

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-42012

(P2010-42012A)

(43) 公開日 平成22年2月25日(2010.2.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C O 8 4
審査請求 有 請求項の数 33 O L (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-230857 (P2009-230857)	(71) 出願人	500025477
(22) 出願日	平成21年10月2日 (2009.10.2)		アンスティテュ、ナショナル、ド、ラ、サ
(62) 分割の表示	特願平10-507675の分割		ント、エ、ド、ラ、ルシエルシュ、メディ
原出願日	平成9年7月31日 (1997.7.31)		カル (アンセルム)
(31) 優先権主張番号	96/09733		I N S T I T U T N A T I O N A L D
(32) 優先日	平成8年8月1日 (1996.8.1)		E L A S A N T E E T D E L A
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		R E C H E R C H E M E D I C
(31) 優先権主張番号	97/04680		A L (I N S E R M)
(32) 優先日	平成9年4月16日 (1997.4.16)		フランス国パリ、リュ ド トルビアク、
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		1 0 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CADASIL に関する遺伝子、診断方法および治療への適用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】神経障害、特にCADASILに対する素因の診断と治療を可能にする、CANDASILにおけるNotch3タンパク質、及びNotch3タンパク質をコードする核酸を提供する。

【解決手段】ヒトNotch3タンパク質をコードする塩基配列およびその対立遺伝子変異体、これらのタンパク質の断片をコードし、かつ、少なくとも10塩基を有する特定の塩基配列、ヒトNotch3ゲノム配列およびその対立遺伝子、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%の相同性を示す特定の塩基配列、少なくとも10塩基を有する特定の塩基配列またはの断片、特定の塩基配列とハイブリダイズする塩基配列から選択される単離核酸。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) ヒトNotch3タンパク質をコードする配列およびその対立遺伝子変異体、
- b) このタンパク質の断片をコードし、かつ、少なくとも10塩基を有する配列、
- c) ヒトNotch3ゲノム配列およびその対立遺伝子、
- d) 配列(a)および(c)と少なくとも90%の相同性を示す配列、
- e) 少なくとも10塩基を有する配列(c)または(d)の断片、
- f) (a) ~ (e)の配列とハイブリダイズする配列

から選択されることを特徴とする単離核酸配列。

【請求項 2】

10

- a) 図1の配列のアミノ酸を含んでなるポリペプチドをコードする配列、
- b) 図1に相当する核酸配列、
- c) 少なくとも10塩基を含有する(a)または(b)の配列の断片、および
- d) 関連配列(a)、(b)または(c)に対して最大20個の点突然変異を含む配列

から選択されることを特徴とするヌクレオチド配列。

【請求項 3】

表Cの突然変異からなる群より選択される少なくとも1種の突然変異を含んでなる、請求項 1 および 2 のいずれか 1 項に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 4】

少なくとも10塩基を含む、請求項 3 記載のヌクレオチド配列。

20

【請求項 5】

配列が請求項 4 の配列から選択されることを特徴とする、特に対立遺伝子変異体に特異的なプライマーとして使用することができるヌクレオチド配列。

【請求項 6】

特に、表Bに記載の配列およびそれらの相補的配列からなる核酸プライマーとして使用することができるヌクレオチド配列。

【請求項 7】

配列が請求項 4 の配列から選択されることを特徴とする、特に対立遺伝子変異体に特異的なプローブとして使用することができるヌクレオチド配列。

【請求項 8】

30

配列がNotch3ドメインの1つをコードする、請求項 1 記載のヌクレオチド配列。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 3 および 8 のいずれか 1 項に記載の配列を含んでなることを特徴とする、ヌクレオチド配列の適切な宿主中でのクローニングまたは発現用ベクター。

【請求項 10】

該宿主中で該配列を発現させることが可能なエレメントを含んでなる、請求項 9 記載のベクター。

【請求項 11】

自律的に複製するベクターである、請求項 9 および10のいずれか 1 項に記載のベクター。

40

【請求項 12】

染色体組み込みベクターである、請求項 9 および10のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 13】

ウイルスベクターである、請求項 9 および10のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 14】

ベクターがアデノウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルスまたはヘルペスウイルスに基づき作製される、請求項13記載のベクター。

【請求項 15】

請求項 9 ~ 14のいずれか 1 項に記載のベクターで形質転換した細胞。

【請求項 16】

50

原核細胞である、請求項15記載の細胞。

【請求項 17】

真核細胞である、請求項15記載の細胞。

【請求項 18】

請求項15～17のいずれか1項に記載の細胞を培養し、次いで産生されたタンパク質を回収する、請求項1および7の配列(a)～(f)の1つに相当するタンパク質を生産する方法。

【請求項 19】

請求項18記載の方法を用いて得ることができるタンパク質またはポリペプチド。

【請求項 20】

可溶性タンパク質またはポリペプチドである、請求項19記載のタンパク質またはポリペプチド。 10

【請求項 21】

配列が、表Cに相当する突然変異から選択される少なくとも1つの突然変異を含んでなるポリペプチド配列から選択される、請求項19記載のNotchタンパク質変異型に特異的なポリペプチド。

【請求項 22】

プロ-Notch3活性を有する化合物を有効成分として含むことを特徴とする治療用組成物。

【請求項 23】

プロ-Notch3活性を有する化合物が請求項19のタンパク質またはポリペプチドである、請求項22記載の組成物。 20

【請求項 24】

プロ-Notch3活性を有する化合物が請求項9～14のいずれか1項に記載の発現ベクターである、請求項22記載の組成物。

【請求項 25】

プロ-Notch3活性を有する化合物がNotch3の産生を誘導するセンス配列である、請求項22記載の組成物。

【請求項 26】

プロ-Notch3活性を有する化合物がNotch3受容体のエピトープに対して向けられるモノクローナル抗体である、請求項22記載の組成物。 30

【請求項 27】

抗Notch3活性を有する化合物を有効成分として含んでなることを特徴とする治療用組成物。

【請求項 28】

有効成分が抗Notch3抗体である、請求項27記載の組成物。

【請求項 29】

有効成分がNotch3の発現をブロックするアンチセンス配列である、請求項27記載の組成物。

【請求項 30】

有効成分がNotch3に対応する可溶性配列である、請求項27記載の組成物。 40

【請求項 31】

抗Notch3活性を有する化合物がNotch3受容体のエピトープに対して向けられるモノクローナル抗体である、請求項27記載の組成物。

【請求項 32】

患者において、特にCADASHIL型の、またはNotch3受容体に関連した疾病の神経障害に対する素因を診断する方法であって、該患者由来の生物学的サンプルを用いて、該遺伝子に対応する核酸配列の総てまたは一部を解析することにより、Notch3遺伝子における突然変異の存在を測定し、少なくとも1種のかかる突然変異の存在が、該患者の神経障害またはNotch3受容体に関連した疾病に対する素因に指標となることを特徴とする方法。

【請求項 33】

同定が求められる突然変異が表Cに記載の突然変異からなる群より選択される、請求項32記載の診断方法。

【請求項34】

解析される核酸配列がゲノムDNA、cDNAまたはmRNAである、請求項32および33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

解析がハイブリダイゼーションにより行われる、請求項32～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

突然変異の存在がそれに対応する変異していない天然の配列との比較により検出される、請求項32～34のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項37】

対立遺伝子変異体に特異的な少なくとも1種のオリゴヌクレオチドプローブの助けによりハイブリダイゼーションを行う、請求項35記載の方法。

【請求項38】

配列決定により解析を行う、請求項32～37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】

電気泳動分離により、さらに特にはSSCPまたはDGGEにより解析を行う、請求項32～37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】

タンパク質の切断を検出することを意図した方法により解析を行う、請求項32～37のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項41】

突然変異の検出に先立ち、Notch3遺伝子の核酸配列の総てまたは一部を増幅する、請求項32～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

PCRまたはPCR類似法により増幅を行う、請求項41記載の方法。

【請求項43】

増幅を行うために選択されたプライマーが請求項6に定義されたプライマーから選択される、請求項41および42のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項44】

いわゆる捕捉プローブおよび/またはいわゆる検出プローブ(これらプローブの少なくとも1つは請求項7記載のプローブである)を含んでなることを特徴とする、生物学的サンプルにおけるNotch3遺伝子の突然変異の検出および/または同定用試薬。

【請求項45】

変異したNotch3受容体の存在を患者由来の生物学的サンプルを用いて同定することを特徴とする、患者におけるCADASILの神経症状またはNotch3受容体に関連した疾病に対する素因の診断方法。

【請求項46】

ELISAまたはRIA法により検出を行う、請求項45記載の方法。 40

【請求項47】

この受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして天然または変異Notch3受容体と相互作用する生成物の選択のための、請求項15～17のいずれか1項に記載の細胞の適用。

【請求項48】

請求項47を用いて得られる生成物。

【請求項49】

請求項19～21のいずれか1項に記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項50】

ヒトまたは動物器官の、請求項19～21のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドからなる免疫剤との免疫反応によって得られることを特徴とする、ポリクローナル 50

またはモノクローナル抗体。

【請求項 5 1】

ヒトまたは動物器官の、請求項20に記載のポリペプチドからなる免疫剤との免疫反応によって得られることを特徴とする、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体。

【請求項 5 2】

結像のために標識した抗体である、請求項49～51のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5 3】

請求項49～52のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 種の抗体を反応物質として含んでなる、請求項45記載の診断方法を行うための試薬。

【発明の詳細な説明】

10

【発明の背景】

【0001】

技術分野

本発明は、特にある神経障害、特にCADASILに対する素因の診断を可能にする、CADASILにおけるNotch3タンパク質の関与の証明、ならびにこの種の病状に関して可能な治療法を試験することを可能にするモデルに関する。

【0002】

背景技術

CADASIL、すなわち「皮質下梗塞および白質脳障害を伴う大脳常染色体優性動脈症」は最近、拡散する大脳白質の異常性を客観化するMRI画像に関連して、その主要な特徴が、常習性皮質下梗塞、片頭痛および血管性痴呆を含む大脳発作の、あるいは痴呆の原因として確認された。

20

【0003】

病理解剖実験では、複数の小さな深部大脳梗塞、白質脳障害、ならびに特に小脳動脈に關与する非アテローム動脈硬化性血管障害および非アミロイド血管障害が示されている。

【0004】

その名称が示すように、CADASILは優性常染色体の特性を有する遺伝病である。さらなる情報は、特にH. Chabriat et al., The Lancet, Vol. 346, 7 October 1995のCADASILの臨床範囲に関する研究に見出せるであろう。

【0005】

30

この高度障害をきたし、かつ、しばしば死に至る疾病はおそらくは、これまでにはそれ自体、大部分が診断未確定のままであり；1993年以来、約100家族の研究が、非常にしばしば患者に誤った診断（多発性硬化症、アルツハイマー病など）を与えてきたことを示している。最新の研究は、それがその発見中に考えられていたものよりもずっと広く広がった症状であることを証明する傾向にある。

【0006】

目下のところ追跡されている研究は、特に、可能性ある代替治療法を開発する、遺伝子操作によって提供されるモデルおよび可能性によってこの疾病の診断手段を確定するという目的を有するものである。CADASILに關与する遺伝子は、第19染色体に位置しており、細かい位置推定は、特に同発明者による2つの特許出願に記載されている。

40

【0007】

今般、CADASILに關与する遺伝子をNotch3遺伝子と同定することができた。

【0008】

CADASILにおけるNotch3の關与を証明することは、特に問題の特許出願に記載されている先の限定を与えられることを可能にし、それは第一の区域（サイズ14cM）はD19S221-D19S215（第一の特許出願）であり、第二の区域（サイズ2cM）はD19S226-D19S199（第二の特許出願）であった。この注目する領域をBACおよびYACコンティグ（連続ヌクレオチド配列）へクローン化し、次いでその大きさを800kbと評価した。制限酵素の助けを用いたこの領域の解析では、NotI、BglIおよびSacII部位が極めて高密度にあることが示され、多数の遺伝子の存在が示唆された。cDNAを選択することにより同定された多数の転写物

