

【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17年12月22日(2005.12.22)

【公表番号】特表2004-537289(P2004-537289A)

【公表日】平成16年12月16日(2004.12.16)

【年通号数】公開・登録公報2004-049

【出願番号】特願2002-588919(P2002-588919)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09
 A 0 1 K 67/027
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 19/10
 C 0 7 K 14/47
 C 0 7 K 16/18
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 Q 1/68
 G 0 1 N 33/15
 G 0 1 N 33/50
 G 0 1 N 33/53
 G 0 1 N 33/566
 // C 1 2 P 21/08

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 0 1 K	67/027	
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	19/10	
C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	16/18	
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/566	
C 1 2 N	5/00	B
C 1 2 P	21/08	

【手続補正書】

【提出日】平成17年2月22日(2005.2.22)

【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】

細胞中で発現された場合にHBM様表現型を示すLRP5またはLRP6中に変異を含む核酸であって、前記HBM様表現型により骨量および/または脂質レベルが調整される核酸。

【請求項 2】

細胞中で発現された場合に表2もしくは3の少なくとも1つの変異を含むか、G171V、A214V、A65V、M282V、G171K、G171F、G171I、G171Q、L200V、T201V、I202V、またはS127Vの1つの変異となるLRP5核酸であって、被験体中での前記核酸の発現により骨量および/または脂質レベルが調整される、LRP5核酸。

【請求項 3】

細胞中で発現された場合に表2もしくは3の少なくとも1つの変異を含むか、G171V、A214V、A65V、M282V、G171K、G171F、G171I、G171Q、L200V、T201V、I202V、またはS127Vの1つの変異となるLRP6核酸であって、LRP5と等価の位置でLRP6の変異が起き、被験体中での前記核酸の発現により骨量および/または脂質レベルが調整されることを特徴とするLRP6核酸。

【請求項 4】

プロペラ1中で少なくとも1つのアミノ酸変異をコードするLRP5核酸。

【請求項 5】

前記核酸が、G171V、A214V、A65V、M282V、G171K、G171F、G171I、G171Q、L200V、T201V、I202V、およびS127Vからなる群から選択される少なくとも1つの変異をコードする、請求項4のLRP5核酸。

【請求項 6】

プロペラ1中で少なくとも1つのアミノ酸変異をコードするLRP6核酸。

【請求項 7】

前記核酸が、G171V、A214V、A65V、M282V、G171K、G171F、G171I、G171Q、L200V、T201V、I202V、およびS127Vからなる群から選択される少なくとも1つの変異をLRP6中の等価の位置でコードする、請求項6のLRP6核酸。

【請求項 8】

前記変異が、LRP5中またはLRP6中の等価のドメイン中のG171V、A214V、A65V、M282V、G171K、G171F、G171I、またはG171Qである、請求項1~7のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項 9】

細胞中で発現した場合に前記ポリペプチドがWntシグナル伝達、Dkk活性、LRP5活性、および/またはLRP6活性を調整する、請求項1~8のいずれか1項に記載の核酸によってコードされたポリペプチド。

【請求項 10】

被験体中で発現した場合に前記ポリペプチドが骨量および/または脂質レベルを調整する、請求項9のポリペプチド。

【請求項 11】

請求項1~8のいずれか1項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 12】

請求項11のベクターを含む細胞。

【請求項 13】

癌細胞、肝細胞、または骨細胞である、請求項 1 2 の細胞。

【請求項 1 4】

表 2、G 1 7 1 V、A 2 1 4 V、A 6 5 V、M 2 8 2 V、G 1 7 1 K、G 1 7 1 F、G 1 7 1 I、G 1 7 1 Q、L 2 0 0 V、T 2 0 1 V、I 2 0 2 V、またはS 1 2 7 Vの少なくとも 1 つのアミノ酸変化を含む、LRP 5 由来のポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメント。

【請求項 1 5】

前記タンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントが、G 1 7 1 V、A 2 1 4 V、A 6 5 V、M 2 8 2 V、G 1 7 1 K、G 1 7 1 F、G 1 7 1 I、G 1 7 1 Q、L 2 0 0 V、T 2 0 1 V、I 2 0 2 V、またはS 1 2 7 Vの少なくとも 1 つのアミノ酸変化を含む、請求項 1 4 のポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメント。

