態様において、単離された核酸分子は、F i g 1 のアミノ酸残基 1 ~ 約 1 2 0 3 を有するヒト p a t c h e d - 2 ポリペプチドをコードする D N A を含んでなる。さらに他の態様では、本発明は、(a) A T C C 寄託番号 2 0 9 7 7 8 の c D N A (記号：p R K 7 . h p t c 2 . F l a g - 1 4 0 5) にコードされるのと同じ成熟ポリペプチドをコードする D N A 分子、あるいは、A T C C 2 0 9 7 7 8 の登録番号で寄託されたクローン p R K 7 . h p t c 2 . F l a g - 1 4 0 5 のコード化配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する D N A を含んでなる単離された核酸を提供する。またさらなる態様では、本発明は A T C C 寄託番号 2 0 9 7 7 8 の c D N A (記号：p R K 7 . h p t c 2 . F l a g - 1 4 0 5) の c D N A の配列、又はそれに緊縮条件下でハイブリッド形成する配列をコードするヒト p a t c h e d - 2 を含んでなる核酸を提供する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

(好適な実施態様の詳細な説明)

I . 定義

ここで使用される際の「p a t c h e d - 2」及び「p a t c h e d - 2 ポリペプチド」という用語は、天然配列 p a t c h e d - 2 及び p a t c h e d - 2 の生物学的活性を有する p a t c h e d - 2 変異体（ここで更に詳細に定義する）を含む。p a t c h e d - 2 は、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、あるいは組換え又は合成方法によって調製してもよい。

「天然配列 p a t c h e d - 2」は、天然由来のヒト p a t c h e d - 2 ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列 p a t c h e d - 2 は、自然から単離することもできるし、組換え及び／又は合成手段により生産することもできる。「天然配列脊椎動物 p a t c h e d - 2」という用語には、特に、ヒト p a t c h e d - 2 の自然に生じる切断形態、自然に生じる変異形態（例えば、選択的にスプライシングされた形態）及びヒト p a t c h e d - 2 の自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。よって、本発明の一実施態様において、天然配列 p a t c h e d - 2 は、F i g 1（配列番号：2）のアミノ酸 1 ～ 1 2 0 3 を含む成熟又は全長天然ヒト P t c h - 2 であり、位置 1 に開始メチオニンを有しても有さなくてもよい。

「p a t c h e d - 2 変異体」とは、以下に定義されるように、（a）p a t c h e d - 2 ポリペプチドをコードする DNA 分子、又は（b）（a）の DNA 分子の相補鎖と少なくとも約 > 9 1 % のアミノ酸配列同一性を有する活性なヒト p a t c h e d - 2 を意味する。特別な実施態様において、p a t c h e d - 2 変異体は、全長天然配列ヒト p a t c h e d - 2 について F i g 1 に示した推定アミノ酸配列を有するヒト P t c h - 2（配列番号：2）と少なくとも > 9 1 % のアミノ酸配列相同性を有する。このような p a t c h e d - 2 変異体は、これらに限られないが、F i g 1（配列番号：2）の配列の N-又は C-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失された p a t c h e d - 2 ポリペプチドを含む。好ましくは、核酸又はアミノ酸配列同一性は、少なくとも約 9 2 %、より好ましくは少なくとも約 9 3 %、さらにより好ましくは少なくとも約 9 5 % である。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 3】

（2）p a t c h e d - 2 の一般的用途

p a t c h e d - 2 をコードする核酸配列（又はそれらの相補鎖）は、ハイブリッド形成プローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンス RNA 及び DNA の生成において種々の用途を有している。また、p a t c h e d - 2 核酸は、ここに記載される組み換え技術による p a t c h e d - 2 ポリペプチドの調製にも有用であろう。

全長天然配列 p a t c h e d - 2 遺伝子、又はその一部は、全長遺伝子の単離又は F i g 1（配列番号：1）に開示された p a t c h e d - 2 配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他の遺伝子（例えば、p a t c h e d - 2 の天然発生変異体をコードするもの）の単離のための c DNA ライブラリ用のハイブリッド形成プローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約 2 0 ～ 約 5 0 塩基である。ハイブリッド形成プローブは、F i g 1（配列番号：1）の核酸配列から、又は天然配列 p a t c h e d - 2 のプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から誘導され得る。例えば、スクリーニング法は、p a t c h e d - 2 遺伝子のコード化領域を周知の DNA 配列を用いて単離して約 4 0 塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリッド形成プローブは、3 2 P 又は 3 5 S 等の放射性ヌクレオチド、又はアビジン／ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識されうる。本発明の p a t c h e d - 2 遺伝子に相補的な配列を有する標識されたプ

ローブは、ヒト c D N A、ゲノム D N A 又は m R N A のライブラリーをスクリーニングし、それらのライブラリーの何れのメンバーがプローブにハイブッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリッド形成技術は、以下の実施例において更に詳細に記載する。

また、プローブは、P C R 技術に用いて、密接に関連した p a t c h e d - 2 配列の同定のための配列のプールを作成するのに用いることができる。