50

のうち、1つの転写物で、マウス遺伝子Nothc3のコーディング5'末端に位置する配列との極めて高い一致が示された。他の解析因子もこの位置におけるこのNotch3遺伝子の存在を確証させるものと思われるので、後者は注目する区域内のその位置により、好適な候補遺伝子であるとみなされた。

【0009】

既知のCADASHIL家族について行った健常者との比較における比較研究により、大多数のCADASHIL患者においてこのNotch3遺伝子の突然変異が確認できたが、このような突然変異は解析した健常者では認められなかった。最終的に、これらの突然変異の、罹患家族内の疾病表現型との同時分離が証明されたので、CADASHILにおけるNotch3遺伝子の関与が明らかになった。

10

【0010】

観察された総ての点突然変異が、このタンパク質のEGFドメインの1つにシステインの創出または消失をもたらす。これらの突然変異は第一の6EGF中にそれらの大部分のクラスターを有している。この突然変異体のクラスターは、特にこれら突然変異の「配列決定」検索のための診断的観点から確かに重要である。

【0011】

さらに、これら総ての突然変異は、通常存在する6個のシステインの代わりに、EGFの1つにシステイン数の付加の存在(システイン7個、または5個のいずれか)をもたらす。かくして、これらの突然変異は、分子内または分子間いずれかの異常なジスルフィド結合を形成する結果となる(この場合、ホモまたはヘテロ二量体が形成)。

20

【0012】

正常または異常な二量体化の受容体機能における役割、特にそれらの活性化における役割はよく知られていない。

【0013】

Notch遺伝子は随分前から、特にショウジョウバエで知られており、それらの同等物が脊椎動物、特にマウスで知られている。その英名「notch」は、この遺伝子の突然変異のいくつかはハエのハネに刻み目(notch)を生じさせることに由来する。Spyros Artavanis-Tskanas et al., Science 268, 225 (1995)、ならびにそれが含む参考文献は、特にショウジョウバエにおいて、Notchタンパク質は発達中の細胞の運命の明確化に必須の関与をしているが、そのタンパク質は成体器官では常に発現しているとは限らず、後者におけるその機能はまだわかっていないことを示している。より厳密には、Notch3遺伝子の産物、以下「Notch3タンパク質」は、細胞内事象のカスケードを制御する細胞受容体であり、その突然変異は必然的にこのカスケードに多少なりとも混乱をもたらし、これが他の多くの神経障害、特に大脳血管障害をもたらす可能性がある。

30

【0014】

後に続く本文中に特に神経障害、特に大脳血管型の障害、さらに特にCADASHILが注目されるが、Notch3遺伝子の産物に対して細胞受容体の機能が与えられ、この受容体の損傷が種々のリガンドばかりか、この変換カスケードに関与する種々のパートナーとの相互作用の混乱をももたらす可能性があることを思い起こすべきである。さらに、Notch3タンパク質がまだ証明されていない他の機能を有するかもしれないという事実が考慮されるべきである。かかかかる状況の下、CADASHILと類似性を示す条件もまた、Notch3遺伝子における突然変異の場合に関与するという可能性が高い。

40

【0015】

関連疾病の中では、散発型のCADASHIL、すなわち、家族履歴なく新たな突然変異に従って生じるものが述べられてもよい。さらにNotch3は、種々の群に分類され得る他の症状にも関与する可能性がある。

【0016】

片頭痛および片麻痺性片頭痛

家族性片麻痺性片頭痛(FHM)に関与する少なくとも1つの遺伝子である、前兆を伴う優性常染色体型の片頭痛は、第19染色体のCADASHIL遺伝子と同じ領域に位置していた。大脳

50

血管の偶発症候および血管性痴呆の繰り返し着手により特徴づけられる症状であるCADASILを患う患者の30%以上は、前兆を伴う片頭痛に苦しんでいることに着目すべきである。しかしながら、後者は集団の約5%にしか見られず；この観察が、この症状のメカニズムにおけるCADASIL遺伝子の関与の試験に至った。片頭痛の前兆を伴う、あるいは伴わない形態におけるこの遺伝子の関与は、一般集団における前兆を伴う片頭痛と前兆を伴わない片頭痛の頻度のために、診断および治療上非常に興味深かった。

【0017】

他の血管（脳梗塞）および／または原因不明の痴呆

この群は神経医学、精神医学および内科の非常に多くの患者に相当し、この遺伝子シグナリング経路におけるNotch3またはパートナーは、前記理由のためにこれらの症状に関与する可能性があると考えことは総て理に適っている。

10

【0018】

家族性発作運動失調

この症状はFHMに関するものと同様である。この症状の原因である遺伝子も、第19染色体の同領域に位置しており、Notch3がこの症状に関与していると考えられる。

【0019】

さらに、この遺伝子突然変異は新生組織型の症状に関するものと同様、他の種でよく知られている発達異常の原因である。この遺伝子を含む領域の再配列を証明し得る奇形および／または新生組織症候群は、それらの生理病理学におけるこの遺伝子の関与についての検索のための主要な候補である可能性がある。

20

【0020】

これらの疾患は「Notch3受容体関連疾患」の名の下、分類され得る。

【0021】

ある場合においては、これは複遺伝子性起源を有する疾患を含み、ここではNotch3の修飾がその症状の兆候、または悪化の原因である可能性がある。

【発明の概要】

【0022】

本発明は第一に、

- a) ヒトNotch3タンパク質をコードする配列およびその対立遺伝子変異体、
 - b) これらのタンパク質の断片をコードし、かつ、少なくとも10塩基を有する配列、c) ヒトNotch3ゲノム配列およびその対立遺伝子、
 - d) 配列(a)および(c)と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%の相同性を示す配列、e) 少なくとも10塩基を有する配列(c)または(d)の断片、
 - f) (a)～(e)の配列とハイブリダイズする配列
- から選択されることを特徴とする、単離核酸配列に関する。

30

【図面の簡単な説明】

【0023】

本発明の他の特徴ならびに利点は、添付の図面を参照しながら以下の実施例を読めば明らかになるであろう。ここで、

【図1A】図1Aは、ヒトNotch3のcDNA配列、ならびにそれに対応するタンパク質配列を示す。

40

【図1B】図1Bは、ヒトNotch3のcDNA配列、ならびにそれに対応するタンパク質配列を示す。

【図1C】図1Cは、ヒトNotch3のcDNA配列、ならびにそれに対応するタンパク質配列を示す。

【図1D】図1Dは、ヒトNotch3のcDNA配列、ならびにそれに対応するタンパク質配列を示す。

【図1E】図1Eは、ヒトNotch3のcDNA配列、ならびにそれに対応するタンパク質配列を示す。

【図1F】図1Fは、ヒトNotch3のcDNA配列、ならびにそれに対応するタンパク質配

50

列を示す。

【図1G】図1Gは、ヒトNotch3のcDNA配列、ならびにそれに対応するタンパク質配列を示す。

【図1H】図1Hは、ヒトNotch3のcDNA配列、ならびにそれに対応するタンパク質配列を示す。

【図2】図2は、Notch3遺伝子産物ならびにマウスNotch3を用いてヒトcDNAクローンを配置することにより検出された突然変異の一般構造を示し、A-34EFGドメイン、3個のNotch/Lin12反復および6個のcdc10反復、ならびにトランスメンブランドメインを有するマウスNotch3遺伝子、B-上は、図1に対応する一致を有するヒトcDNAからなるB、下は、少なくとも29個のエキソンからなるcDNAを有するいくつかのゲノム配列の配置、種々の断片の起源は図4の下で明らかであり；種々のクローンは商業的に、またはライブラリーを通じて入手可能であり；クローン261623；153875；149693は、IMAGE協会から入手可でき；クローンC-32b03は、GENEXPRESS(Genethon, Evry, France)から入手でき；クローンp28-20；CNA-20は、CLONTECHから入手できる。

【図3】図3は、CADASHILに關与する突然変異の状態および特性を模式的に示す。

【図4】図4は、左から右へ：種々の脳組織の、種々の成体器官の、種々の胎児器官の「ノーザンブロット」解析（ノーザンブロットはヒトポリ(A⁺)DNAのラインにつき2μgを含有）を示し；それらはp28-20、Notch3ヒト1.45kb cDNAプローブとハイブリダイズし；7.5~9.5kbの転写物が肝臓を除く成体および胎児双方の総ての組織で検出され、該転写物は中央および右側の脳組織で弱く発現し；これに対して左側では、観察した組織の総ての転写物だけでなく、その存在が全く記載されておらず、非常に重要である可能性がある2.4~1.3kbの転写物の存在が認められる。

【発明の具体的説明】

【0024】

本発明は、それらの自然の染色体環境における、すなわちいわゆる自然状態におけるゲノムヌクレオチド配列に関するものではなく；それらは単離された、すなわちいわゆる直接または間接的に、例えば、コピー（cDNA）、少なくとも部分的に修飾された環境により集められた配列であると認識されるべきである。

【0025】

このように、これはまた、それらを自然状態で有する配列とは少なくとも部分的に異なる配列により部分的に修飾されるか、または運ばれるcDNAおよびゲノムDNAの双方を含む。

【0026】

これらの配列はまた、「非天然の」記載され得る。

【0027】

「核酸配列」とは、修正されたヌクレオチドの正確な結合を示すか、またはそうでなければ核酸の断片、セグメントまたは領域を定義することを可能にする天然の単離された、または合成されたDNAおよび/またはRNA断片を意味すると理解される。

【0028】

タンパク質の「対立遺伝子変異体」とは、ヒトにおいて存在すると考えられる変異タンパク質および多型性の総てを意味すると理解され、これは特にアミノ酸残基の切断、置換、欠失または付加、ならびに人工変異体により得られる。

【0029】

本発明によれば、核酸配列断片は特にタンパク質ドメインをコードしてもよいし、あるいは、検出、同定または増幅方法においてプローブとしてまたはプライマーとして用いてもよい。これらの断片は最小10塩基の大きさを有し、20塩基の、好ましくは30塩基の断片が好ましい。

【0030】

本発明によれば、相同性とは単に統計学的なものであり；それは、その配列が少なくとも80%、好ましくは90%の共通のヌクレオチドを示すことを意味する。

【0031】

本発明によれば、ハイブリダイゼーション条件は、少なくとも95%の一致を保証することが可能である。

【0032】

さらに特には、本発明は

- a) 図1の配列のアミノ酸を含んでなるポリペプチドをコードする配列、
- b) 図1に相当する核酸配列、
- c) 少なくとも10塩基を含有する(a)または(b)の配列の断片、および
- d) 関連配列(a)、(b)または(c)と比較して最大20個の部分突然変異を含む配列から選択されるヌクレオチド配列に関する。

10

【0033】

図1は、正常ゲノムについて配列決定したときのNotch3の配列を表す。

【0034】

この配列は、図3を用いて、互いに関連するそれらを配置させることが可能となる参照により同定される。

【0035】

(a)、(b)、(c)および(d)の特別な目印に関しては、前記目印を適用する。

【0036】

本発明はまた、これらの配列の断片、詳しくはNotch3タンパク質の活性総てまたは一部を保持しているポリペプチドをコードする配列に関する。

20

【0037】

特に有利な配列の中で、Notch3タンパク質ドメインまたはそのドメインの組み合わせをコードするもの、すなわち配列：

「EGF」反復

「Notch/lin12」反復

「cdc10/SW16」反復

またはトランスメンブラン配列が記載されてもよい。

【0038】

有利な配列の中には、特に、後に続く本文で記載される第二の転写物によりコードされる配列があり、該転写物は1.3~2.4の間と評価される大きさを有する。

30

【0039】

これらの配列は、特にNotch3の構成を模式的に表す図2を参照して同定され得る。

【0040】

これらの部分配列は、以下に記載するように、多くの応用、特にNotch型または種々の種のタンパク質構築体を調製するためだけでなく、例えばNotch3リガンドに対するルアーまたはタンパク質に対するアゴニストとして働くと考えられる切断されたNotch様タンパク質を調製するために用いることができる。

【0041】

また、それらの内在作用に関するこれらタンパク質配列を用いて、このように、EGFドメインが他のタンパク質、特に他の受容体に存在することを認識することもでき；例えば、問題のEGF配列の他の適用に関するIain D. Campbell, Current Biology, 3:385-392 (1993)が参照される。