【請求項 1 6】

LRP 6 中の等価の位置でアミノ酸の変化が発現された場合に、表 2、G 1 7 1 V、A 2 1 4 V、A 6 5 V、M 2 8 2 V、G 1 7 1 K、G 1 7 1 F、G 1 7 1 I、G 1 7 1 Q、L 2 0 0 V、T 2 0 1 V、I 2 0 2 V、またはS 1 2 7 Vの少なくとも 1 つのアミノ酸変化を含む、LRP 6 由来のポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメント。

【請求項 1 7】

前記タンパク質またはその生物学的に活性なフラグメントが、G 1 7 1 V、A 2 1 4 V、A 6 5 V、M 2 8 2 V、G 1 7 1 K、G 1 7 1 F、G 1 7 1 I、G 1 7 1 Q、L 2 0 0 V、T 2 0 1 V、I 2 0 2 V、またはS 1 2 7 Vの少なくとも 1 つのアミノ酸変化を含む、請求項 1 6 のポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメント。

【請求項 1 8】

被験体中で発現した場合にプロペラ 1 中に少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含む HBM 様表現型を有するが、前記変異は、前記 HBM 様表現型を維持する第 2 の変異も存在する G 1 7 1 V である、ポリペプチドまたは生物学的に活性なフラグメント。

【請求項 1 9】

前記ポリペプチドが、LRP 5、LRP 6、または HBM 由来である、請求項 1 8 のポリペプチドまたは生物学的に活性なフラグメント。

【請求項 2 0】

前記アミノ酸変化が、LRP 5 または LRP 6 中の等価の位置の G 1 7 1 V、A 2 1 4 V、A 6 5 V、M 2 8 2 V、G 1 7 1 K、G 1 7 1 F、G 1 7 1 I、もしくは G 1 7 1 Q である、請求項 1 4 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは生物学的に活性なフラグメント。

【請求項 2 1】

請求項 1 4 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたはその抗原フラグメントに結合する、抗体またはその免疫原性フラグメント。

【請求項 2 2】

前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、primatized (登録商標) 抗体、ヒト抗体、または標識抗体である、請求項 2 1 の抗体またはその免疫原性フラグメント。

【請求項 2 3】

LRP 5 の²⁰⁸ K L Y W A D A K L S F I H R A N²²³、²⁷⁷ A L Y S P M D I Q V L S Q E R²⁹¹、⁶¹ G L E D A A A V D F Q F S K G A⁷³、²³⁴ E G S L T H P F A L T L S G²⁴⁷、²⁴⁹ T L Y W T D W Q T R S I H A C N²⁶⁴、¹⁴⁴ V L F W Q D L D Q P R A I¹⁵⁶、¹⁹⁴ I Y W P N G L T I D L E E Q K L Y²¹⁰、³⁴ L L L F A N R R D V R L V D⁴⁷、⁷⁵ G A V Y W T D V S E E A I K Q⁸⁹、¹²¹ K L Y W T D S E T N R I E V A¹³⁵、または LRP 6 の等価のドメイン、またはその変異型を含むポリペプチドに結合する抗体。

【請求項 2 4】

LRP 5 の⁹⁶⁹ L I L P L H G L R N V K A I D Y D P L D K F I Y W⁹⁹³、⁹⁸⁹ K F I Y W V D G R Q N I K R A K D D G T Q P F V L¹⁰¹³、¹⁰⁰⁹ Q P F V L T S L S Q G Q N

P D R Q P H D L S I D I¹⁰³³、¹⁰²⁹ L S I D I Y S R T L F W T C E A T N T I N V H R L¹⁰⁵³、¹⁰⁴⁹ N V H R L S G E A M G V V L R G D R D K P R A I V¹⁰⁷³、¹²⁵³ C G E P P T C S P D Q F A C¹²⁶⁶、¹²⁷⁸ W R C D G F P E C D D Q S D E E G C¹²⁹⁵、¹³¹⁶ R C D G E A D C Q D R S D E A D C¹³³²、¹³⁷⁰ C E I T K P P S D D S P A H¹³⁸³、または L R P 6 の等価のドメイン、またはその変異型を含むポリペプチドに結合する抗体であって、前記抗体が L R P 5、H B M、L R P 6、またはその変異型の D k k への結合を調整する抗体。

【請求項 2 5】

(A) 被験体から生体サンプルを得るステップと、
 (B) 前記サンプルを請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗体または免疫原性フラグメントに曝露するステップと、
 (C) 前記抗体が前記被験体由来の生体サンプル由来のタンパク質に結合したかどうかを検出して、前記被験体が H B M 様表現型を有するかどうかを決定するステップとを含む、被験体の H B M 様表現型の診断方法。

