

【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 11 月 30 日 (2006.11.30)

【公表番号】特表 2002-536018 (P2002-536018A)

【公表日】平成 14 年 10 月 29 日 (2002.10.29)

【出願番号】特願 2000-598639 (P2000-598639)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 9/10 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/04 (2006.01)

A 6 1 P 3/06 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

C 0 7 K 14/575 (2006.01)

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 38/22 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 R 1/91 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 9/10

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 3/06

A 6 1 P 3/10

C 0 7 K 14/575

C 0 7 K 16/18

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 5/00 B

A 6 1 K 37/24

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:91

C 1 2 N 5/00 B

C 1 2 R 1:91

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 R 1:91

【手続補正書】

【提出日】平成 18 年 10 月 10 日 (2006.10.10)

【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】 配列番号 2 の天然グリコシル化ヒトレプチン (r H u - レプチン 1 ~ 1 4 5) のものより大きいストークス半径を有するグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 2】 ゲル濾過によって測定して、30 以上のストークス半径を有するグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 3】 グリコシル化レプチン蛋白調製物であって、該製造物中の各グリコシル化レプチン蛋白分子が 5 以上のシアル酸部分を有するグリコシル化レプチン蛋白調製物。

【請求項 4】 前記調製物中の各グリコシル化レプチン蛋白分子が 8 ~ 20 のシアル酸残基を有する請求項 3 に記載のグリコシル化レプチン蛋白調製物。

【請求項 5】 1 以上の別のグリコシル化部位を有するよう変更された配列番号 1 または 2 のヒトレプチンを含むグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 6】 下記のもの (「T / S」はトレオニンまたはセリンを示す)

(a) 0 1 V N 0 2 P X (X はプロリン以外のアミノ酸である) 0 3 I T / S

(b) 0 2 P N 0 3 I 0 4 Q T / S

(c) 2 3 D N 2 4 I 2 5 S T / S

(d) 4 7 P N 4 8 I 4 9 L T / S

(e) 4 8 I N 4 9 L 5 0 T / S

(f) 6 9 P N 7 0 S 7 1 R T / S

(g) 9 2 F N 9 3 S 9 4 K T / S

(h) 1 0 1 A N 1 0 2 S 1 0 3 G T / S

(i) 1 0 2 S N 1 0 3 G 1 0 4 L T / S

(j) 1 0 3 G N 1 0 4 L 1 0 5 E T / S

から選択されるグリコシル化部位として 1 以上の配列変化を有する配列番号 1 を有するグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 7】 (配列番号 1 の番号割り付けに関して) 4、8、23、44、47、48、69、70、92、93、97、100、101、102、103、118 および 141 から選択される位置にグリコシル化部位を有する配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 146 を有するグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 8】 2 つのグリコシル化部位を有し、その 2 つの部位が (配列番号 1 の番号割り付けに関して)

47 + 69、

48 + 69、

69 + 101、

69 + 102、

69 + 103、

69 + 118 および

100 + 102

から選択されるものである配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 146 を有するグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 9】 3 つのグリコシル化部位を有し、その 3 つの部位が (配列番号 1 の番号割り付けに関して)

2 + 47 + 69、

23 + 47 + 69、

47 + 69 + 100、

47 + 69 + 102、

48 + 69 + 118、

69 + 102 + 118 および

69 + 103 + 118

から選択されるものである配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 146 を有するグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 10】 4 つのグリコシル化部位を有し、その 4 つの部位が (配列番号 1 の番号割り付けに関して)

2 + 47 + 69 + 92、

2 + 47 + 69 + 102、

23 + 47 + 69 + 92、

23 + 47 + 69 + 102 および

47 + 69 + 100 + 102

から選択されるものである配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 146 を有するグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 11】 5 つのグリコシル化部位を有し、その 5 つの部位が (配列番号 1 の番号割り付けに関して)

2 + 23 + 47 + 69 + 92、

2 + 47 + 69 + 92 + 102、

23 + 47 + 69 + 92 + 102

から選択されるものである配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 146 を有するグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 12】 下記のアミノ酸配列 (配列番号 26) を有するグリコシル化レプチン 2、47、69。

【化 1】

```
1 VNITKVQDDT KTLIKTIIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT
51 LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL AFSK SCHLPW
101 ASGLETLDL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC
```

【請求項 13】 下記のアミノ酸配列 (配列番号 28) を有するグリコシル化レプチン 2、47、69、92。

【化 2】

```
1 VNITKVQDDT KTLIKTIIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT
51 LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL ANST SCHLPW
101 ASGLETLDL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC
```

【請求項 14】 下記のアミノ酸配列 (配列番号 30) を有するグリコシル化レプチン 2、47、69、102。

【化 3】

```
1 VNITKVQDDT KTLIKTIIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT
51 LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL AFSK SCHLPW
101 ANGTELDL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC
```

【請求項 15】 下記のアミノ酸配列 (配列番号 32) を有するグリコシル化レプチン 47、69、102。

【化 4】

1 VPIQKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT
51 LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL AFSKSLHLPW
101 ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