40

【0042】

記載されている配列は一般に正常な配列であるが、本発明はまた、それらが少なくとも1つの点突然変異、好ましくは総数で20より少ない突然変異を含む限りにおいては、変異した配列に関する。

【0043】

好ましくは本発明は、点突然変異がサイレントでない、すなわちそれらが適切な正常な配列をコードしたアミノ酸の修飾もたらすヌクレオチド配列に関する。さらにより好ましくは、これらの突然変異は、Notch3タンパク質またはこれに対応するそれらの断片、すな

50

わち特にシステインを抑制するか、または対照的にそれらを出現させる突然変異だけでなく荷電部位の点か、あるいは疎水性部位の点かのいずれかでタンパク質の特性が変化している突然変異をも構成するアミノ酸に影響を及ぼす。

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、タンパク質の発現に効果を有すると考えられるヒトNotch3遺伝子のプロモーターおよび／または調節配列に生じ得る突然変異に関する。

【 0 0 4 5 】

このような突然変異の例は後に続く本文中に記載される。

【 0 0 4 6 】

概して本発明は、正常なNotch3および変異したNotch3タンパク質の双方、ならびにそれらの断片、さらにはこれに対応するDNAおよびRNA配列、すなわち対立遺伝子に関する。

10

【 0 0 4 7 】

ヒト組織におけるこの遺伝子の発現に関するノーザンブロット研究で2種の転写物が明らかになったことに注目すべきである。1つは7.5~9.5kbと評価される大きさを有し、試験した総ての組織に存在し；他方は1.3~2.4kbの大きさで、中枢神経系のいくつかの部分でしか検出されない。本発明はこれら2種の転写物に関する。

【 0 0 4 8 】

ヌクレオチド断片の中でも、Notch3遺伝子のイントロンゲノム配列、さらに詳しくは、特に表Aで示されたもののようなイントロンおよびエキソン間の結合配列が記載でき；最後に本発明は、前記ヌクレオチド配列から推定でき、かつ、PCR法などの増幅法に用いてそれらの検出を可能にする総てのプライマーであって、特に表Bに示されるものに関する。

20

【 0 0 4 9 】

本発明はまた、非天然ヌクレオチド、特に例えば硫黄含有ヌクレオチドを含み得る、またはαまたはβ構造を有するヌクレオチド配列に関する。

【 0 0 5 0 】

最後にもちろん本発明は、DNAおよびRNA配列の双方、ならびにこれに対応する二本鎖DNAに関する。

【 0 0 5 1 】

いくつかの応用に関して以下に記載するように、複合構築体であるタンパク質／DNA／化学化合物、特に例えば挿入試薬の使用に関して提供することが必要であり；このような化合物も本発明の配列を含有するので、本特許に包含されると理解されるべきである。

30

【 0 0 5 2 】

本発明はまた、非天然型、すなわち、それらがそれらの自然状態では得られず、天然源からの精製により得られるか、または以下に記載されるような遺伝子組換えにより得られる、前記配列に相当するポリペプチドまたはペプチドタンパク質に関する。

【 0 0 5 3 】

本発明はまた、化学合成によって得られ、かつ、非天然アミノ酸を含有できる同ポリペプチドまたはタンパク質に関する。

40

【 0 0 5 4 】

本発明は、このようにグリコシル化および非グリコシル化型の双方で得られ、かつ、天然の第三級構造を有してもよいし、そうでなくともよい組換えタンパク質に関する。

【 0 0 5 5 】

特に本発明は、全受容体、特にそれらの細胞外ドメインに相当する該受容体の可溶性部分と同等の活性を発現すNotch3断片に関する。これらは特に、以下に記載されるように、治療においてルアーとして使用され得る。

【 0 0 5 6 】

これらのクローニングベクターおよび発現ベクターは、宿主中の配列、特に該細胞内で効果的なプロモーター配列および調節配列の発現を確実にするエレメントを含んでよい（

50

以下の参考文献を参照)。

【0057】

問題のベクターは自立的に複製してもよいし、あるいはその配列を宿主細胞の染色体へ確実に組み込むことを意図してもよい。

【0058】

自立的複製系の場合、原核宿主細胞か真核宿主細胞かにより、プラスミド型系かウイルス系が好適に用いられると考えられ、ウイルスベクターに関しては、特にアデノウイルス、ポックスウイルスまたはヘルペスウイルスであり得る。当業者ならば、これらのウイルスの各々に関して使用できる技術を知っている(以下の参考文献を参照)。

【0059】

宿主細胞の染色体への配列の組み込みが所望される場合には、組み換えを引き起こすために、組み込まれるヌクレオチド配列のいずれか末端に、宿主細胞から得た1以上の配列を提供することが必要となろう。これらはまた、先行技術において広く記載されている方法でもある。例えば、プラスミドまたはウイルス系の使用が可能であり;かかるウイルスとしては、例えばレトロウイルスまたはAAV(アデノ随伴ウイルス)が挙げられよう。

【0060】

本発明はまた、前記したようなベクターにより形質転換された原核または真核細胞に関し、これは、天然または変異Notch3タンパク質または、例えばそのサブユニットの1つの発現を引き起こすためのものである。

【0061】

前記に示したように、本発明はまた、このように形質転換した細胞を培養し、次いで、発現したタンパク質を回収することにより得られたタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドに関し、ベクターを、例えば「リーダー」配列を介してタンパク質の放出が引き起こされるように設計した場合には、こうした回収を細胞内または細胞外で培地から行うことが可能であり、このようなタンパク質はプレタンパク質またはプレプロタンパク質型である。タンパク質を分泌させるこの構築体は、原核細胞系および真核細胞系双方において知られている。

【0062】

これらのタンパク質の産生のために使用できる細胞としては、細菌細胞はもちろんのこと、酵母細胞、ならびに動物細胞、特に哺乳類細胞培養物が記載されてよく、また、例えばバキュロウイルスを用いる昆虫細胞を用いる方法もまた用いられてよい(以下の参考文献を参照)。

【0063】

このようにして得られた細胞により、天然または変異Notch3タンパク質のみならず、これらタンパク質の断片、特に問題の異なるドメインに相当すると考えられるポリペプチドを作製することが可能となる。

【0064】

しかしながら、前記した形質転換細胞はまた、Notch遺伝子とその種々のリガンドと間の相互作用ならびに受容体の下流での生成物に対するその影響を検討するモデルとして用いてよいばかりでなく、特にこの受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして天然または変異Notch3受容体と相互作用する生成物の選択のための応用に用いられてもよい。

【0065】

この種の細胞モデルは遺伝子工学技術を用いて作製してよい。それは、使用が望まれる細胞種により正常型かまたは変異型かの、問題の遺伝子の発現ベクター中へのクローン化、それが自律的複製ベクターであろうと、組み込みベクターであろうと、問題の細胞内で遺伝子の発現させる総てのエレメントを含有するベクター、または問題の配列を発現させる総てのエレメントを有する後者を包含する。このようにして得られた、その特性を与えるNotch3タンパク質を発現する真核または原核細胞は、その微細構造が後に続く本文中に記載されるトランスメンブランタンパク質と同様の位置にあると考えられ、次いでこの細胞について、この細胞の培地に添加することにより、種々のリガンドとNotch3タンパク質

10

20

30

40

50

の生成物との相互作用を同時に試験したり、Notch3遺伝子の生成物との相互作用が可能な合成化学生成物を試験することが可能となるモデルを構築することが可能となる。特に、問題の生成物はまた、アンタゴニストまたはアゴニスト活性のいずれかを有する生成物であることは注目すべきことである。

【0066】

医薬製品を試験するための細胞モデルの使用は十分公知であり；ここで再び、この種のモデルの詳細を提示する必要はない。

【0067】

この遺伝子の同定に関してもう1つ潜在する適用としては、このタンパク質に対する可能性あるリガンドを同定できるかもしれないということであり、なぜならそれらはヒトNotch3に伴う保存配列を有しているか、またはそれらがNotch3(アフィニティー法)またはこのシグナル経路のパートナーと相互作用するからである。これらモデルはin vitro型、例えばヒト細胞の培養物であってよく、通常の培養または、例えば所望の表現型を発現させるために形質転換された、ある種の血管のような、おそらくは単離器官の形態のいずれかであってよい。

【0068】

本発明はまた、ヒト起源の正常または変異Notch3に相当する表現型を発現する動物、特にマウスのような生物に関する。ここで再び、これらの動物をある種の医薬製品の効力を試験するモデル動物として使用してもよい。

【0069】

本発明はまた、前記の細胞モデルを用いて得られた生成物に関する。

【0070】

このようにして、決定された相互作用のタイプによって、有効成分としてプロNotch3活性を有する化合物を含むことを特徴とする治療用組成物が得られ；これは特に、前記されたようにポリペプチドの総てまたは一部、もしくはこれらと同じポリペプチドを発現するベクター、もしくはプロNotch3活性、Notch3様活性を有するか天然Notch3の産生を誘導する他の化学的または生物学的化合物であってもよい。

【0071】

有効成分が抗Notch3作用を有すると考えられる治療用組成物を証明することもまた可能であろう。

【0072】

これには、ここで再び、ルアーの役割を果たす前記の修飾タンパク質、または特にこれら抗体が変異した受容体を認識し、これらの条件下で正常な受容体の活性をブロックすることができる場合、抗Notch3抗体が含まれてよい。これにはまた、抗Notch3活性を有する化学物質またはNotch3アンタゴニストも含まれてよい。

【0073】

ある場合には、いくつかのNotch3ドメインの使用が、後者を天然リガンドに対するルアーとして働くと考えられる可溶性受容体を用いて変異させた場合、Notch3受容体活性を遮断する治療学上のアプローチを可能にするであろう；その他の場合には、完全な受容体を発現させることにより、タンパク質またはその断片のいずれかを直接用いて、または前記したベクターを用いて特に遺伝子療法を介して直接的にタンパク質を発現させる代替療法を提供することが可能であろう。

【0074】

遺伝子療法と関連して、「裸の」(naked)と前記された遺伝子またはcDNA配列の使用を提供することもまた可能であり；この技術は特にVical社により開発され、このような条件下で、ウイルスベクターの利用を特に必要とせず、ある組織内においてタンパク質を発現することが可能であることが示された。

【0075】

さらに遺伝子療法と関連して、当該技術の状況においても公知のとおり、ex vivoにおいて形質転換され、次いでそのまま、または類器官系でのいずれかで再移植される細胞の

10

20

30

40

50

使用を提供することも可能である。決定された細胞種の標的化、細胞への浸透、または核への輸送を容易にする薬剤の使用を考えることも可能である。

【0076】

使用可能な多くの医薬化合物の中で、Notch3生成物のリガンドに加えて、正常または変異Notch3遺伝子と相互作用する、もしくはこれら遺伝子の調節または発現において相互作用するセンスまたはアンチセンス配列についてさらに詳細に記載すべきであり、この生成物はまた、Notch3受容体により誘導される発現生成物の下流で相互作用することも可能である。Notch3に相当する可溶性配列についてはさらに記載されるべきである。

【0077】

Notch3受容体、特に変異Notch3受容体をブロックし、次いで／またはこれに相当するリガンドおよび／または、それゆえにプロまたは抗活性を有すると考えられる該受容体により誘導される生成物をブロックするモノクローナル抗体も記載されるべきである。

10

【0078】

この、Notch3受容体に向けられるモノクローナル抗体は、認識されるエピトープに依存し、治療用組成物での使用を可能にするプロまたは抗Notch3活性を有する可能性があることを思い起こすべきである。

【0079】

最後に、本発明は前記したように、患者において、特にCADASIL型の、またはNotch3受容体に関連した疾病の神経症状に対する素因を診断する方法であって、患者由来の生物学的サンプルを用い、その遺伝子に相当する核酸配列の総てまたは一部を解析することにより、Notch3における突然変異の存在を決定し、少なくとも1種のかかる突然変異の存在がNotch3受容体に関連した神経症状または疾病に対する患者の素因の指標となることを特徴とする方法に関する。

20

【0080】

他の診断方法では、血管平滑筋細胞の基底膜において予期される沈着物、Notch3タンパク質自身またはその分割産物の1つからなると考えられる沈着物を、抗体により同定することが可能になる。