【請求項 2 6】

治療有効量の請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗体および薬学的に許容可能なキャリアを含む、被験体の骨量および / または脂質レベルを調整するための組成物。

【請求項 2 7】

前記抗体またはその免疫原性フラグメントが、(1) L R P 5 と H B M 様タンパク質とを区別すること、(2) L R P 6 と H B M 様タンパク質とを区別すること、または(3) H M B と H B M 様タンパク質とを区別することができる、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその免疫原性フラグメント。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸に作動可能に連結された動物細胞および / またはヒト細胞中でタンパク質発現を指示するプロモーター領域を含む核酸を含む体細胞および / または生殖細胞を有するトランスジェニック動物であって、前記トランスジェニック動物が前記核酸の発現によって調整される少なくとも 3 つの骨パラメータを有するトランスジェニック動物。

【請求項 2 9】

前記プロモーター領域が、C M V、R S V、S V 4 0、および E F - 1 a、C M V b アクチン、ヒストン、I 型コラーゲン、T G F 1、S X 2、c f o s / c j u n、C b f a 1、F r a / J u n、D l x 5、オステオカルシン、オステオポンチン、骨シアロタンパク質、およびコラゲナーゼのプロモーター領域からなる群から選択される、請求項 2 8 のトランスジェニック動物。

【請求項 3 0】

請求項 9 または 1 0 のポリペプチドをコードする配列を含む核酸を含む体細胞および / または生殖細胞を有するトランスジェニック動物であって、前記核酸が動物細胞および / またはヒト細胞中でタンパク質発現を指示する作動可能に連結されたプロモーター領域をさらに含み、前記トランスジェニック動物が前記核酸の発現によって調整される少なくとも 3 つの骨パラメータを有するトランスジェニック動物。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸に作動可能に連結された動物細胞および / またはヒト細胞中でタンパク質発現を指示するプロモーター領域を含む核酸を含む動物胚。

【請求項 3 2】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸に作動可能に連結された動物細胞および / またはヒト細胞中でタンパク質発現を指示するプロモーター領域を含む核酸でトランスフェクトした動物細胞またはヒト細胞。

【請求項 3 3】

ヒト H B M 様タンパク質を発現し、ヒト H B M 様遺伝子がその子孫に受け継がれる、請求項 2 8 のトランスジェニック動物。

【請求項 3 4】

請求項 3 3 のトランスジェニック動物またはその子孫から產生されたトランスジェニック動物。

【請求項 3 5】

請求項 2 8 のトランスジェニック動物から構成される第 1 の動物群および第 2 のコントロール動物群を含む、骨密度の調整および / または脂質レベルの調整を研究するための動物モデル。

【請求項 3 6】

前記トランスジェニック動物群が、ヒト H B M 様タンパク質またはその生物学的に活性なポリペプチドフラグメントをコードする核酸を含む細胞を有する、請求項 3 5 の動物モデル。

【請求項 3 7】

請求項 3 0 のトランスジェニック動物から構成される第 1 の動物群および第 2 のコントロール動物群を含む、骨密度の調整を研究するための動物モデル。

【請求項 3 8】

(a) 請求項 1 1 のベクターで細胞をトランスフェクトするステップと、
(b) ステップ (a) のトランスフェクトした細胞を化合物に曝露するステップと、
(c) 前記化合物が H B M 様核酸の活性を調整するかどうかを決定するステップとを含む、 H B M 様核酸の活性を調整する薬剤の同定方法。

【請求項 3 9】

(a) 請求項 1 1 のベクターで細胞をトランスフェクトするステップと、
(b) ステップ (a) のトランスフェクトした細胞を化合物に曝露するステップと、
(c) 前記化合物が H B M 様タンパク質の活性を調整するかどうかを決定するステップとを含む、 H B M 様タンパク質の活性を調整する薬剤の同定方法。

【請求項 4 0】

前記化合物が、ホルモン、成長因子、ペプチド、 R N A 、 s h R N A 、 s i R N A 、 D N A 、無機物、ビタミン、天然産物、または合成有機化合物である、請求項 3 9 の方法。

