

【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1月12日(2006.1.12)

【公表番号】特表2005-510250(P2005-510250A)

【公表日】平成17年4月21日(2005.4.21)

【年通号数】公開・登録公報2005-016

【出願番号】特願2003-547941(P2003-547941)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

C 1 2 Q 1/66 (2006.01)

G 0 1 N 21/76 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/16 (2006.01)

A 6 1 P 25/20 (2006.01)

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 25/30 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 Q 1/48

C 1 2 Q 1/66

G 0 1 N 21/76

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 Z

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 25/16

A 6 1 P 25/20

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 25/30

【手続補正書】

【提出日】平成17年11月15日(2005.11.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

本発明は、ヒトを含む哺乳類の種々の神経系関連の疾患の診断に有効である。そのような障害は、空間認知障害、臭覚・味覚嫌悪学習障害(impaired spatial, olfactory and taste-aversion learning)を含む学習・記憶障害、アルツハイマー病に伴う学習・記憶障害ならびにパーキンソン病およびそれと同種類のもののような他の神経変性疾患に伴う障害を含む学習および記憶過程の障害を含むものである。本発明は、セリンプロテアーゼ

インヒビター、特に P N - 1 の発現を検出することにより、生体において活性化されたニューロン回路（ニューロナル回路）および障害・減損を受けている可能性のあるニューロン回路を解剖学的に特定化し、モニタリングする方法を提供するものである。したがって、P N - 1 発現の特定のパターンによって、所定の疾患、疾患または関連する病態と結びつけることが可能となり、そして同様のもの（疾患、障害または関連する病態）の診断に用いることも可能となる。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 2】

動物の脳組織を候補化合物と接触させることと、セリンプロテアーゼインヒビター発現の変化がないかどうか、好ましくは、プロテアーゼ ネキシン - 1（P N - 1）のようなタンパク質（たとえば、ニューロセルピン（neuroserpin）、ベイト（BAIT）またはセルピンスーパーファミリー（serpin superfamily）属の他のメンバー）の発現のレベル（発現量）の変化がないかどうか、最も好ましくは、候補化合物が存在しない場合と比較してプロテアーゼ ネキシン - 1（P N - 1）の発現レベルの変化がないかどうかをアッセイすることと（そこで、特定の脳領域におけるセリンプロテアーゼインヒビターの発現が疾患、障害またはその関連する病態を表示している）；および上記の化合物が存在しない場合と比較してセリンプロテアーゼインヒビターの発現レベルを変化させる化合物をニューロン活性および／または神経（ニューロン）可塑性の調節剤として選択することを含んだニューロン活性を調節する化合物をスクリーニングする方法をも提供する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 1】

本発明は、P N - 1 の発現レベルに基づいてニューロン活性および／またはニューロン可塑性を研究するため；医薬としての候補化合物をスクリーニングすることまたは可能性のある治療的インターベンションの評価のため；および P N - 1 調節シーケンス（配列）（PN-1 regulatory sequences）のコントロールのもとでのタンパク質マーカー（たとえばレポータージーンプロダクト（reporter gene product））発現する移植された（explanted）哺乳類細胞培養の創製のための非ヒト動物モデルを提供する。P N - 1 調節シーケンスは、完全な P N - 1 遺伝子または作動可能なそのフラグメント（operable fragment）として、好ましくは、完全な P N - 1 遺伝子として、ノックイン動物の形で存在し得る。

【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 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 6】

ニューロン活性／可塑性のための動物を作成する方法はいくつかあるが、その一つが、下記の実施例 1 に例示されている。好ましい態様においては、ノックインマウスまたはラットが、セリンプロテアーゼインヒビターローカス（serine protease inhibitor locus）の 3'末端にリボソーム内部認識部位（internal-ribosomal-entry-site）／レポーターコンストラクトを挿入して作成される。下記の実施例は、ノックインマウスを用いて、本発明を説明しているが、内因性の P N - 1 遺伝子シーケンスの存在下もしくは不存在

下で、他のレポータータンパク質が使用できることは、明細書に照らして、本技術分野において通常の技能を有する者にとっては、明らかなことである。ロックス ピー サイト ( l o x p s i t e s ) のような組換えエレメントを挿入することは、C r e 組換え酵素 ( C r e recombinase ) のような酵素で認められているように、有利に使用され得る。マウスを作成するには、所望の核酸をマウス生殖系 ( mouse germ line ) に挿入することができるが、卵母細胞マイクロインジェクション、または胚性幹細胞における相同組換えを伴う胚性幹細胞遺伝子導入またはマイクロインジェクションのような標準的な方法を用いる。一般的には、トランスジェニック/ノックイン動物を作る手法は、広く受け入れられており実施されている。マウスの胚を取り扱う研究所マニュアルは、たとえば、トランスジェニックマウスを作成する標準的研究手法として詳述されており ( H o g a n e t a l . , 1 9 8 6 ) 、利用可能である。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

さらに、本発明によって、P N - 1 の調節シーケンスのコントロールのもとで、遺伝子産物を蛍光発光により検出して、遺伝子産物 ( gene product ) を発現する幹細胞または前駆細胞を他の細胞から選び出す方法も提供される。遺伝子産物自体が蛍光を発することもあり得るし (たとえば、緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) ) または、遺伝子産物は、蛍光分子を放つ酵素反応によって検出できる。細胞は、P N - 1 発現が基準のレベル以上 (すなわち P N - 1 のプロモーター活性) であることを特徴とし、好ましくは、蛍光標示式細胞分取器 ( F A C S ) を用いて細胞の混合集団から選択される。それゆえ、選択された細胞は、蛍光によって検出できるタンパク質を所有しており、それは、P N - 1 プロモーターシーケンスのコントロールのもとで所望より P N - 1 とともに発現される。一つの実施態様においては、β-ガラクトシダーゼによって例示されているようにレポーター遺伝子を発現する細胞は、レポーター遺伝子の蛍光基質を F A C S とともに利用する方法によって、精製される (たとえば、A b e e t a l . , D e v B i o l . 1 9 9 6 ; 1 8 0 ( 2 ) : 4 6 8 - 7 2 参照)。選別された細胞は、ニューロン活性または可塑性の調節剤を特定化するスクリーンのようなイン・ビトロにおけるスクリーンのために有用である。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

上記の説明は、イン・ビボにおけるニューロン活性を調節するかまたはニューロン可塑性が変化する薬剤を特定化するために本発明の動物モデルを使用することに言及しているが、本発明はそのように限定されない。本発明のもう一つの態様にしたがって、P N - 1 調節シーケンスのコントロールのもとで、P N - 1 またはタンパク質マーカー (たとえばレポーター遺伝子) を発現する体外移植された哺乳類の細胞培養は、ニューロン活性を調節するかまたはニューロン可塑性において変化する薬剤をスクリーニングするために使用されることができる。