

【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 2007-505824(P2007-505824A)
 【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 2006-525790(P2006-525790)
 【国際特許分類】

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 38/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (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 16/18 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 31/7105
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 37/02
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 K 45/00
 C 1 2 Q 1/68 A
 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 Z N A A
 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】

細胞分裂の間の、スピンドル形成または微小管機能を阻害するための方法で用いる、
 a) 配列 I D 番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、2

5、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59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一分子を産出可能であるすくなくとも1つの核酸発現ベクター中に含有され、各RNA鎖が、互いに独立して、19～31ヌクレオチドの長さを有するか、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に含有されるか、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中に含有され、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】

細胞分裂の間の、スピンドル形成または微小管機能を阻害するための方法で用いる、

(a) 配列ID番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60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)による任意の配列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、

からなる配列の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】

細胞分裂の間の、スピンドル形成または微小管機能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】

細胞分裂の間の、スピンドル形成または微小管機能を活性化するための方法で用いる、
a) 配列 I D 番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59 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) で定義したような任意の配列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任意の配列に対応する、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】

細胞分裂の間の、スピンドル形成または微小管機能を活性化するための方法で用いる、
(a) 配列 I D 番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 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) による任意の配列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、
からなる配列の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】

細胞分裂の間の、スピンドル形成または微小管機能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】

増殖性疾患または細胞分裂の間の異常なスピンドル形成または微小管機能に関連した疾患の i n v i t r o 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】

増殖性疾患または細胞分裂の間の異常なスピンドル形成または微小管機能に関連した疾患の *in vitro* 診断において、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】

細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能を阻害する、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 項に定義される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】

細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能を阻害する、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 項に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) 該培養細胞または器官における細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能の解析、およびそれによる、細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能の阻害剤または活性化物の同定、
の段階を含む、細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能を阻害する、または活性化する、阻害剤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) 細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能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、細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能を阻害する、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】

細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能の阻害剤または活性化物が、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、または細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能の阻害剤または活性化物が、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】

この問題は、細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能を阻害する医薬品の製造において、

a) 配列 I D 番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59 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 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) で定義したような任意の配列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任意の配列に対応する、アンチセンスまたはセンス方向での、2 本鎖 R N A または 1 本鎖 R N A、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】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

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】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

この DNA または R N A 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 e t a l. , 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-d C T P 標識化 (特異的活性 $> 1 \times 10^9 \text{ cpm}/\mu\text{g}$) プローブを含む同様の溶液中での、およそ 45°C 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 R N A 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】0078

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0078】

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、siRNA 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】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

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】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

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】0104

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0104】

他の態様において、本発明は、細胞分裂の間のスピンドル形成または微小管機能の活性化する医薬品の製造のための、

a) 配列 ID 番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、2

5、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59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)で定義したような任意の配列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任意の配列に対応する、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。