【0081】

所望の突然変異の中で、表Cおよび図3に参照された突然変異をより詳細に記載してもよい。

30

【0082】

核酸配列は、ゲノムDNA、cDNAまたはmRNAのいずれであってもよい。前記したように、Notch3受容体における異常性に関連する可能性がある特定の疾患のリストが従前に与えられているが、証明され得る神経障害のうち、特に、脳血管型の障害および特にCADASILが理解されており；これらの症状の中で、これまでのところまだ知られていない病因論の前兆および痴呆を伴う、または伴わない片頭痛におけるNotch3の関与の可能性がさらに詳細に記載されてよい。

【0083】

本発明に基づく診断手段は、隔離して抽出された患者における陽性診断および鑑別診断、または、妊娠の恐れのある患者における選択的前兆候診断（例えば家系履歴）を可能にすると考えられ、それはまた出産前の診断として考えることも可能である。

40

【0084】

加えて、特異的な突然変異の検出により発展的な診断も可能となる。

【0085】

天然の遺伝子に関する遺伝子における突然変異を証明することを可能にする方法は、もちろん、非常に多数あり；それらはゲノムDNA、cDNAおよび／またはタンパク質を研究することにより行われる。それらは本質的に2つの大きなカテゴリーに分類することができ、第一のタイプの方法は、変異した配列とそれに対応する変異していない天然配列を比較することによって、突然変異の存在を検出するものであり、第二のタイプの方法は、例えば、突然変異の存在による誤対合を検出することにより、突然変異の存在を間接的

50

に検出するものである。

【0086】

両場合において、突然変異の検出に先立ち、Notch3に対応する配列の総てまたは一部を増幅させる方法が一般に好ましいと考えられ；これらの増幅方法はいわゆるPCR（以下の参考文献を参照）またはPCR類似法により行ってよい。PCR類似法とは、直接あるいは間接的な核酸配列の再生産を利用する、または標識系が増幅された、あらゆる方法を称すると理解され；これらの技術は十分に公知であり、一般にポリメラーゼによるDNAの増幅に関連しており；原サンプルがRNAであるとき、あらかじめ逆転写を行うことが望ましく；これまでに非常に多くの方法がこの増幅法、例えば、当業者に十分公知であるいわゆるNASBAおよびTMA法などを存在させることを可能にしてきた。

10

【0087】

表BはPCRプライマーの配列を示しており、それはPCR反応に関する温度と同様、エキソンの増幅を可能とするものである。

【0088】

配列の増幅に関する一般的な方法を実施例において記載する。

【0089】

点突然変異に関する試験

突然変異の直接配列決定の他、種々の方法を用いることができる。その技術を簡単に記載する：

1)「一本鎖構造多型現象」(Single Strand Conformation Polymorphisms, SSCP)（以下の参考文献を参照）あるいは変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)に関する試験。2)誤対合領域の切断（S1ヌクレアーゼによる酵素的切断、ピペリジンまたは四酸化オスミウムなどの種々の化合物による化学的切断）に基づく方法。

20

3)電気泳動によるヘテロ二重らせんの検出。

4)対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)プローブのハイブリケーション (hybridization)での使用に基づく方法。

ハイブリケーション(hybridization)技術に基づく、十分公知である他も使用できる。

【0090】

欠失、逆位または重複型の再配列に関する試験

ゲノムプローブ、cDNAプローブ、オリゴヌクレオチドプローブ、リボプローブ、いわゆる捕捉プローブまたはいわゆる検出プローブを用いるハイブリダイゼーション技術に基づく十分公知である他の方法を、この種の再配列に関する試験に使用することができる。

30

【0091】

同一家系の数人の患者由来のDNAが入手可能である場合に使用できる、もう1つの診断アプローチは、連鎖解析の方法に基づくものであり、それは関連した家系に属する患者が、罹病遺伝子のキャリアであろうとなかろうと、有している危険率を予測することを可能にする。この解析は遺伝子のすぐ近傍に位置する多型マーカーあるいは遺伝子内多型マーカーを用いて行うことができる。

【0092】

CADASIL家系における、Notch3遺伝子の突然変異の存在は、それをコードするタンパク質の機能に欠かせないアミノ酸を変化させる突然変異に相当する。

40

【0093】

さらに、実施例において、これまでに検出された突然変異の位置が示されるが、まだ検出されていないが、病理学的見地から同一のタイプの危険率をもたらすはずである他の突然変異がNotch3遺伝子に存在する可能性がある。

【0094】

いずれの場合においても、その変異Notch3タンパク質は天然タンパク質のそれとは異なる抗原性を示し得る。

【0095】

50

従って、Notch3に対する変異遺伝子の生成物を検出することにより、CADASIL型の神経障害、特に脳血管性障害およびNotch3受容体に関連した障害に対する感受性の診断あるいは予後を行うことが可能であり；この種の検出は、例えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて行うことができる。これらの状況下において、よく知られた方法、例えばRIAまたはELISAによってNotch3遺伝子の異常生成物を検出し、アッセイすることができ；これら公知の技術は、後に続く本文に先立ちこれ以上詳細には説明しない。もし皮膚の動脈に存在する沈着物が、Notch3タンパク質またはその切断生成物の1つに相当したとしても、正常タンパク質に対して向けられる抗体を用いることもできよう。

【0096】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるin vivoまたはex vivoで、結像試薬として働くように標識された、変異タンパク質の総てまたは一部に相当するモノクローナルまたはポリクローナル抗体に関する。

【0097】

このように、血管平滑筋細胞の基底に存在する顆粒塊が異常なタンパク質の集積によるものであることは明らかであり、抗体を用いたこのタンパク質に関する試験は、生検またはin vivoのいずれにおいても注目される診断となる。

【0098】

遺伝子生成物の検出に基づく方法

Notch3遺伝子の突然変異はこの遺伝子生成物の種々の修飾の原因である可能性があり、この修飾は診断上のアプローチのため用いることができる。便宜には、そのタンパク質は切断され、サイズが減じられ、またはなくなり；その特性、特にその抗原性が修飾され得る。正常タンパク質または変異体を認識するモノ-またはポリクローナル抗体の使用に基づく、いくつかの公知の方法を用い、かつ、タンパク質抽出物の、または細胞切片（例えば皮膚生検）の研究、あるいはin vivoでおこなわれる研究（PET-スキャン型イメージングなどにおいて検出できる分子と結合する抗体の助けを伴う結像）を用いる診断アプローチにおいて、これら総ての修飾を用いてよい。

【0099】

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、前記したベクターにより形質転換させた原核また真核細胞から得ることのできるタンパク質またはポリペプチドからなる、免疫薬剤を用いたヒトまたは動物器官の免疫反応によって得られる。好ましくはその免疫薬剤は、Notchタンパク質の変異型の特異的ポリペプチドからなり、その配列は、図3または表Cに相当する突然変異から選択される、少なくとも1つの突然変異を含んでなるポリペプチド配列から選択される。

【0100】

本発明は最後に、特に前記したように、プロNotch3活性を有する化合物を有効成分として含有する治療用組成物、ならびに抗Notch3活性を有する化合物を有効成分として含有する治療用組成物に関する。

【実施例】

【0101】

実施例1

Notch3遺伝子の単離および解析のスキーム

最初に要約した転写物の、遺伝子の位置に関しての目印および解析の続き、ネズミcDNAプローブを用いて、ヒトNotch3遺伝子に対するcDNA、次いで配列がそれおよびネズミcDNA配列を用いて配置され得るゲノムクローンを単離した。

【0102】

配列に関するさらなる情報は、YAC(884gI)に対するcDNA選択によって得られるcDNA断片(884Na4)から、またBAC 13J4 NotI-HindIII断片のサブクローニングにより得られる2つのゲノム断片(J431NHおよびJ432NH)から得られた。

【0103】

総ての配列を用いての(dBest)データベースの検索では、さらなるクローンの同定が可

10

20

30

40

50

能であった(IMEGEクローン, Genexpress)。

【0104】

対応するネズミ遺伝子と高度に一致するヒトNotch3遺伝子のコーディング配列は図1に示されている。

【0105】

表Aは、遺伝子の構造を模式的に示し、その配列およびエキソン-イントロン結合部の位置を明記する。

【0106】

この表では、第一のエキソンは、その5'末端エキソン33同様、完全にはクローン化されていない配列に相当する。

【0107】

公知の選択的スプライシング現象にあてはまる選択的cDNAが存在する可能性があることに注目すべきである。

【0108】

この配列は34のEGFドメイン、3個のNotch/lin12反復、ならびに3個のcdc10アンキリン様反復を含む。ヒトおよびネズミタンパク質は、目下のところ利用できる配列に関して90.5%の相同性を示す。1.45kbのEGF様ドメインを含有する部分的ヒトcDNAプローブは、胎児組織ならびにヒト成人組織中に偏在する転写物を明らかにし、その大きさは7.5~9.5 kbの間であり、ネズミ転写物と同じである(図4)。

【0109】

このプローブは脳のある小区域にあるもう1つの転写物を明らかにし、その大きさは1.3~2.4kbの間と評価される(図4)。

【0110】

実施例2

突然変異の研究

CADASILのNotch3遺伝子における突然変異の範囲を研究するため、まず、実質的なゲノムDNA再配列の存在の可能性を、酵素とNotch3プローブの種々の組み合わせを用いて研究した。

【0111】

徹底的な再配列はCADASIL患者では検出できず、それは次いで点突然変異が試験されるからである。

【0112】

このように、ゲノムDNAにおけるNotch3遺伝子の全コーディング配列の突然変異は、家族関係を持たない51人のCADASIL患者において、SSCP法とヘテロ二重らせん解析を併用して研究した。彼らのうち28人が第19染色体との関連性についての証拠が証明された家族に属し、33人が皮膚の小動脈壁の超微細構造領域を示す(血管平滑筋細胞の基底膜におけるオスミウム酸親性顆粒の沈着の存在)。

【0113】

3つを除いては総てのスプライシング結合部が解析された。さらに、総ての患者についてエキソン4およびそのスプライシング部位のPCR産物の直接配列決定を行った。

【0114】

42人の患者(82%)では、対応する突然変異と矛盾のない障害が認められ、該突然変異は200の対照染色体いずれにおいても観察されていない。26人の患者については、関連した、影響を及ぼす、またはそうではない1以上を解析することができ、各場合において、突然変異がCADASIL表現型とともに分離したことが確認された。これらは29の異なる突然変異であり、うち20は初期に記載されている。それらは24のミスセンス突然変異を含み、これは40人の患者で出現し、この突然変異は(16)1つのアミノ酸が6個のシステイン残基のうち付加または変異システイン(8)の1つで置換しているはずであり、これがEGFドメインの鍵エレメントである。

【0115】

10

20

30

40

50

後者2人の患者における5'末端スプライシング部位での2つの突然変異は、通常、エキソン4のスプライシングに影響を及ぼすはずである。最後の3つの突然変異はミスセンス突然変異であり、3人の患者で前記の突然変異とともに同時に出現する。

【0116】

患者21は、EGF3のコドン141でアルギンからシステインへ変異し、かつ、EGF7のコドン288で保存されたグリシンからアラニンへ変異した2つの異なる億つ善変異を有している。この患者の家系図は入手できず；従ってこれら2つの突然変異の同時分離については研究できなかった。

【0117】

患者29は、アラニン182からシステインへ変異したEGF4における第一の突然変異と、cdc10ドメインにおける、高度に保存されたアラニン1852からトレオニンへ変異した第二の突然変異を有する。

【0118】

最後の患者55は、システイン(224)からトリプトファンへ変異した、かつ、保存されていないロイシン(497)からセリン残基へ変異した、EGFドメインにおける2つの異なる突然変異のキャリアーである。

【0119】

後者の3つのミスセンス突然変異は200個の対照染色体では検出されていないが、それらはシステイン残基を変異させる、または創出するミスセンス突然変異の存在をもたえ与えるまれな多型性を含むと考えられる。

【0120】

これら病原性を有する26個の突然変異の大部分が、もっぱらEGF部分に存在することに注目すべきである。25人の患者に出現するこれら突然変異の41%(26のうち11)エキソン4に位置し、65%(26のうち17)は第6EGFドメインに存在する(特に図3を参照)。

