

【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10月19日(2006.10.19)

【公表番号】特表2003-527822(P2003-527822A)  
 【公表日】平成15年9月24日(2003.9.24)  
 【出願番号】特願2000-567712(P2000-567712)  
 【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**  
**A 6 1 P 17/06 (2006.01)**  
**A 6 1 P 27/02 (2006.01)**  
**A 6 1 P 35/00 (2006.01)**  
**A 6 1 P 43/00 (2006.01)**  
**C 1 2 N 1/15 (2006.01)**  
**C 1 2 N 1/19 (2006.01)**  
**C 1 2 N 1/21 (2006.01)**  
**C 1 2 N 9/88 (2006.01)**  
**C 1 2 Q 1/527 (2006.01)**  
**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)**  
**C 1 2 N 5/10 (2006.01)**  
**A 6 1 K 38/51 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 A 6 1 P 17/06  
 A 6 1 P 27/02  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 43/00 1 0 5  
 C 1 2 N 1/15  
 C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 9/88  
 C 1 2 Q 1/527  
 C 1 2 Q 1/68 A  
 C 1 2 N 5/00 A  
 A 6 1 K 37/56

【手続補正書】

【提出日】平成18年8月24日(2006.8.24)

【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】 実質的に純粋なヘパリナーゼであって：

変更された生成物プロフィールを有する変更されたヘパリナーゼIIを含み、ここで該変更されたヘパリナーゼIIの該変更された生成物プロフィールが、ネイティブなヘパリナーゼIIのネイティブ生成物プロフィールとは少なくとも10%異なる、ヘパリナーゼ。

【請求項2】 前記変更されたヘパリナーゼIIが、ネイティブなヘパリナーゼII

のネイティブ生成物プロフィールとは少なくとも50%異なる変更された生成物プロフィールを有する、請求項1に記載のヘパリナーゼ。

【請求項3】 前記変更されたヘパリナーゼIIが、ネイティブなヘパリナーゼIIのネイティブ生成物プロフィールとは少なくとも20%異なる変更された生成物プロフィールを有する、請求項1に記載のヘパリナーゼ。

【請求項4】 前記変更された生成物プロフィールがヘパリンに関して変更されている、請求項1に記載のヘパリナーゼ。

【請求項5】 前記変更された生成物プロフィールがヘパラン硫酸に関して変更されている、請求項1に記載のヘパリナーゼ。

【請求項6】 請求項1に記載の実質的に純粋なヘパリナーゼの滅菌処方物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的調製物。

【請求項7】 固定化された実質的に純粋な変更されたヘパリナーゼIIであって：請求項1に記載の変更されたヘパリナーゼII、および固体支持体膜、とを含み、ここで該変更されたヘパリナーゼIIが、該固体支持体膜上に固定化されている、ヘパリナーゼII。

【請求項8】 実質的に純粋なヘパリナーゼであって：変更されたヘパリナーゼII  $k_{cat}$  値を有する、グリコサミノグリカン基質を切断し得る変更されたヘパリナーゼIIを含み、ここで該変更されたヘパリナーゼII  $k_{cat}$  値は、ネイティブなヘパリナーゼII  $k_{cat}$  値とは少なくとも10%異なる、ヘパリナーゼ。

【請求項9】 前記変更されたヘパリナーゼII  $k_{cat}$  値がネイティブなヘパリナーゼII  $k_{cat}$  値とは少なくとも20%異なる、請求項8に記載のヘパリナーゼ。

【請求項10】 前記変更されたヘパリナーゼII  $k_{cat}$  値がネイティブなヘパリナーゼII  $k_{cat}$  値とは少なくとも50%異なる、請求項8に記載のヘパリナーゼ。

【請求項11】 前記変更されたヘパリナーゼIIが、ヘパリンに関して減少した酵素活性を有する、請求項8に記載のヘパリナーゼ。

【請求項12】 前記変更されたヘパリナーゼIIが、ヘパラン硫酸に関して減少した酵素活性を有する、請求項8に記載のヘパリナーゼ。

【請求項13】 前記変更されたヘパリナーゼIIが配列番号2に記載の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有し、少なくとも1つのアミノ酸残基が置換されており、そして該置換が以下：(a) 配列番号2の348位に対応するシステイン残基の、アラニン、セリン、チロシン、ヒスチジン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基での置換；(b) 配列番号2の238位、440位、451位、および579位の少なくとも1つに対応するヒスチジン残基の、アラニン、セリン、チロシン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基での置換；ならびに(c) 配列番号2の446位~451位に対応するヘパリン結合配列の保存性置換、からなる群より選択される、請求項8に記載のヘパリナーゼ。

【請求項14】 前記変更されたヘパリナーゼIIが、配列番号2に記載の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有し、配列番号2の348位に対応するシステイン残基が、アラニン、セリン、チロシン、ヒスチジン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基で置換された、請求項13に記載のヘパリナーゼ。