【請求項 4 1】

(a) 細胞を請求項 1 ~ 8 に記載の核酸を含む構築物でトランスフェクトするステップと、
(b) W n t 応答プロモーターに連結されたレポーター要素の発現の変化を評価するステップと、
(c) D k k 構築物のみでトランスフェクトした細胞と比較して、レポーター遺伝子発現が変化した化合物を、 D k k / W n t 相互作用調整化合物として同定するステップとを含む、 D k k の W n t シグナル伝達経路との相互作用を調整する化合物の同定方法。

【請求項 4 2】

前記細胞が、癌細胞、肝細胞、または骨細胞である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記細胞が、 U 2 - O S 、 H O B - 0 3 - C E 6 、または H E K 2 9 3 細胞である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記使用されたレポーター要素が、 T C F - ルシフェラーゼ、 t k - R e n i l 1 a 、またはその組み合わせである、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

(A) 被験体から生体サンプルを得るステップと、
(B) H B M 表現型が得られるヌクレオチド変化の存在をアッセイするステップとを含む、表 2 または 3 のヌクレオチド変化を含む核酸を発現する被験体の診断方法。

【請求項 4 6】

(A) 請求項 3 2 に記載の細胞を得るステップと、

(B) 前記細胞を試験化合物に曝露するステップと、
(C) LRP5、LRP6、またはHBMの発現をそれぞれ測定するステップと
を含む、LRP5、LRP6、またはHBMを調整する薬剤の同定方法。

【請求項47】

前記薬剤が、骨量および/または脂質レベルをさらに調整するかどうかを決定するステップをさらに含む、請求項42の薬剤の同定方法。

【請求項48】

請求項46または47の方法によって同定された薬剤。

【手続補正2】

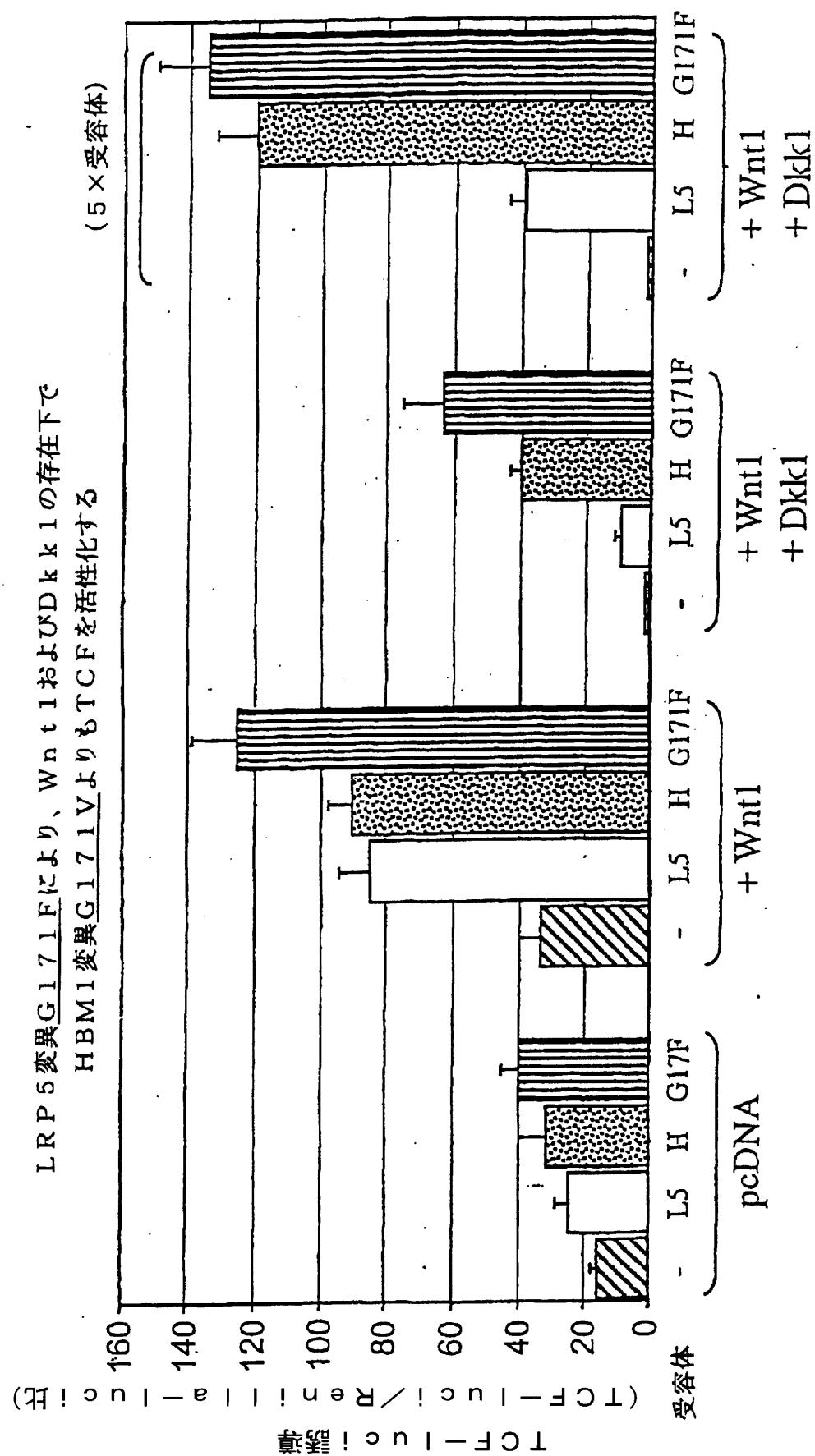
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図29