【0121】

図3では、発見された主要な突然変異を同定するための検出ができ、選択された名称が突然変異ならびにこれに対応するタンパク質修飾の位置を示す。

【0122】

前記で示したように、Notch遺伝子が成人における神経障害に関与しているという事実は、Notchはショウジョウバエの発達中に関与することが主に知られているので、全く驚くべきことである。今のところどのCADASIL家族も発達異常を示すまで調べ上げられてはいない。

【0123】

実施例3

SSCP法による患者の突然変異の検出

プライマーとして用いたオリゴヌクレオチドは、イントロン - エキソン結合配列(表B)から合成して、約200bpのゲノム断片を増幅させた。PCRプライマーの配列は以下に与えられている(表A)。

【0124】

解析は血液サンプルまたは他のいずれかの組織から抽出したDNAを用いて行うことができる。

【0125】

増幅反応は、100ngのゲノムDNA、0.5μmの各プライマー、150μlの4dNTPs混合物、Cetus製Taqポリメラーゼ1xPCR、1UのTaqポリメラーゼ(BRL)、P³³で標識した1.5μCi αdCTPを含有する最終容量25μl中で、30回の同じサイクル(94℃、15秒；65℃、15秒；72℃、15秒)からなるプロトコールに従って行う。

【0126】

いくつかのプライマーについては、表Aに示したように、70℃の「アニーリング」温度を用いるべきである。

【0127】

10

20

30

40

50

PCR生成物は50%ホルムアミド中で変性させ、6%非変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動により分離した。

【 0 1 2 8 】

オートラジオグラフィーの後、異常な変異体の検索の際は、患者において得られたSSCPバンドを健康な対照のそれと比較する。それらの解析は診断のアプローチとして使用することができる。次いで必要であれば、これらの変異体の配列決定を行うことが可能である。

【 0 1 2 9 】

表A

Notch3遺伝子のエキソン - イントロン構造 (エキソン - イントロン結合部の配列および位置)

【表 1】

スプライス受容部位	エキソン (大きさ)	位置	スプライス供与部位 イントロン/エキソン	
	1	1-196	CTGCAG/gtgaggggc laAlaAl	
cccacacag/CCCCC aProPr	2 (79)	197-275	CTGCCT/gtgagtgcc aCysLe	
gcccacag/GTGCCC uCysPr	3 (143)	276-418	TCCGAG/gtgagagg heArgG	10
cctcccag/GCCCTG lyProA	4 (339)	419-757	TTCCTG/gtgagtga euProG	
ctgttag/GGTTTG lyPheG	5 (123)	758-880	GGACAG/gtgggcac rpThrG	
tgccacag/GCCAGT lyGlnP	6 (234)	881-1114	AGACTG/gtgagtgg ysThrG	
ctcccag/GCCTCC lyLeuL	7 (156)	1115-1270	CTATCG/gtgagggg erIleG	20
tccggcag/GCGCCA lyAlaA	8 (187)	1271-1456	TGGCAG/gtgggtgg etAlaG	
tgcccag/GCTTCA lyPheT	9 (114)	1457-1570	CCTCGG/gtgaggac roSerG	
caccccag/GCTTCA lyPheS	10 (114)	1571-1684	CCGAGG/gtgaggcg laGluG	
ccccacag/GCTTTG lyPheG	11 (234)	1685-1918	CCACAG/gtgggacc hrThrG	
gcccctag/GTGTGA lyValA	12 (111)	1919-2029	TCACAG/gtgggcaa heThrG	30
ctcccag/GGCCCC lyProL	13 (193)	2030-2222	TGGCGG/gtgagggc oGlyGl	
cctgccag/GTTCCG yPheAr	14 (152)	2223-2374	TCCAGG/gtgtgtac alGlnG	
cccaacag/GACGTC lyArgG	15 (114)	2375-2488	GGCAAG/gtatgcoac rpGlnG	
taccccag/GCCCAC lyProA	16 (156)	2489-2644	ACCCCA/gtgagtgc spProA	40

gtccgcag/ACCCAT snProC	17 (226)	2645-2870	CCCCAG/gtgggcgg rProSe	
cgctccag/CTCCTG rSerCy	18 (202)	2871-3072	TGCCAG/gtgggtgg CysGln	
ccctccag/ACGCTG ThrLeu	19 (148)	3073-3220	AGATCG/gtgaglgg lnIleG	
ctttgcag/GGGTGC lyValA	20 (185)	3221-3405	TGTGAG/gtaagggg CysGlu	
cactgaag/TGTCTT CysLeu	21 (133)	3406-3538	CGCTGG/gtaagcca hrLeuG	10
tcctccag/GGGTGC lyValL	22 (258)	3539-3796	TCTCAG/gtaacct heSerG	
tcgctcag/GTCCTC lyProA	23 (119)	3797-3915	GCCCAG/gtaggigtg AlaGln	
gaccccccag/CCGTTC ProPhe	24 (566)	3916-4481	TTGCAA/gtgagccc rCysAs	
cccaccag/CCCGGT nProVa	25 (333)	4482-4814	GATCGG/gtgagtgac lIleG	20
tcctgcag/CTCGGT ySerVal	26 (155)	4815-4969	TGCGGG/gtgcggcc alArgG	
tgctcttag/GGGAGC lyGluP	27 (223)	4970-5192	CATGAA/gtgagaac yMetLy	
tcgcccag/GAACAT sAsnMe	28 (85)	5193-5277	CTAAAG/gtactgcc LeuLys	
ccctccag/GTAGAG ValGlu	29 (162)	5278-5440	GCCCAG/gtcagtgac lyProA	30
ccctgcag/ATGGCT spGlyP	30 (305)	5441-5745	TTCCAG/gtgagata PheGln	
tgctcttag/ATTCTC IleLeu	31 (148)	5746-5893	AGCTTG/gtaggtg luLeuG	
ccctccag/GGAAAT lyLysS	32 (99)	5894-5992	AGCAAG/gtgagccc SerLys	40
ccccccag/GAGGAG GluGlu	33	5993-		

【 0 1 3 0 】

表B

Notch3遺伝子の突然変異のスクリーニングに用いたプライマーの配列

【表 2】

エキソン	大きさ	ドメイン	プライマー	PCR生成物の大きさ
1		Signal peptide	EOF AAGGAGGGAGGAGGGGAG EOR TGGGGGTTCTTGCACTCC* EOF AAGGAGGGAGGAGGGGAG EORBIS GGTTCCCTGCCTCCCATGA*	125 163
2	79	EGF1	E1F TCCTCCACCTTCCTTCAC* E1R ACACACAGGGCCCCACTGGT*	148
3	143	EGF 1-2	N1 F TGTGCTGCCCAACCAAGCCA* N1 R ACTGACCACACCCCCGACTA*	224
4	339	EGF 2-5	N2A F TAGTCGGGGGTGTGGTCAGT* N2A R TCATCCACGTCGCTTCGGCA CNA F ATGGACGCTTCCTCTGCTC CNA R ACATAGTGGCCCTGTGTAGC CNA F ATGGACGCTTCCTCTGCTCC N3AR CCTCTGACTCTCCTGAGTAG*	192 167 295
5	123	EGF 5-6	N23Fbis TGACCATCCTTGCCCCCTT* N23 R CTGGCCTGTGGCACACAGAT *	241
6	234	EGF6-8	N13A F TGGACTGCTGCATCTGTGTG* N13A R ACACGCCTGTGGCACAGTCA N13B F GAGCTGCAGTCAGAATATCG N13B R ATCCATGGCTCCCTGCAGAG*	191 145
7	156	EGF 8-10	N24 F CAGAGCAGGAAGATCTGCCT* N24 R CATTACAGACGACGGAGCT*	229

10

20

30

40

8	187	EGF 10-11	N3 F	ATCGCACTCCATCCGGCA*	212
			N3 R	ACCCACCTGCCATACAGA*	
9	114	EGF 11-12	N25A F	CGTTCACACCATAGGGTAGC*	215
			N25A R	CCCCTTCCCAGACATGTCTT	
10	114	EGF 12-13	N25BF	CTTGTCGGACTGTCATTGG	195
			N25BR	GTGTACTGCTCTCACCCTT*	
11	234	EGF 13-15	N4AF	ATTGGTCCGAGGCCTCACTT*	213
			N4AR	ACCTGGCTCTCGCAGCGTGT	
			N4B R	CCATTCCCAACCCCTCTGTG	199
			N4B F	TGCCTGTGCTCCTGGCTACA*	
12	111	EGF 15-16	N5 F	TGGCCACTCCATGCCATGTT*	166
			N5 R	TCTCATGGCAGCCACTTGCC*	
13	193	EGF 16-18	N14 F	ATGAGTGTGCTTCCAGCCCA*	258
			N14 R	GCAGTGTCTGAGGCTGAGAA*	
14	152	EGF 18-19	N6 F	TCCCTGGCCTGACTACCTTC*	207
			N6 R	CTGCAGAGGGAAGGTGAGGT*	
15	114	EGF 19-20	N26BF	AAGGCTATCCTGCTTCC*	183
			N26BR	GAGGAGGAGGGAAGAGAA*	
16	156	EGF 20-22	S13FBIS	AGGATGTGGACGAGTGTGCT	195
			N26CR	GCTTAATGACTGTGTTCC*	
17	226	EGF 22-24	N15A F	TCAGACTGGGCTAATGGGGG*	257
			N15A R	TCGCAGTGGAAGCCTCCGTA	
			N15B F	GATGTGGATGAGTGCCTGAG	166
			N15B R	GTCCTGCTCTTCAAGCAGA*	
18	202	EGF 24-25	N27F	GATCCTCCCTCCCACTCCTT*	256
			N27R	AGGTCCCCAGTAACTCCA*	

10

20

30

40

19	148	EGF 25-27	N22 F	ACTGACTCTAAGTGCTTCCC*	240
			N22 R	AGCAGGAGGTACGTGCATGA*	
20	185	EGF 27-28	N7 F	TGTTCTGTGCCACTCTCCT*	249
			N7 R	ACCTCCTCTTCCCTCTCCT*	
21	133	EGF 28-29	N8 F	TCTGTGTCCCACTAAGCTGA*	237
			N8 R	CAAGAGGAAATGAAGACAGC*	
22	258	EGF 29-31	N9A F	TTCCTCTTGACCACCCCTCG*	217
			N9A R	TGGCAGGCACCTGAGCGACA	
			N9B F	CAGGATACACTGGTTTGCGC	209
			N9B R	TGCCACGTTATGGATCAGCC*	
23	119	EGF 31-32	N10 F	GATCTACATGCTCCCGCTCG*	178
			N10 R	TACTCCTCCTCCATAGGCCG*	
24	566	EGF 32-34	N16AFTR	CGTTCTGGGGTCCGCGTT	249
		Lin12 N1-3	N16DR	AAGCGCAGCGAAGAAGGGC	
			N16FF	GCCCTTCTTCCGCTGCGCTT	230
			N16FR	ACTGCAGCGCCTCGCATTGC	
			N16GF	CTGCGACCGCGAGTGCAACA	239
			N16HR	ATAGACAGACCGATCGAT*	
25	331	Lin12 N3	N21CF	CTCTCTGCCTCACCCCTT*	207
			N21CR	GCTGGAACGCAGTAGCT	
			N21DF	TGCTCACAGTGCTGCTG	223
			N21DR	CACGGCTTTTCCAGGTG*	
26	155		N34F	TTTGAGCCCTCTGGTCC*	306
			N34R	AAGAGCAGGAAGCAGAG*	
27	222	TM	N28Fbis	TCCCTCTGCTTCCTGCTCTT*	291
			N28R	TCACAAGGTCCCCGTAGTCA*	