【請求項 16】 下記のアミノ酸配列（配列番号 34）を有するグリコシル化レプチン 2、47、69、92、102。

【化 5】

1 VNITKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT
51 LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL ANSTSLHLPW
101 ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

【請求項 17】 下記のアミノ酸配列（配列番号 36）を有するグリコシル化レプチン 47、69、92、102。

【化 6】

1 VPIQKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQKVTGLD FIPGLHNITT
51 LSKMDQTLAV YQQILTSMNS TNVIQISNDL ENLRDLLHVL ANSTSLHLPW
101 ANGTETLDSL GGVLEASGYS TEVVALSRLQ GSLQDMLWQL DLSPGC

【請求項 18】

- 1 位がセリン、アルギニン、プロリンまたはアラニン残基、
- 1 位がセリンおよび - 2 位がプロリン、
- 1、- 2 および - 3 位がセリン - プロリン - セリン配列、
- 1 位がセリンおよび - 2 位がアルギニン、
- 1 位がセリン、- 2 位がアルギニンおよび - 3 位がセリン、
- 1 位がアルギニンおよび - 2 位がセリン、ならびに
- 1 位がアラニンおよび - 2 位がプロリン

から選択される N - 末端残基配列を有する請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のグリコシル化レプチン蛋白。

【請求項 19】 請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のグリコシル化レプチン蛋白をコードする核酸。

【請求項 20】 下記の核酸配列（配列番号 25）を有するグリコシル化レプチン 2、47、69 をコードする核酸。

【化 7】

1 GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCTCA TCAAGACAAT
51 TGTACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
201 TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCTTCTCTA AGAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAGTGGCC TGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTAAGCC CTGGGTGC

【請求項 2 1】 下記の核酸配列（配列番号 2 7）を有するグリコシル化レプチン 2、4 7、6 9、9 2 をコードする核酸。

【化 8】

1 GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCTCA TCAAGACAAT
51 TGTACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
201 TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCAACTCTA CCAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAGTGGCC TGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

【請求項 2 2】 下記の核酸配列（配列番号 2 9）を有するグリコシル化レプチン 2、4 7、6 9、1 0 2 をコードする核酸。

【化 9】

1 GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCTCA TCAAGACAAT
51 TGTACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCTCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
201 TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCTTCTCTA AGAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

【請求項 2 3】 下記の核酸配列（配列番号 3 1）を有するグリコシル化レプチン 4

7、69、102をコードする核酸。

【化10】

```
1  GTGCCCATCC AAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCTCA TCAAGACAAT
    51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
   101  AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
   151  TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
   201  TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
   251  GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCTTCTCTA AGAGCTGCCA CTTGCCCTGG
   301  GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
   351  AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
   401  AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC
```

【請求項24】 下記の核酸配列（配列番号33）を有するグリコシル化レプチン2、47、69、102をコードする核酸。

【化11】

```
1  GTGAACATCA CAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCTCA TCAAGACAAT
    51  TGTCACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
   101  AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
   151  TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
   201  TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
   251  GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCAACTCTA CCAGCTGCCA CTTGCCCTGG
   301  GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
   351  AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
   401  AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC
```

【請求項25】 下記の核酸配列（配列番号35）を有するグリコシル化レプチン47、69、92、102をコードする核酸。

【化12】

1 GTGCCCATCC AAAAAGTCCA AGATGACACC AAAACCCTCA TCAAGACAAT
51 TGTCAACCAGG ATCAATGACA TTTCACACAC GCAGTCAGTC TCCTCCAAAC
101 AGAAAGTCAC CGGTTTGGAC TTCATTCCCTG GGCTCCACAA CATCACGACC
151 TTATCCAAGA TGGACCAGAC ACTGGCAGTC TACCAACAGA TCCTCACCAG
201 TATGAATTCC ACAAACGTGA TCCAAATATC CAACGACCTG GAGAACCTCC
251 GGGATCTTCT TCACGTGCTG GCCAACTCTA CCAGCTGCCA CTTGCCCTGG
301 GCCAATGGCA CGGAGACCTT GGACAGCCTG GGGGGTGTCC TGGAAGCTTC
351 AGGCTACTCC ACAGAGGTGG TGGCCCTGAG CAGGCTGCAG GGGTCTCTGC
401 AGGACATGCT GTGGCAGCTG GACCTCAGCC CTGGGTGC

【請求項 26】 請求項 19 ないし 25 のいずれかに記載のグリコシル化レプチン蛋白をコードする核酸を含むベクター。

【請求項 27】 発現ベクターである請求項 26 に記載のベクター。

【請求項 28】 請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のグリコシル化レプチン蛋白をコードする核酸を含む宿主細胞。

【請求項 29】 原核細胞および真核細胞から選択される請求項 28 に記載の宿主細胞。

【請求項 30】 細菌細胞である請求項 29 に記載の原核宿主細胞。

【請求項 31】 哺乳動物細胞、酵母細胞および昆虫細胞から選択される請求項 29 に記載の真核宿主細胞。

【請求項 32】 ヒト細胞、サル細胞、BHK細胞およびCHO細胞から選択される請求項 31 に記載の哺乳動物宿主細胞。

【請求項 33】

(a) 発現に好適な条件下に前記グリコシル化レプチン蛋白をコードする核酸を含む細胞を培養する段階、ならびに

(b) 前記蛋白を得る段階を有してなる請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の蛋白の製造方法。