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図29】



・G171F変異は、環状R基(F)変化に関与し、これによりHBM1変異G171VよりもわずかにTCF-遺伝子座を活性化する。

FIG. 29

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

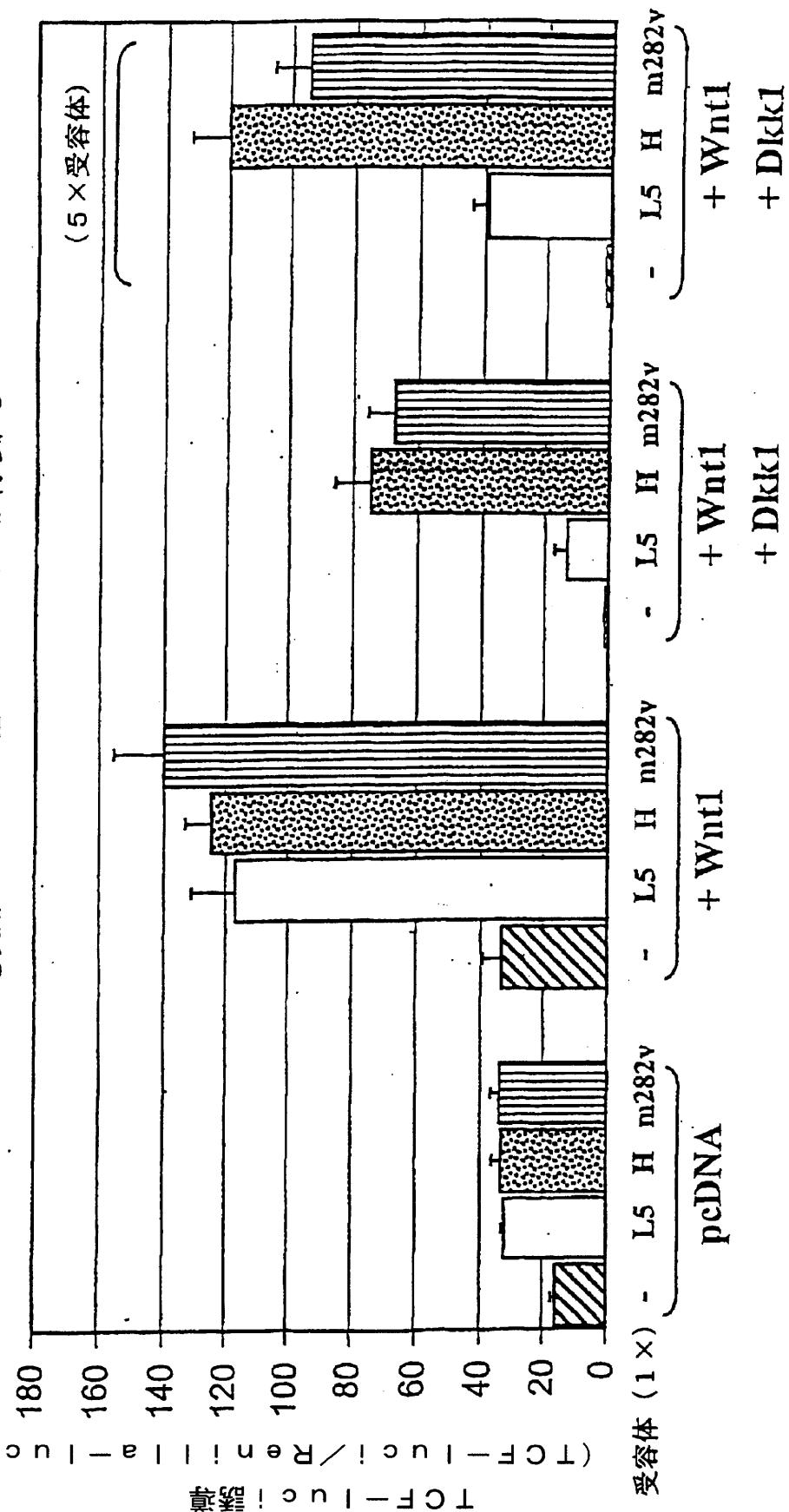
【補正対象項目名】図30

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図30】

LRP5-ブレード1変異M282Vにより、U2-OS細胞中でWnt1およびDkk1を使用してHBM1型TCFシグナルが得られる



- ・ブレード1(プロペラ1)では、M282は接近可能な内部の位置に存在する
- ・プロペラ1～3中に保存されている

FIG. 30

【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 4 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図43】