10

20

30

40

28	85		J5N3 F	CTCACATCCCCTCTTCCCAT*	203	
			J5N3 R	ATCACGCCCATCATCCACTG*		
29	163	Cdc10 N1	L24bisf	CAGCACCAAAGGGTG*	241	
			L24bisR	CATCCCTTTGGGAGG*		
30	305	Cdc10 N1-3	N17AF	ATGGCTTCACCCGCTAATG	176	
			N17AR	AGCCAGGTGCAAAGCAGTCT		10
			N17BF	TCAGCTTGGGGCACGGACTG	165	
			N17BR	GCATCGGCTGTGACAGCTGT		
31	148	Cdc10 N4-5	N26FBIS	TGTTCTGCCATGACCCCT*	239	
			N26RBIS	CAGGTGACACTAACCCAGTC*		
32	98	Cdc10 N5-6	N31F	TCCTGACCTCTCTCCCCTTC*	178	
			N31R	AATGGCGCTGTGCCACTGCT*		20
33		Cdc10 N6	N32AF	GCTACTGTTAGCTGGGGTTT*	214	
		NLS	N32AR	TGATCCAGCAAGCCACGAT		
		PEST	N32EFTER	TCACCOACCACCTGGACA	425	
			N32DR	ACCAAGCTGTGCCAGAGA		
			N32DF	TCCAAGAAGAGCAGGAGG	246	
			N32DR	ACCAAGCTGTGCCAGAGA		30
			N32B F	CAGTGTCTCTGGCACAGCTT	248	
			N32BR	TCCTGGGACTGCCAGGTAA		
			N32CF	AGCTGCTCAACCCAGGGA	229	
			N32CR	GTGGATTCCGACCAGTCT		
			N32GF	GAATCCCCTGAGCACT	235	
			N32GR	CTAAGAACTGACGAGC		40

*イントロンプライマー

【 0 1 3 1 】

表C

CADASHIL患者におけるNotch3突然変異

【表 3】

患者	連鎖の 証拠	SMC 部位	Notch3 nt ³	Notch3 突然変異	効果	エクソン	ドメイン	分離
52*	nd	nd	224	TGT-->TAT	C49-->Y*	N2	EGF1	nd
56	nd	+	291	TGG-->TGI	W71-->C	N3	EGF1	nd
11	+	nd	406	CGT-->TGT	R110-->C	N3	EGF2	+
3	+	+	419(-2)	AG-->GG	abnormal splicing of exon 4 ?	N4		+
39	nd	+	419(-2)	AG-->CG	abnormal splicing of exon 4 ?	N4		nd
10	+	+	475	CGC-->TGC	R133-->C	N4	EGF3	+
20	nd	+	475	CGC-->TGC	R133-->C	N4	EGF3	nd
46	+	nd	475	CGC-->TGC	R133-->C	N4	EGF3	+
6	+	nd	499	CGC-->TGC	R141-->C	N4	EGF3	+
12	+	+	499	CGC-->TGC	R141-->C	N4	EGF3	+
19	+	nd	499	CGC-->TGC	R141-->C	N4	EGF3	+
21*	nd	+	499	CGC-->TGC	R141-->C	N4	EGF3	nd
			941	GGC-->GGG	G288-->A*	N5	EGF7	nd
38	+	nd	499	CGC-->TGC	R141-->C	N4	EGF3	+
49	+	+	499	CGC-->TGC	R141-->C	N4	EGF3	+
26	+	+	514	TGC-->CGC	C146-->R	N4	EGF3	+
4	+	+	535	CGC-->TGC	R153-->C	N4	EGF3	+
50	nd	+	535	CGC-->TGC	R153-->C	N4	EGF3	+
9*	+	+	583	CGC-->TGC	R169-->C*	N4	EGF4	+
15*	+	nd	583	CGC-->TGC	R169-->C*	N4	EGF4	+
24	+	nd	583	CGC-->TGC	R169-->C	N4	EGF4	+
36*	nd	+	583	CGC-->TGC	R169-->C*	N4	EGF4	nd
48	nd	+	583	CGC-->TGC	R169-->C	N4	EGF4	nd
1	+	nd	589	CGT-->TGT	G171-->C	N4	EGF4	+
45*	+	+	622	CGC-->TGC	R182-->C*	N4	EGF4	+
47*	nd	+	622	CGC-->TGC	R182-->C*	N4	EGF4	nd
29*	+	+	622	CGC-->TGC	R182-->C	N4	EGF4	+
			5632	GCT-->ACT	A1852-->T*	N30	cdc10	+
41	nd	+	631	TGT-->CGT	C185-->R	N4	EGF4	nd
57	nd	+	712	TGC-->AGC	C212-->S	N4	EGF5	nd

10

20

30

40

8	+	nd	742	<u>I</u> GT--> <u>G</u> GT	C ₂₂₂ -->C	N4	EGF5	+
55	nd	nd	749	<u>T</u> GT--> <u>T</u> AT	C ₂₂₄ -->Y	N4	EGF5	+
			1568	<u>T</u> CG--> <u>T</u> TG	S ₄₉₇ -->L	N9	EGF12	-
14	+	+	851	<u>T</u> AT--> <u>T</u> GT	Y ₂₅₈ -->C	N5	EGF6	+
54*	nd	+	1703	<u>T</u> GT--> <u>T</u> AT	C ₃₄₂ -->Y*	N11	EGF13	nd
17*	+	+	1750	<u>C</u> GC--> <u>T</u> GC	R ₅₅₈ -->C*	N11	EGF14	+
18*	+	+	1750	<u>C</u> GC--> <u>T</u> GC	R ₅₅₈ -->C*	N11	EGF14	+
31*	nd	+	1810	<u>C</u> GC--> <u>T</u> GC	R ₅₇₈ -->C*	N11	EGF14	+
43	nd	nd	2260	<u>C</u> GC--> <u>T</u> GC	R ₇₂₈ -->C	N14	EGF18	nd
25	+	+	3031	<u>C</u> GC--> <u>T</u> GC	R ₉₈₅ -->C	N18	EGF25	+
42	nd	+	3031	<u>C</u> GC--> <u>T</u> GC	R ₉₈₅ -->C	N18	EGF25	nd
7	+	nd	3094	<u>C</u> GC--> <u>T</u> GC	R ₁₀₀₆ -->C	N19	EGF26	+
35	nd	nd	3169	<u>C</u> GC--> <u>T</u> GC	R ₁₀₃₁ -->C	N19	EGF26	+
33	nd	nd	3769	<u>C</u> GC--> <u>T</u> GT	R ₁₂₃₁ -->C	N22	EGF31	nd
56*	nd	+	3859	<u>T</u> GC--> <u>C</u> GC	C ₁₂₆₁ -->R*	N23	EGF32	nd

* 従前に報告された患者および突然変異⁷

SMC：平滑筋細胞

10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

前記した種々の方法に関する参考文献

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)

Saiki et al., Science 239, p.487, 1988 + reference manual

【 0 1 3 3 】

SSCP

Orita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, P.2766-2770, 1989

【 0 1 3 4 】

ミスマッチの証明に基づく突然変異の検出のための技術

化学切断

酵素切断 (S1ヌクレアーゼ)

ヘテロ二重らせん

対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ(ASO)

【 0 1 3 5 】

参考文献：

Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4397, 1988

Sherk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 989, 1975

Cariello, Hum. Gnet., 42, 726, 1988

【 0 1 3 6 】

クローニングベクターおよび基礎的な分子生物学技術

- Green Publishing Associates and Wiley Interscience, 1st edition 1987, John Wiley and sonsにより刊行のCurrent protocols in molecular biology, Eds F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, S.G. Seldman, J.A. Smith and K. Struhl

- Molecular cloning, A laboratory manual, J. Sambrook, EF Fritsch and T. Maniatis, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press

【 図 1 B 】

[illegible]

1037	ACIA	GGC	GTG	TCG	TTC	GAG	GCG	ACC	TGC	ATC	CTC	GAC	CTG	TCG
	ATC	GGC	ATG	C	F	N	G	A	T	C				
1082														
	TCG	TTC	TAC	TTC		1097								
1127							P	M	K	G				
	CAC	CTG	GAT	GAC	CTG	1142								
	N	L	D	A	B		S	V	N	P	C	H	E	D
	ATC	TCG	GAC	ACIA	AAI	CGC	ATC	GCG	GGG	MTT	TCG	ACC	TTC	
	C	CCD	T	D	N	P	V	N	G	R	A	I	C	T
	CTC	CGC	TTC	GAC	CTG	1222								
	P	P	G	G	T		C	A	C	D	Q	D	V	D
	TGC	TTC	ATG	GCG	ACC	1277								
	C	S	I	G	A	N		E	H	L	G	R	C	V
	ACG	AGC	GGC	TTC	TTC	CTC	TCG	CAC	TGC	CTG	AGC	TAC	ATC	
	N	T	Q	G	S	F	L	C	Q	C	G	R	G	T
	1352													
	G	P	R	C	E	T	D							
	1397													
	ACG	AGC	CAG	GCG	CTC	1412								
	C	R	N	Q	A									
	1442													
	TCG	TTC	ATG	GCA	CTG	1457								
	C	I	C	H	A									
	1487													
	ATT	TCG	GAA	TTC	CAG	1502								
	F	O	R	C	Q	S	E	P	C	V	N	G	C	V
	AGC	GAC	CGA	ATC	ATC	1547								
	A	R	V	N	A									
	1577													
	AGC	GCG	TTC	AGC	TTC	1592								
	1622													
	CCG	TTC	AGC	ATC	CGC	1637								
	C	R	N	G	C									
	1667													
	GAG	TCG	CTC	CTC	GAC	1682								
	T	C	R	T	C									
	1712													
	ACG	GTG	CTC	TTC	TTC	1727								
	N	D	D	E	C									
	1757													
	GTG	ATG	GCG	ATC	CGC	1772								

【 図 1 D 】

[illegible]

3109	3122	3137										
CAJ	AGC	GGG	GTC	TTC	TGC	ACT	GCG	GCG	TAT	TGC	TTC	TTC
Q	N	C	G	R	C	V	Q	T	G	A	T	C
3110	3123	3138										
CCC	CTC	GGA	TGC	AGC	TTC	TGC	ATC	GAC	AGC	TTC	CCC	CCC
P	F	G	W	S	R	C	L	C	D	I	R	S
3111	3124	3139										
TTC	AGG	GAG	GAC	GCA	GGC	TTC	GTC	GTC	AGC	GAC	CAG	CAG
C	R	E	A	A	A	G	T	G	T	G	R	L
3112	3125	3140										
CAJ	AGC	GGG	GTC	TTC	TGC	ACT	GCG	GCG	TAT	TGC	TTC	TTC
C	A	Q	A	G	C	R	C	V	Q	T	G	A
3113	3126	3141										
CCC	CTC	GGA	TGC	AGC	TTC	TGC	ATC	GAC	AGC	TTC	CCC	CCC
C	V	C	P	E	G	R	C	L	C	D	I	R
3114	3127	3142										
TTC	AGG	GAG	GAC	GCA	GGC	TTC	GTC	GTC	AGC	GAC	CAG	CAG
C	R	E	A	A	A	G	T	G	T	G	R	L
3115	3128	3143										
CAJ	AGC	GGG	GTC	TTC	TGC	ACT	GCG	GCG	TAT	TGC	TTC	TTC
C	A	Q	A	G	C	R	C	V	Q	T	G	A
3116	3129	3144										
CCC	CTC	GGA	TGC	AGC	TTC	TGC	ATC	GAC	AGC	TTC	CCC	CCC
C	V	C	P	E	G	R	C	L	C	D	I	R
3117	3130	3145										
TTC	AGG	GAG	GAC	GCA	GGC	TTC	GTC	GTC	AGC	GAC	CAG	CAG
C	R	E	A	A	A	G	T	G	T	G	R	L
3118	3131	3146										
CAJ	AGC	GGG	GTC	TTC	TGC	ACT	GCG	GCG	TAT	TGC	TTC	TTC
C	A	Q	A	G	C	R	C	V	Q	T	G	A
3119	3132	3147										
CCC	CTC	GGA	TGC	AGC	TTC	TGC	ATC	GAC	AGC	TTC	CCC	CCC
C	V	C	P	E	G	R	C	L	C	D	I	R
3120	3133	3148										
TTC	AGG	GAG	GAC	GCA	GGC	TTC	GTC	GTC	AGC	GAC	CAG	CAG
C	R	E	A	A	A	G	T	G	T	G	R	L
3121	3134	3149										
CAJ	AGC	GGG	GTC	TTC	TGC	ACT	GCG	GCG	TAT	TGC	TTC	TTC
C	A	Q	A	G	C	R	C	V	Q	T	G	A
3122	3135	3150										
CCC	CTC	GGA	TGC	AGC	TTC	TGC	ATC	GAC	AGC	TTC	CCC	CCC
C	V	C	P	E	G	R	C	L	C	D	I	R
3123	3136	3151										
TTC	AGG	GAG	GAC	GCA	GGC	TTC	GTC	GTC	AGC	GAC	CAG	CAG
C	R	E	A	A	A	G	T	G	T	G	R	L
3124	3137	3152										
CAJ	AGC	GGG	GTC	TTC	TGC	ACT	GCG	GCG	TAT	TGC	TTC	TTC
C	A	Q	A	G	C	R	C	V	Q	T	G	A
3125	3138	3153										
CCC	CTC	GGA	TGC	AGC	TTC	TGC	ATC	GAC	AGC	TTC	CCC	CCC
C	V	C	P	E	G	R	C	L	C	D	I	R
3126	3139	3154										
TTC	AGG	GAG	GAC	GCA	GGC	TTC	GTC	GTC	AGC	GAC	CAG	CAG
C	R	E	A	A	A	G	T	G	T	G	R	L
3127	3140	3155										
CAJ	AGC	GGG	GTC	TTC	TGC	ACT	GCG	GCG	TAT	TGC	TTC	TTC
C	A	Q	A	G	C	R	C	V	Q	T	G	A
3128	3141	3156										
CCC	CTC	GGA	TGC	AGC	TTC	TGC	ATC	GAC	AGC	TTC	CCC	CCC
C	V	C	P	E	G	R	C	L	C	D	I	R
3129	3142	3157										
TTC	AGG	GAG	GAC	GCA	GGC	TTC	GTC	GTC	AGC	GAC	CAG	CAG
C	R	E	A	A	A	G	T	G	T	G	R	L
3130	3143	3158										
CAJ	AGC	GGG										

