

【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19年7月26日(2007.7.26)

【公表番号】特表2007-505643(P2007-505643A)

【公表日】平成19年3月15日(2007.3.15)

【年通号数】公開・登録公報2007-010

【出願番号】特願2006-533432(P2006-533432)

【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (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 5/10 (2006.01)**  
**C 1 2 P 21/02 (2006.01)**  
**C 0 7 K 14/47 (2006.01)**  
**C 0 7 K 19/00 (2006.01)**  
**A 6 1 K 38/00 (2006.01)**  
**A 6 1 P 43/00 (2006.01)**  
**A 6 1 K 39/00 (2006.01)**  
**A 6 1 K 39/395 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 N	5/00	B
C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	19/00	
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K	39/395	V
A 6 1 K	39/395	Y

【手続補正書】

【提出日】平成19年6月7日(2007.6.7)

【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】

S E Q I D N O : 1である配列

Xaa<sub>1</sub>-Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-  
 Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-  
 Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-

Val-Val-Asp-Val-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Phe-Xaa<sub>80</sub>-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Gly-Xaa<sub>230</sub> (SEQ ID NO:1)

(ここで、

位置 1 の X a a は、A l a であるか、存在しない、

位置 1 6 の X a a は、P r o または G l u であり、

位置 1 7 の X a a は、P h e、V a l または A l a であり、

位置 1 8 の X a a は、L e u、G l u または A l a であり、

位置 8 0 の X a a は、A s n または A l a であり、

位置 2 3 0 の X a a は、L y s であるか、存在しない)

を含む免疫グロブリンの F c 部分に融合した治療用活性ペプチドを含む非相同融合蛋白質。

【請求項 2】

a) Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:2)、

b) Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:4)、

c) Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:6)、

d) Asp-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Asp-Ala-Ala-Ala-Arg-Glu-Ala-Ala-Ala-Ala-Arg-Asp-Ala-Ala-Ala-Lys (SEQ ID NO:7)、

e) Asn-Val-Asp-His-Lys-Pro-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Arg (SEQ ID NO:8)

からなる群から選択される配列を含むペプチド・リンカーを介し、治療用活性ペプチドの C 末端アミノ酸が F c 部分の N 末端アラニン残基と融合している、請求項 1 記載の非相同融合蛋白質。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の非相同融合蛋白質を含有する、医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

本発明は、治療用活性ペプチドおよび治療用活性ペプチドのインビボ半減期を長くする効果を有する免疫グロブリンの定常 H 鎖 (F c) 部分を含む非相同融合蛋白質に関する。これらの非相同融合タンパク質は、ヒトの疾患ならびに多様な症状または疾患を処置するために使用され得る。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0011】

ヒトの免疫グロブリンは5種類あり、それぞれ異なるエフェクター機能と薬物動態特性を有している。IgGは5種類のうち最も安定しており、ヒト血清の半減期は約23日である。IgGには4種類のサブクラス（G1、G2、G3、およびG4）があり、それぞれエフェクター機能と呼ばれる異なる生物機能を有している。こういうエフェクター機能は通常Fcガンマ受容体（FcR）との相互作用を通して仲介される。または免疫グロブリンGまたは免疫グロブリンMのH鎖を認識し、それと結合して、古典的補体活性化経路を開始する補体1（C1q）の亜成分と結合することにより仲介される。FcRとの結合は抗体依存細胞仲介で細胞を溶解する場合があります、補体因子との結合は補体仲介で細胞を溶解する場合があります。非相同融合蛋白質をデザインするにあたり、半減期を長くする機能のためだけにFc部分を利用する場合、エフェクター機能を抑えることが重要である。従って、本発明の非相同融合蛋白質は、FcRおよび補体因子との結合能力がIgGの他の亜型と比べて低いIgG4Fc部位に由来する。しかしIgG4はヒトの標的細胞を枯渇させることが証明されている[アイザックス(Issacs)等, Clin. Exp. Immunol. 106: 427-433 (1996)]。本発明の非相同融合蛋白質は体内の種々の器官の細胞を標的にするので、非相同融合蛋白質にIgG4由来の部位を使用すれば、非相同融合蛋白質と標的細胞に存在する受容体との相互作用を通して、細胞に対する免疫反応が始まる場合がある。従って、本発明の非相同融合蛋白質の一部であるIgG4Fc部位には、エフェクター機能を排除する置換が含まれている。本発明の非相同融合蛋白質のIgG4Fc部分は、残基233のグルタミン酸塩をプロリンで置換、残基234のフェニルアラニンをアラニンまたはバリンで置換、および残基235のロイシンをアラニンまたはグルタミン酸塩で置換（EU番号付け、カバット(Kabat)、E.A.等(1991)免疫学的関心の蛋白質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第5版、米国保健福祉省、メリーランド州ベテスダ(Bethesda, MD)、NIH出版番号91-3242)、の1つまたはそれ以上を含んでいる場合がある。こういう残基はSEQ ID NO: 1の位置16、17、および18に対応している。更に、SEQ ID NO: 1の位置80に相当する残基297（EU番号付け）のAsnをAlaで置換することによりIgG4Fc部位のN連結グリコシル化部位を除去するのも、非相同融合蛋白質の残存するエフェクター活性を排除する方法である。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0013】