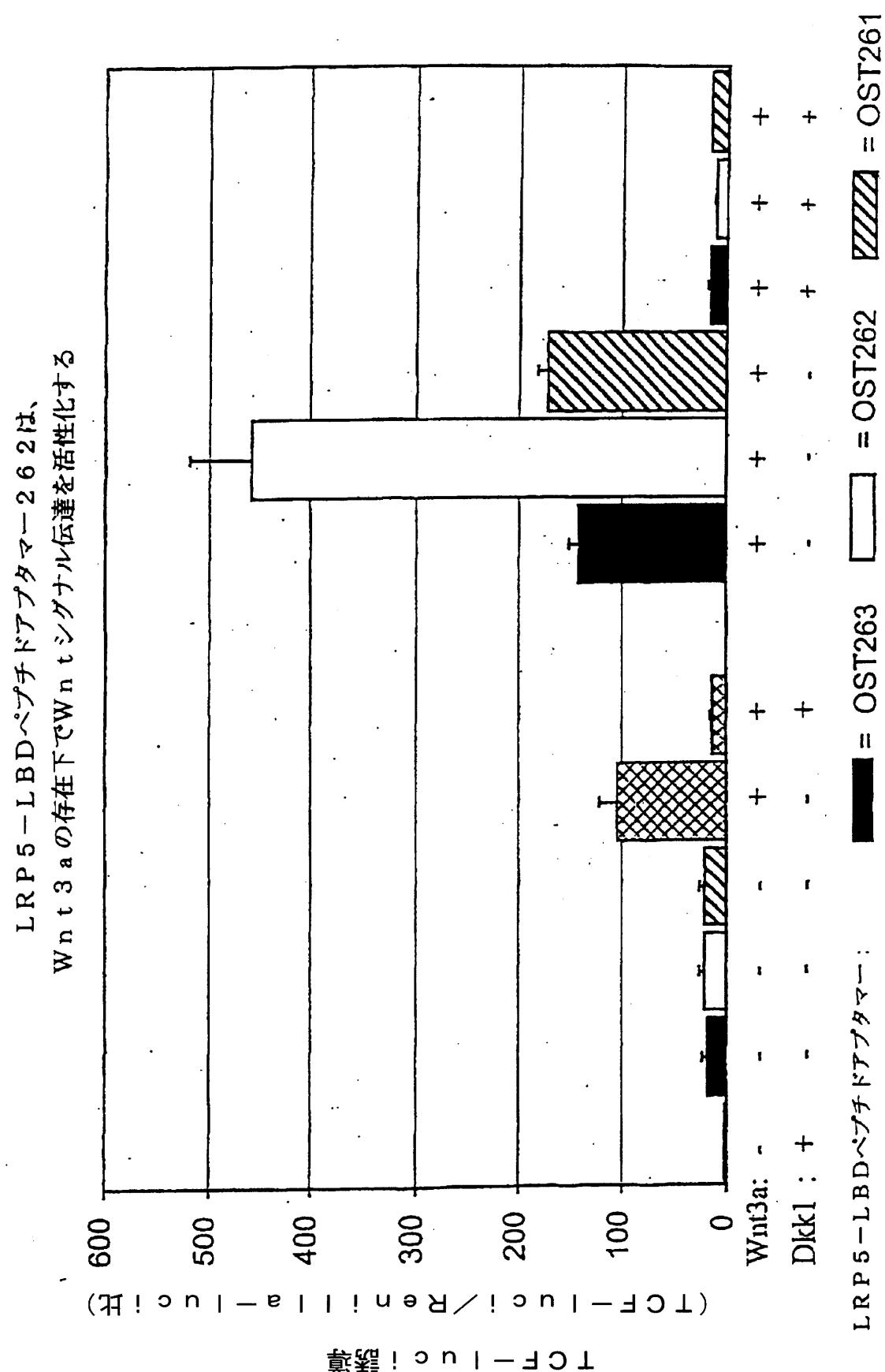


FIG. 43

【手続補正5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 4 6