【 図 1 F 】

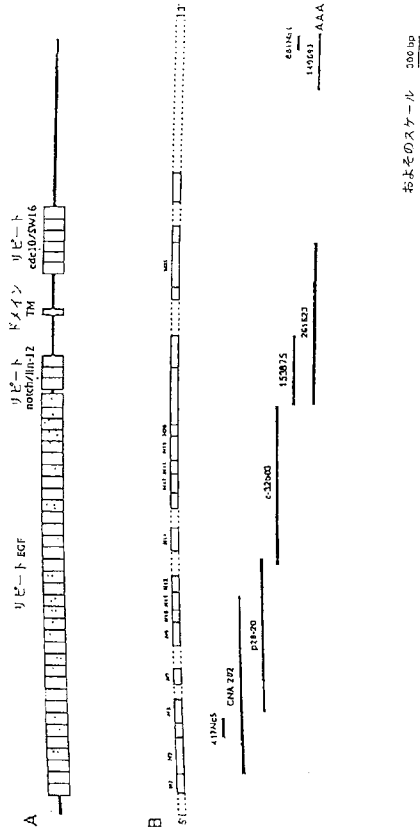
4142	CTG	GGG	CAG	CGC	TTC	TTC	4157	CTG	CAG	CGC	GGG	4172	GGC	TGG	AGC	GGG
4143	T	A	A	P	F	T	4158	CTG	CAG	CGC	GGG	4173	T	A	A	P
4187	C	T	G	C	G	G	4202	C	C	C	C	4217	C	C	C	C
4188	C	T	G	C	G	G	4203	C	C	C	C	4218	C	T	G	C
4189	C	T	G	C	E	A	4204	C	C	A	A	4219	C	T	G	C
4232	C	T	G	C	G	G	4247	C	A	A	A	4262	C	T	G	C
4233	C	T	G	C	G	G	4248	C	A	A	A	4263	C	T	G	C
4277	C	T	G	C	F	R	4251	C	A	C	Q	4301	C	T	G	C
4278	C	T	G	C	G	G	4252	C	A	C	Q	4302	C	T	G	C
4279	C	T	G	C	D	R	E	4253	C	N	S	4303	C	T	G	C
4322	C	T	G	C	G	G	4254	C	C	C	C	4357	C	T	G	C
4323	C	T	G	C	G	G	4255	C	C	C	C	4358	C	T	G	C
4357	C	T	G	C	S	L	4256	C	C	C	C	4359	C	T	G	C
4358	C	T	G	C	S	L	4257	C	C	C	C	4360	C	T	G	C
4412	C	T	G	C	H	R	L	4258	C	T	G	4361	C	T	G	C
4413	C	T	G	C	H	R	L	4259	C	T	G	4362	C	T	G	C
4414	C	T	G	C	H	R	L	4260	C	T	G	4363	C	T	G	C
4457	C	T	G	C	G	G	4261	C	T	G	4364	C	T	G	C	
4458	C	T	G	C	G	G	4262	C	T	G	4365	C	T	G	C	
4459	C	T	G	C	G	G	4263	C	T	G	4366	C	T	G	C	
4460	C	T	G	C	G	G	4264	C	T	G	4367	C	T	G	C	
4461	C	T	G	C	G	G	4265	C	T	G	4368	C	T	G	C	
4462	C	T	G	C	G	G	4266	C	T	G	4369	C	T	G	C	
4463	C	T	G	C	G	G	4267	C	T	G	4370	C	T	G	C	
4464	C	T	G	C	G	G	4268	C	T	G	4371	C	T	G	C	
4465	C	T	G	C	G	G	4269	C	T	G	4372	C	T	G	C	
4466	C	T	G	C	G	G	4270	C	T	G	4373	C	T	G	C	
4467	C	T	G	C	G	G	4271	C	T	G	4374	C	T	G	C	
4468	C	T	G	C	G	G	4272	C	T	G	4375	C	T	G	C	
4469	C	T	G	C	G	G	4273	C	T	G	4376	C	T	G	C	
4470	C	T	G	C	G	G	4274	C	T	G	4377	C	T	G	C	
4471	C	T	G	C	G	G	4275	C	T	G	4378	C	T	G	C	
4472	C	T	G	C	G	G	4276	C	T	G	4379	C	T	G	C	
4473	C	T	G	C	G	G	4277	C	T	G	4380	C	T	G	C	
4474	C	T	G	C	G	G	4278	C	T	G	4381	C	T	G	C	
4475	C	T	G	C	G	G	4279	C	T	G	4382	C	T	G	C	
4476	C	T	G	C	G	G	4280	C	T	G	4383	C	T	G	C	
4477	C	T	G	C	G	G	4281	C	T	G	4384	C	T	G	C	
4478	C	T	G	C	G	G	4282	C	T	G	4385	C	T	G	C	
4479	C	T	G	C	G	G	4283	C	T	G	4386	C	T	G	C	
4480	C	T	G	C	G	G	4284	C								

5179	5180	5207
GAC GGC GTC GGC ATG	AAC AAC ATG GCC	AAG GTC AGC CTT ATG
G C A L G G H K N N A K A G	G C E S L L G	
000 GAG GTC GGC AAC	GAC TGG ATG	GAC AAG TGC GAC GAG GGC
G C E V A T A T D V H M D T	E C P E A E	
2467	2468	5208
AAC GTC AAG ATG GAC	GAC GAC ATG	GCC GTC GAC GAG GTC
K A L K L V E E G E G N G	G C A Z E A	
5352	5353	5354
GAT GTC TGC CTT GAC	TGG ACT GAC	CAT CTT GTC GCT GCT
V D C R G M T P Q	H H L V A A	
5355	5372	5389
GTC GTC CCA CCA CCA	GTC CCA	ACA CCA GAC CAC CAC
I R V A P A N A N A L T P P	Q G G	
5402	5417	5432
GAT GTC GAT GAT GAT	ATG ATG ATG	ACA GAT GAT GAT
A C A C D G H D V N V N R	G Z P D G	
5447	5462	5477
GTC GTC CTA ATG ATG	TTC TGC TGC	ATG ATG ATG GAT
F T P L M L A S F C G A L E		
5492	5507	5522
GTC ACA ACT GAC GAC	GAC GAT GAC	TGC ACT GAT
H F H T E E D E A D D T S A S		
5557	5552	5567
TTC TGC CAC CTT	ATG GAT	ACA GAC CCA CCA
I S C D L C Q G A Q L C A R		
5583	5597	5612
GAC GAT GTC ATG	GAC GAT	CCT GTC GCT TGT
A T T G C T L H L A R V		
5627	5642	5657
GCT GTC GAT GAT GAT	ACC GAC	GTC GAT GTC GGC GCA
A N A G C C T C A G R L C		
5672	5687	5702
AAC AAT GAC GAC	TCA GAC	ACT CCA CCA GAT
A N A G C G T G R L H T A		
5717	5732	5747
GTC ACA GAT GAT GAT	GTC GAT	CTC ATG CTT ACA
T T A D A C G F Q		
5752	5777	5792
GCT TCT GAC TTG	GAT ATG	GCA GAT GTC ACA
S T D L C R H A A S T A		
5807	5822	5837
TTC T L A A C G C	GAC GAC	GAC GAT ATG GAA
A C C C C A V E E		
3592	3587	2882
CTC ATC ACC GAC CAC	CAT GAT	ATG GTC CTT GGC
A S H D V N A A T D E L G		
5887	5912	5927
GTC GTC GTC TTA CAC	TGG GCT GCT	GTC A A V C GAC GAC
K S A L A A A V N R V E A		
5942	5957	5972
TTC T L A L L C T	AAA ATG	AAT AAG GAC CAC
A G G C C C G A G	R K H G A	R D M D G
5987	6002	6017
ACC AAG GAC GAC ACC	C C C C	GCC C C C C
K E B T P L P A L A B E C S		
6032	6047	6062
GAT GTC GAC AAG	L C C GAC	TTT GAC CTT GAT
E E A A K L L L D H D H A N R E		
6077	6092	6107
T T D N L C	G A C R L P R	GCC GAC CAC CAG
A A T D N L A V A Q E		
6123	6137	6152
ACA CAC CAC CAG CAC	ATG CTT	GTC CTT GAT CAC
L H Q D T V R L L D Q P S G		
6167	6182	6197
ACC CAC CAC CAC	C C C C	CCT CTT TGT
A A S P P G F H Q G L G P L L		

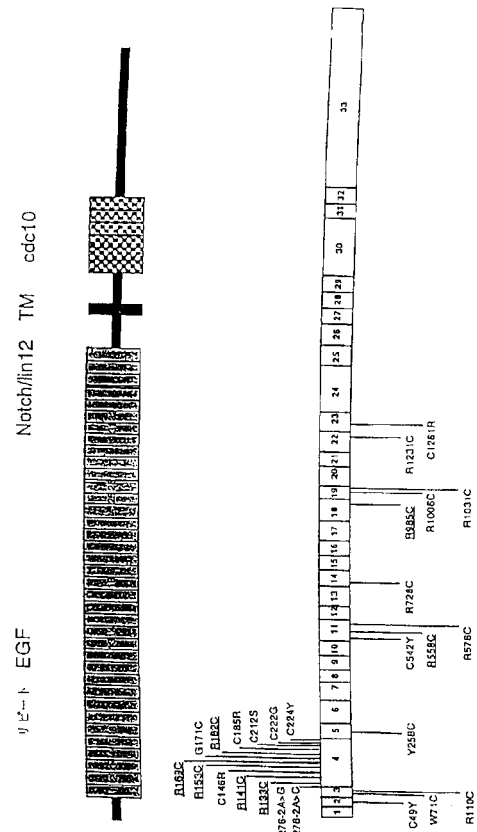
【 図 1 H 】

[illegible][illegible]