【請求項15】 前記システイン残基がアラニンで置換されている、請求項14に記載のヘパリナーゼ。

【請求項16】 前記変更されたヘパリナーゼIIが、配列番号2に記載の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有し、配列番号2の440位に対応するヒスチジン残基が、アラニン、セリン、チロシン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基で置換された、請求項13に記載のヘパリナーゼ。

【請求項17】 前記ヒスチジン残基がアラニンで置換されている、請求項16に記載のヘパリナーゼ。

【請求項18】 請求項8に記載の実質的に純粋なヘパリナーゼの滅菌処方物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的調製物。

【請求項 19】 固定化された実質的に純粋な改変されたヘパリナーゼ I I であって：

請求項 8 に記載の改変されたヘパリナーゼ I I、および  
固体支持体膜、とを含み、ここで該改変されたヘパリナーゼ I I が、該固体支持体膜上に固定化されている、ヘパリナーゼ I I。

【請求項 20】 前記改変されたヘパリナーゼ I I が、ヘパラン硫酸に関してネイティブなヘパリナーゼと実質的に同じ酵素活性を有する、請求項 11 に記載のヘパリナーゼ。

【請求項 21】 前記改変されたヘパリナーゼ I I が、ヘパリンに関してネイティブなヘパリナーゼと実質的に同じ酵素活性を有する、請求項 12 に記載のヘパリナーゼ。

【請求項 22】 実質的に純粋なヘパリナーゼであって：

改変されたヘパリナーゼ I を含み、ここで該改変されたヘパリナーゼ I は、カルシウムの存在に依存しない酵素活性を有する、ヘパリナーゼ。

【請求項 23】 前記改変されたヘパリナーゼ I が、ネイティブなヘパリナーゼ I  $k_{cat}$  値とは少なくとも 10% 異なる、改変されたヘパリナーゼ I  $k_{cat}$  値を有する、請求項 22 に記載のヘパリナーゼ。

【請求項 24】 前記改変されたヘパリナーゼ I が、ネイティブなヘパリナーゼ I  $k_{cat}$  値とは少なくとも 20% 異なる、改変されたヘパリナーゼ I  $k_{cat}$  値を有する、請求項 22 に記載のヘパリナーゼ。

【請求項 25】 前記改変されたヘパリナーゼ I が、ネイティブなヘパリナーゼ I  $k_{cat}$  値とは少なくとも 50% 異なる、改変されたヘパリナーゼ I  $k_{cat}$  値を有する、請求項 22 に記載のヘパリナーゼ。

【請求項 26】 前記改変されたヘパリナーゼ I が、配列番号 4 に記載の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有し、少なくとも 1 つのアミノ酸残基が改変されており、そして該置換が、配列番号 4 の 377 位に対応するセリン残基の、アラニン、セリン、チロシン、ヒスチジン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基での置換である、請求項 22 に記載のヘパリナーゼ。

【請求項 27】 前記セリン残基がアラニンで置換されている、請求項 26 に記載のヘパリナーゼ。

【請求項 28】 請求項 22 に記載の実質的に純粋なヘパリナーゼの滅菌処方物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的調製物。

【請求項 29】 固定化された実質的に純粋な改変されたヘパリナーゼ I であって：

請求項 22 に記載の改変されたヘパリナーゼ I、および  
固体支持体膜、とを含み、ここで該改変されたヘパリナーゼ I が、該固体支持体膜上に固定化されている、ヘパリナーゼ I。

【請求項 30】 実質的に純粋なヘパリナーゼであって：

配列番号 2 の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有する改変されたヘパリナーゼ I I、  
を含み、ここで少なくとも 1 つのアミノ酸残基が置換されており、そして該置換は、48  
位、164 位、189 位、202 位、238 位、249 位、252 位、347 位、348  
位、406 位、408 位、440 位、473 位、579 位、682 位、または残基 446  
～451 のうちの 1 つに対応する残基の置換である、実質的に純粋なヘパリナーゼ。

【請求項 31】 実質的に純粋なヘパリナーゼであって：

配列番号 4 の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有する改変されたヘパリナーゼ I、  
を含み、ここで少なくとも 1 つのアミノ酸残基が置換されており、そして該置換は、13  
5 位、または残基 196～221 もしくは残基 372～384 のうちの 1 つに対応する残  
基の置換である、実質的に純粋なヘパリナーゼ I。

【請求項 32】 ヘパリン様グリコサミノグリカンを特異的に切断するための組成物であって、請求項 1、8、22、30 または 31 のいずれか 1 項に記載のヘパリナーゼを含み、ここで該組成物は、ヘパリン様グリコサミノグリカンとの接触に適している、組成物。