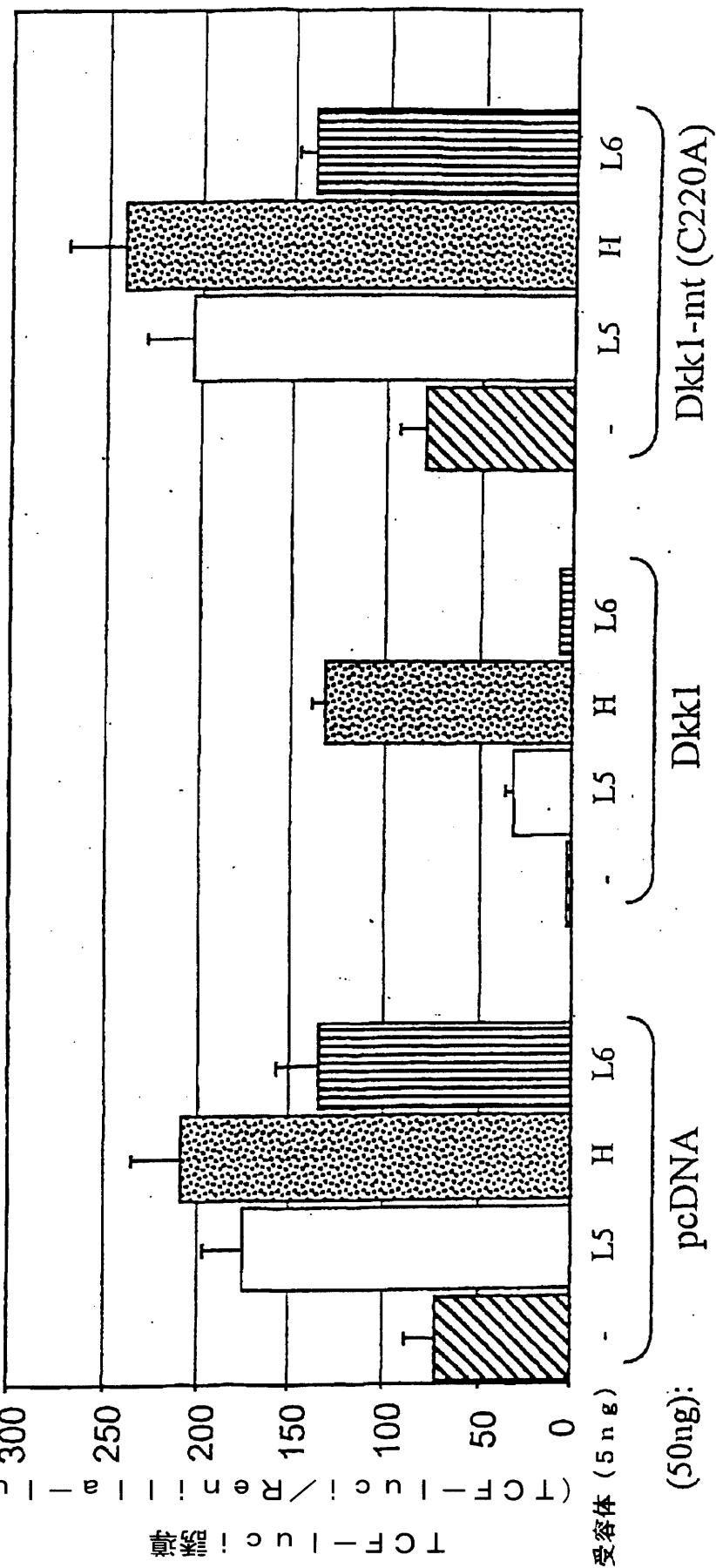
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図46】