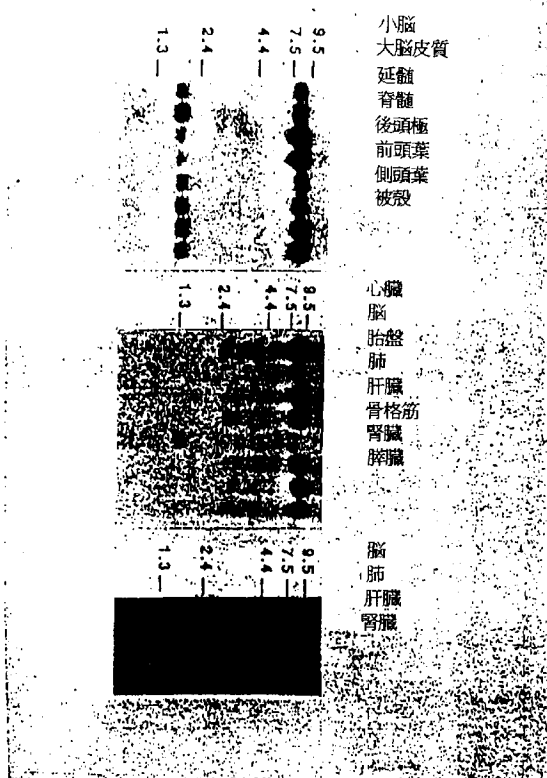
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【手続補正書】

【提出日】平成21年11月2日(2009.11.2)

【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】

下記から選択される単離ヌクレオチド配列：

- a) 図1のヒトNotch3ポリペプチド配列を含んでなるポリペプチドをコードする配列および
b) ヒトNotch3ポリペプチドをコードする図1のcDNAの核酸配列。

【請求項 2】

該配列のNotch3ポリペプチドのEGFドメインの一つにおけるシステイン残基の欠失又は付加による点突然変異を含む前記a)およびb)から選択される配列であって、C49Y、W71C、R110C、R133C、R141C、C146R、R153C、R169C、G171C、R182C、C185R、C212S、C222G、C224Y、Y258C、C542Y、R558C、R578C、R728C、R985C、R1006C、R1031C、R1231C、およびC1261Rからなる突然変異の群から選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の単離ヌクレオチド配列。

【請求項 3】

図 1 の該Notch3ポリペプチドにおけるシステイン残基の欠失又は付加による該点突然変異が、R133C、R141C、C146R、R153C、R169C、R182C、Y258C、R558C、およびR985Cからなる突然変異の群から選択されることを特徴とする、請求項 2 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 4】

請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の配列を含んでなることを特徴とする、ヌクレオチド配列の適切な宿主中でのクローニングまたは発現用ベクター。

【請求項 5】

該宿主中で該配列を発現させることが可能なエレメントを含んでなる、請求項 4 に記載のベクター。

【請求項 6】

自律的に複製するベクターである、請求項 4 または 5 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 7】

染色体組み込みベクターである、請求項 4 または 5 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 8】

ウイルスベクターである、請求項 4 または 5 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 9】

ベクターがアデノウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルスまたはヘルペスウイルスに基づき作製される、請求項 8 に記載のベクター。

【請求項 10】

請求項 4 - 9 のいずれか 1 項に記載のベクターで形質転換した細胞。

【請求項 11】

原核細胞である、請求項 10 に記載の細胞。

【請求項 12】

真核細胞である、請求項 10 に記載の細胞。

【請求項 13】

請求項 10 - 12 のいずれか 1 項に記載の細胞を培養し、次いで産生されたタンパク質を回収する、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の配列によりコードされたタンパク質を生産する方法。

【請求項 14】

請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の核酸配列によりコードされたタンパク質またはポリペプチド。

【請求項 1 5】

C49Y、W71C、R110C、R133C、R141C、C146R、R153C、R169C、G171C、R182C、C185R、C212S、C222G、C224Y、Y258C、C542Y、R558C、R578C、R728C、R985C、R1006C、R1031C、R1231C、およびC1261Rからなる突然変異の群から選択される点突然変異を含む、図 1 の配列を有する請求項 1 4 に記載のタンパク質またはポリペプチド。

【請求項 1 6】

該突然変異がR133C、R141C、C146R、R153C、R169C、R182C、Y258C、R558C、およびR985Cからなる突然変異の群から選択されることを特徴とする、請求項 1 5 に記載のタンパク質またはポリペプチド。

【請求項 1 7】

a) 少なくとも一つの突然変異の生物学的サンプル核酸の存在の有無の決定のため、該生物学的サンプルおよび対照サンプルにおけるNotch3遺伝子に対応する核酸の総てまたは一部を解析し、ここで対照サンプルは図 1 の配列を有するNotch3遺伝子からなり、そして

b) 対照サンプルの核酸と比較して、生物学的サンプルの核酸における一以上の突然変異の存在の有無を決定する、

ことからなる、生物学的サンプルにおける核酸での突然変異の有無を検出する方法。

【請求項 1 8】

患者におけるCADASILの素因の存在の検査方法であって、請求項 1 7 に記載の生物学的サンプルの核酸の存在の有無を決定する方法からなり、該配列のNotch3ポリペプチドのEGFドメインの一つにおけるシステイン残基の欠失又は付加となる少なくとも一つの突然変異の存在がCADASILの存在の危険増加の指標となる、検査方法。

【請求項 1 9】

解析される核酸配列がゲノムDNA、cDNAまたはmRNAである、請求項 1 7 - 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

突然変異の存在がそれに対応する変異していない天然の配列と比較により検出される、請求項 1 7 - 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

該少なくとも一つの突然変異の検出の前に、Notch3遺伝子の核酸配列の総てまたは一部を増幅する、請求項 1 7 - 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

PCRまたはPCR類似法により増幅を行う、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

増幅工程が下記により行われる、請求項 2 1 または 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法：表Bに記載のプライマーまたはその相補的配列のプライマーのいずれか一つの配列からなる少なくとも一つのプライマー、

表AのNotch3遺伝子のイントロン - エキソン結合部の配列、または

図 1 のヒトNotch3ポリペプチド配列からなるポリペプチドをコードする配列の断片またはヒトNotch3ポリペプチドをコードする図 1 のcDNAの核酸配列の断片であって、ここで該断片は少なくとも 10 ヌクレオチド塩基を有し、かつNotch3ポリペプチドのEGFドメインの一つの中にシステイン残基の欠失または付加される該突然変異からなる。

【請求項 2 4】

生物学的サンプルの核酸における一以上の突然変異の有無の決定が配列決定により解析を行う、請求項 1 7 - 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

生物学的サンプルの核酸における一以上の突然変異の有無の決定が電気泳動分離により解析を行う、請求項 1 7 - 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

該電気泳動分離が一本鎖構造多型現象(SSCP)または変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

該方法が、突然変異配列に対して特異的な少なくとも 1 種のオリゴヌクレオチドプローブによるハイブリダイゼーション工程からなる、請求項 17 - 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

生物学的サンプルの核酸における一以上の突然変異の有無の決定が、タンパク質の切断を検出することを意図した方法により解析を行う、請求項 17 - 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

該少なくとも一つの突然変異が核酸における突然変異の群から選択され、該核酸が表 C に記載の突然変異から選択された少なくとも一つの突然変異によって、Notch3ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列からなるポリペプチドからなり、ここで該Notch3ポリペプチドの配列が図 1 において示される、請求項 17 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

該少なくとも一つの突然変異が、C49Y、W71C、R110C、R133C、R141C、C146R、R153C、R169C、G171C、R182C、C185R、C212S、C222G、C224Y、Y258C、C542Y、R558C、R578C、R728C、R985C、R1006C、R1031C、R1231C、およびC1261Rの突然変異の群から選択されるものである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

該少なくとも一つの突然変異が、R133C、R141C、C146R、R153C、R169C、R182C、Y258C、R558C、およびR985Cからなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

患者におけるCADASIL型の状態に対する素因の診断薬であり、下記工程からなることを特徴とする診断薬であって、

a) 該患者からの生物学的サンプルの提供、

b) Notch3ポリペプチドの配列が図 1 において示され、Notch3ポリペプチドのEGFドメインの一つにおけるシステイン残基の欠失または付加の存在を該生物学的サンプルから決定、

検査して決定した突然変異が、C49Y、W71C、R110C、R133C、R141C、C146R、R153C、R169C、G171C、R182C、C185R、C212S、C222G、C224Y、Y258C、C542Y、R558C、R578C、R728C、R985C、R1006C、R1031C、R1231C、およびC1261Rの群から選択される突然変異であることを特徴とする、診断薬。

【請求項 33】

ELISAまたはRIA法により検出を行う、請求項 32 に記載の診断薬。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		C 1 2 P 21/02	C	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/47 (2006.01)		C 0 7 K 14/47		4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/18 (2006.01)		C 0 7 K 16/18		4 C 0 8 7
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02		
A 6 1 K 35/76 (2006.01)		A 6 1 K 35/76		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088		
A 6 1 P 25/06 (2006.01)		A 6 1 P 25/06		
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 25/28		
A 6 1 P 25/12 (2006.01)		A 6 1 P 25/12		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M	
G 0 1 N 27/447 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	S	
		G 0 1 N 27/26	3 1 5 Z	

(71)出願人 500257447

アシスタンス ピュブリック - オピト ド パリ

ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS

フランス、エフ - 7 5 0 0 4 パリ、アベニュー ビクトリア 3

3, avenue Victoria, F - 7 5 0 0 4 Paris, FRANCE

(74)代理人 100075812

弁理士 吉武 賢次

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74)代理人 100143971

弁理士 藤井 宏行

(72)発明者 エリザベス、トゥルニエ - ラセルブ

フランス国パリ、リュ、ド、シプリ、9

(72)発明者 アンヌ、ジュテル

フランス国パリ、ブルバール、サン - マルセル、16

(72)発明者 マリ - ジェルメンヌ、ブーセ

フランス国パリ、アブニュー、ルネ、コティ、54

(72)発明者 ジャン - フランソワ、パーシュ

フランス国パリ、リュ、ド、グルネル、180

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA43 CA04 CA20 EA02

4B063 QA01 QQ42 QR08 QR62 QS25

4B064 AG01 AG26 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA44 CA53 NA14 ZA022 ZA062 ZA082

ZA152

4C085 AA14 BB11 CC02 CC23 DD62 DD63 DD88 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA06 ZA08

ZA15

4C087	AA01	AA02	BC83	CA12	NA14	ZA02	ZA06	ZA08	ZA15
4H045	AA11	AA30	BA10	CA40	DA75	EA20	FA74		

专利名称(译)	基因参与CADASIL，诊断方法和治疗应用		
公开(公告)号	JP2010042012A	公开(公告)日	2010-02-25
申请号	JP2009230857	申请日	2009-10-02
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	研究所，国家，德，拉，城主，D，德，拉，RECHERCHE，医疗（安瑟伦） 芦苇的立场ピュブリック-オピト德巴黎		
[标]发明人	エリザベストウルニエラセルブ アンヌジュテル マリジェルメンヌブーセ ジャンフランソワバーシュ		
发明人	エリザベス、トウルニエ-ラセルブ アンヌ、ジュテル マリ-ジェルメンヌ、ブーセ ジャン-フランソワ、バーシュ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 A61K38/00 A61K35/76 A61K48/00 A61K39/395 A61K31/7088 A61P25/06 A61P25/28 A61P25/12 G01N33/53 G01N27/447 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/14 C07K14/705 C07K16/28 C12N15/12 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/06 A61P25/12 A61P25/14 A61P25/28 C07K14/70567		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A A61K37/02 A61K35/76 A61K48/00 A61K39/395.N A61K31/7088 A61P25/06 A61P25/28 A61P25/12 G01N33/53.M G01N33/53.S G01N27/26.315.Z A61K35/761 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10 G01N27/447.315.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/EA02 4B063 /QA01 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065 /CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA062 4C084/ZA082 4C084/ZA152 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA06 4C086/ZA08 4C086/ZA15 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087 /NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA06 4C087/ZA08 4C087/ZA15 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi 藤井裕之		
优先权	1996009733 1996-08-01 FR 1997004680 1997-04-16 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：在CANDASIL中提供Notch3蛋白和编码Notch3蛋白的核酸，该核酸能够诊断和治疗神经病的易感性，尤其是CADASIL。 解决方案：编码人Notch3蛋白及其等位基因变体的核苷酸序列，编码这些蛋白片段并具有至少10个碱基的特定核苷酸序列，人Notch3基因组序列及其等位基因，至少 分离的核酸选自具有80%，优选至少90%的同源性的特定碱基序列，具有至少10

个碱基的特定碱基序列或其片段以及与该特定碱基序列杂交的碱基序列。[选择图]无