天然分子に存在するC末端のリジン残基は、本出願記載の非相同融合蛋白質のIgG4由来Fc部分から削除されている場合がある（SEQ ID NO: 1の位置230、削除されたリジンはdes-Kと呼ばれる）。リジンがC末端コドンでコード化されているある種の細胞型（例えばNSO細胞）で発現される非相同融合蛋白質は、分子のある部分がC末端アミノ酸としてリジンを有し、別の部分のリジンが削除されているので、非相同である。削除が起きるのは、ある種の哺乳類細胞で発現するときに生じる蛋白質分解酵素の作用の所為である。従って、この非相同を避けるため、非相同融合発現構築体は、リジンについてC末端コドンが欠如していることが望ましい。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【 0 0 1 4 】

治療用活性ペプチド部分のC末端アミノ酸をグリシンの豊富なリンカーを介して、IgG4Fc類似体部分のN末端に融合するのが望ましい。本発明の非相同融合蛋白質のインビボ機能と安定性は、小ペプチド・リンカーを加え、望ましくないドメイン間の相互作用の可能性を防止することにより、最適化が可能である。更に、グリシンの豊富なリンカーは構造上の柔軟性を提供するので、治療用活性ペプチド部分が標的細胞の受容体と生産的に相互作用できるようになる。しかしこういうリンカーは、非相同融合蛋白質がインビボで免疫原性となるリスクを有意に高める場合がある。従って、望ましくないドメイン間の相互作用を阻止するのに必要な長さ、および/または生物活性および/または安定性を最適化するのに必要な長さ以上の長さにしないのが望ましい。グリシンの豊富な好ましいリンカーには、配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:2)も含まれる。本発明の非相同融合蛋白質では、このリンカーの複数コピーを用いることもできるが、長期および反復投与に伴う免疫原性の危険性を最小限に抑えるには、この単一のリンカーを使用するのが望ましい。

## 【 手 続 補 正 6 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 2 9

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 0 2 9 】

本出願で使用される“相補的”または“相補性”という用語は、二本鎖核酸において水素結合により連結している塩基対（プリンおよびピリミジン）を意味する。グアニンおよびシトシン、アデニンおよびチミン、そしてアデニンおよびウラシルの塩基対が相補的である。

## 【 手 続 補 正 7 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 7 3

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 0 7 3 】

絶食状態およびグルコースの段階的静脈内注射期間中のラットに3種類の用量の単回皮下注射を行なった後の薬力学的試験：

慢性的にカニューレを挿入されたラットを溶媒対照（生理食塩水）または3つの処置グループ（GLP-1融合蛋白質：0.0179mg/kg、0.179mg/kgまたは1.79mg/kg）のいずれかに割り当てる。GLP-1融合タンパク質および溶媒を皮下注射により投与する。処置の24時間後、一晚絶食状態（16時間）にあるラットにグルコースの段階的静脈内注射試験を行う。グルコースの段階的静脈内注射は、生理食塩水注入のベースライン期間（20分）、次に30分のグルコース注入を2度（5mg/kg/分および15mg/kg/分）行なう期間で構成される。血漿サンプルの採取は、グルコース注入（ベースライン）の20分前、10分前、0分（ベースライン）、そして10分、20分、30分、40分、50分、および60分後に行なう。