【請求項 34】 非経口注射、静脈注射、皮下注射、硬膜内投与、経鼻投与、肺投与および浸透圧ポンプ投与用の医薬組成物であって、医薬的に許容される担体中に請求項 1 ないし 18 のいずれかに記載のグリコシル化蛋白を含む医薬組成物。

【請求項 35】 肥満、糖尿病および高血中脂質含有量効果から選択される状態に関してヒトを治療するための医薬組成物であって、

治療上有効量の請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のグリコシル化ヒトレプチンを含む、前記組成物。

【請求項 36】 肥満、糖尿病および高血中脂質含有量効果から選択される状態に関してヒトを、治療上有効量のグリコシル化ヒトレプチンを用いて治療するための医薬組成物であって、請求項 19 ないし 25 のいずれかに記載の核酸を含む、前記組成物。

【請求項 37】 請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のグリコシル化レプチン蛋白に対して選択的である選択的結合分子。

【請求項 38】 ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および組換え抗体から選択される請求項 37 に記載の選択的結合分子。

【請求項 39】 グリコシル化レプチン蛋白の製造方法において、

(a) 発現に好適な条件下に、5' から 3' の方向で (i) 信号ペプチドおよび (ii) グリコシル化レプチン蛋白をコードする DNA をコードする DNA 配列を有する宿主細胞を培養する段階、ならびに

(b) 前記グリコシル化レプチン蛋白を取得する段階を有することを特徴とする方法。

【請求項 40】 前記信号ペプチドが【化 13】

a) (SEQ. ID NO: 3) (native human leptin signal peptide) MHWGTLGFLWLWPYLFYVQA

(b) (SEQ. ID NO: 4) (modified human leptin signal peptide) MHWGTLGFLWLWPYLFYVSPS

(c) (SEQ. ID NO: 5) (modified human leptin signal peptide) MHWGTLGFLWLWPYLFYVSP

(d) (SEQ. ID NO: 6) (modified human leptin signal peptide) MHWGTLGFLWLWPYLFYVSPA

(e) (SEQ. ID NO: 7) (modified human leptin signal peptide) MHWGTLGFLWLWPYLFYVSNS

(f) (SEQ. ID NO: 8) (native human tPA signal peptide) MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS

(g) (SEQ. ID NO: 9) (native human tPA signal peptide) MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP

(h) (SEQ. ID NO: 10) (modified tPA signal peptide) MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSNS

(i) (SEQ. ID NO: 11) (modified tPA signal peptide) MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPA

(j) (SEQ. ID NO: 12) (Leptin/tPA signal peptide) MHWGTLCCVLLLCGAVFVSPS

(k) (SEQ. ID NO: 13) (Leptin/tPA signal peptide) MHWGTLCCVLLLCGAVFVSP

から選択される請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】 前記信号ペプチドがエリトロポイエチン、因子 V I I I、 γ -インターフェロン、血清アルブミン、インシュリン、フォンウィルブラント因子、C D 1 1、I g G、フォリスタチン、固有因子、G - C S F、セルロプラスミンおよび L A M P - 1 から選択される請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】 グリコシル化蛋白の改良された製造方法であって、

(a) 発現およびグリコシル化に好適な条件下に、5' から 3' の方向で (i) 信号ペプチドおよび (i i) グリコシル化蛋白をコードする D N A をコードする D N A 配列を有する宿主細胞を培養する段階、ならびに

(b) 前記グリコシル化蛋白を取得する段階を有し、前記改良が、グリコシル化効率について至適化されたペプチダーゼ開裂部位を有する信号ペプチドの使用を含む方法。

【請求項 43】 前記ペプチダーゼ開裂部位が S P S、S P、S N S および S P A から選択される請求項 42 の改良された方法。

【請求項 44】 前駆配列の使用が含まれていても良い請求項 39 または 42 に記載の方法。

【請求項 4 5】 非天然ペプチダーゼ開裂部位を有する信号ペプチドをコードする核酸。

【請求項 4 6】 非天然ペプチダーゼ開裂部位を有する信号ペプチドをコードする核酸を含むベクター。

【請求項 4 7】 発現ベクターである請求項 4 6 に記載のベクター。

【請求項 4 8】 非天然ペプチダーゼ開裂部位を有する信号ペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞。

【請求項 4 9】 原核細胞および真核細胞から選択される請求項 4 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 0】 細菌細胞である請求項 4 9 の原核宿主細胞。

【請求項 5 1】 哺乳動物細胞、酵母細胞および昆虫細胞から選択される請求項 4 9 に記載の真核宿主細胞。

【請求項 5 2】 ヒト細胞、サル細胞、BHK細胞およびCHO細胞から選択される請求項 5 1 に記載の哺乳動物宿主細胞。