FIG. 46

W_n t 1-HBM作製TCF-遺伝子座は、
U2-Os骨細胞中でDkk1によって有効に阻害されない。



・Wnt1を用いたLRP5によって作製されたTCFシグナルは、LRP6によるシグナルよりも高い。

・LRP5/6-Wnt1誘導TCFは、Dkk1によって有効に遮断される。

【手続補正6】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図47】

U2-Os細胞では、TCF-シグナルを、Wnt-DNAトランスクレクションを用いずにDkk1、Dkk1-APによって調整することができる。

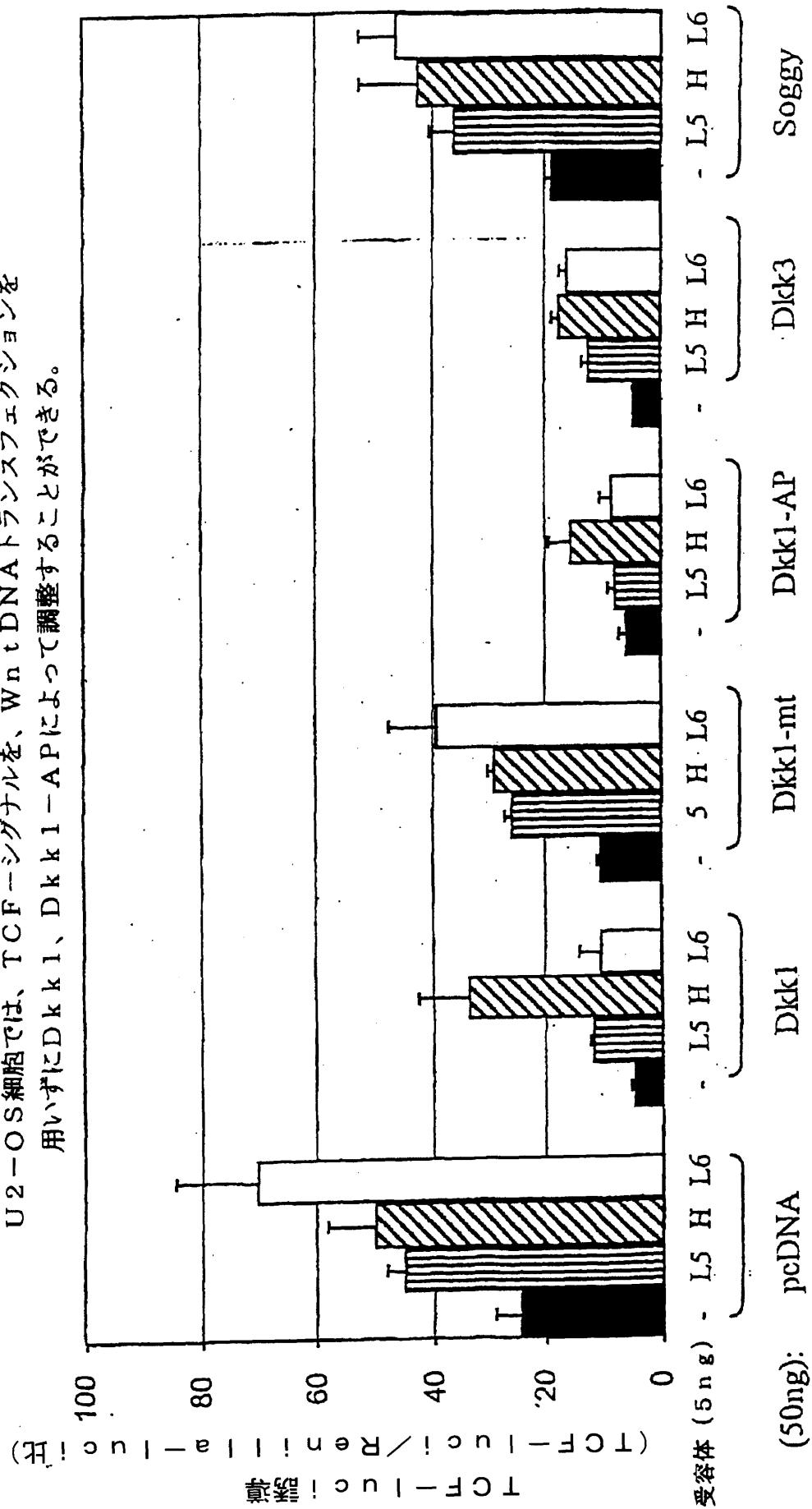


FIG. 47