【請求項 3 3】 前記ヘパリン様グリコサミノグリカンは、改変されたヘパリナーゼ I I との接触に適しており、ここで該改変されたヘパリナーゼ I I が、配列番号 2 に記載の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有し、配列番号 2 の 4 4 0 位に対応するヒスチジン残基が、ヘパリン様グリコサミノグリカンを特異的に切断するように、アラニン、セリン、チロシン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基で置換されている、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 4】 前記ヘパリン様グリコサミノグリカンは、改変されたヘパリナーゼ I との接触に適しており、ここで該改変されたヘパリナーゼ I が、配列番号 4 に記載の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有し、ここで少なくとも 1 つのアミノ酸残基が置換されており、そして該置換が、配列番号 4 の 3 7 7 位に対応するセリン残基の、アラニン、セリン、チロシン、ヒスチジン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基での置換である、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 5】 前記組成物が、ヘパリン含有液から活性ヘパリンを取り除くための組成物である、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 6】 前記ヘパリナーゼが固体支持体上に固定化される、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】 前記組成物が、血管形成を阻害するための組成物であり、そして前記ヘパリナーゼの血管形成を阻害するために有効な量が、その処置を必要とする被験体への投与に適している、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 8】 前記ヘパリナーゼが腫瘍への投与に適している、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 3 9】 前記ヘパリナーゼが、生分解可能な生体適合性ポリマー送達デバイス中での投与に適している、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 0】 前記ヘパリナーゼが、注射のための薬学的に受容可能なビヒクル中での投与に適している、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 1】 前記ヘパリナーゼが、腫瘍の中に成長している血管の数を減少させるための有効量での投与に適している、請求項 3 9 または 4 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 2】 前記ヘパリナーゼが、眼への局所適用のための薬学的に受容可能なビヒクル中での投与に適している、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 3】 前記ヘパリナーゼが、異常な新生血管形成によって特徴付けられる眼の疾患の症状を減少させるための有効量での投与に適している、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 4 4】 前記ヘパリナーゼが、局所適用のために適切な薬学的ビヒクル中での投与に適している、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 5】 前記ヘパリナーゼが、乾癬の症状を減少させるために有効な量での投与に適している、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】 血管形成を阻害するために有効な量が、約 1  $\mu$ g と 4  $\mu$ g との間のヘパリナーゼ、または 1 0 nM と 1 0 0 nM との間のヘパリナーゼの濃度である、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 7】 前記組成物がヘパリンを配列決定するための組成物である、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 4 8】 ヘパラン硫酸様グリコサミノグリカンを特異的に切断するための組成物であって：

請求項 1、8、3 0 または 3 1 のいずれか 1 項に記載のヘパリナーゼを含み、ここで該組成物は、ヘパラン硫酸含有液との接触に適している、組成物。

【請求項 4 9】 前記組成物が、ヘパラン硫酸含有液から活性なヘパラン硫酸を取り除くための組成物である、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 0】 前記ヘパリナーゼが固体支持体に固定化されている、請求項 4 9 に記載の組成物。

【請求項 5 1】 前記ヘパラン硫酸様グリコサミノグリカンは、実質的に純粋な改変されたヘパリナーゼ I I との接触に適しており、ここで該改変されたヘパリナーゼ I I が、配列番号 2 に記載の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有し、ここで配列番号 2 の 3 4 8 位に対応するシステイン残基が、ヘパリン硫酸様グリコサミノグリカンを特異的に切断するように、アラニン、セリン、チロシン、ヒスチジン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基で置換されている、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 2】 前記組成物が細胞増殖を阻害するための組成物である、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 3】 前記組成物がヘパラン硫酸を配列決定するための組成物である、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 4】 実質的に純粋なヘパリナーゼであって：

配列番号 2 の成熟ペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、ここで少なくとも 1 つのアミノ酸残基が置換されており、そして該置換が以下：( a ) 配列番号 2 の 3 4 8 位に対応するシステイン残基の、アラニン、セリン、チロシン、ヒスチジン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基での置換；( b ) 配列番号 2 の 4 4 0 位に対応するヒスチジン残基の、アラニン、セリン、チロシン、スレオニン、およびリジンからなる群より選択される残基での置換；ならびに( c ) 配列番号 2 の 4 4 6 位～4 5 1 位に対応するヘパリン結合配列からなる保存性置換、からなる群より選択される、ヘパリナーゼ。

【請求項 5 5】 請求項 5 4 に記載のヘパリナーゼの滅菌処方物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的調製物。

【請求項 5 6】 固定化された実質的に純粋な改変されたヘパリナーゼ I I であって：

請求項 5 4 に記載のヘパリナーゼ、および

固体支持体膜、とを含み、ここで該ヘパリナーゼが、該固体支持体膜上に固定化されている、ヘパリナーゼ I I。

【請求項 5 7】 単離された核酸であって、

( a ) 請求項 5 4 に記載の実質的に純粋なヘパリナーゼをコードする、単離された核酸；

( b ) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号 1 に記載の核酸もしくは配列番号 1 に記載の核酸の相補物に対してハイブリダイズし、かつ請求項 5 4 に記載の改変されたヘパリナーゼをコードするように改変される、核酸；および

( c ) 遺伝コードの縮重に起因して、コドン配列において( b ) の核酸とは異なる、核酸、を含む、核酸。

【請求項 5 8】 請求項 5 7 に記載される単離された核酸を含む、組換え宿主細胞。

【請求項 5 9】 請求項 5 7 に記載される単離された核酸を含む、発現ベクター。