

【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 4 月 7 日 (2005.4.7)

【公表番号】特表 2000-517174 (P2000-517174A)

【公表日】平成 12 年 12 月 26 日 (2000.12.26)

【出願番号】特願平 10-509953

【国際特許分類第 7 版】

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 38/22

A 6 1 P 1/00

A 6 1 P 1/02

A 6 1 P 3/00

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 7/00

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 13/02

A 6 1 P 15/00

A 6 1 P 17/02

A 6 1 P 17/06

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 31/10

A 6 1 P 37/00

A 6 1 P 43/00

C 0 7 K 14/50

C 1 2 N 5/10

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 P 1/00

A 6 1 P 1/02

A 6 1 P 3/00

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 7/00

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 13/02

A 6 1 P 15/00

A 6 1 P 17/02

A 6 1 P 17/06

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 31/10

A 6 1 P 37/00

A 6 1 P 43/00

C 0 7 K 14/50

C 1 2 N 5/00

B

A 6 1 K 37/24

【手続補正書】

【提出日】平成16年8月6日(2004.8.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手続補正書

平成16年 8月 6日



特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成10年特許願第509953号

2. 補正をする者

氏名(名称) ヒューマン・ジェノム・サイエンシズ・
インコーポレイテッド

3. 代理人

住所 〒540-0001
大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル
青山特許事務所
電話 06-6949-1261 F A X 06-6949-0361

氏名 弁理士 (6214) 青山 僚



4. 補正対象書類名 請求の範囲

5. 補正対象項目名 請求の範囲

6. 補正の内容
別紙のとおり。

方 登 録



(別紙)

請 求 の 範 囲

1. (a) ケラチノサイト増殖因子-2 (KGF-2)のN末端欠失変異体であって、該変異体は、配列番号2またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質の、少なくとも最初の38個のN末端アミノ酸残基を欠失するが、最初の56個以下のN末端アミノ酸残基を欠失であることを除けば、配列番号2のアミノ酸配列またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を含むN末端欠失変異体；

(b) ケラチノサイト増殖因子-2 (KGF-2)のC末端欠失変異体であって、該変異体は、配列番号2またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質の、少なくとも最後のC末端アミノ酸残基(Ser(208))を欠失するが、最後の17個以下のC末端アミノ酸残基の欠失であることを除けば配列番号2のアミノ酸配列またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を含み、該KGF-2 C末端欠失変異体のN末端アミノ酸残基は、配列番号2またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸残基1 (Met)、36 (Thr)、または37 (Cys)であるC末端欠失変異体；

(c) ケラチノサイト増殖因子-2 (KGF-2)のN末端およびC末端欠失変異体であって、該変異体は、配列番号2またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質の、少なくとも最初の38個のN末端アミノ酸残基を欠失するが、最初の56個以下のN末端アミノ酸残基の欠失であり、配列番号2またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質の少なくとも最後のC末端アミノ酸残基(Ser(208))を欠失するが、最後の17個以下のC末端アミノ酸残基の欠失であることを除けば、配列番号2またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を含む変異体；

(d) (a)、(b)、または(c)のKGF-2欠失変異体のアミノ酸配列に少なくとも90%、95%、97%、99%同一であるアミノ酸配列を有する

(a)、(b)、または(c)で定義されるKGF-2欠失変異体；

(e) 該変異体がAla(39)－Ser(208)およびPro(47)－Ser(208)よりなる群から選択される配列番号2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(f) 該ポリペプチドがArg(194)Glu, Arg(194)Gln, Lys(191)Glu, Lys(191)Gln, Arg(188)Glu, Lys(183)Gluよりなる群から選択される少なくとも1のアミノ酸置換を有する(a)、(b)、または(c)のポリペプチド；

(g) 該ポリペプチドがCys(37)Ser, およびCys(106)Serよりなる群から選択される少なくとも1のアミノ置換を有する(a)、(b)、または(c)のポリペプチド；

(h) 該変異体がAla(39)－His(200), およびMet(44)－Arg(193)よりなる群から選択される配列番号2に示されるアミノ酸配列またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を有する(c)のポリペプチド

(i) ケラチノサイト増殖因子-2(KGF-2)のN末端欠失変異体ポリペプチドであって、該変異体は、配列番号2またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質の、最初の62, 76, 92, 103, 122, または137個のアミノ酸残基の欠失を除けば、配列番号2のアミノ酸配列またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を含むケラチノサイト増殖因子-2のN末端欠失変異体；

よりなる群から選択されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

2. (a)、(c)、(d)、(f)または(g)に定義した欠失変異体ポリペプチドが、少なくとも最初の46個のN末端アミノ酸残基の欠失を有する請求項1に記載のポリヌクレオチド。

3. 該変異体ポリペプチドのアミノ酸配列がN-末端に付加したアミノ酸Me

tを含む請求項1又は2に記載のポリヌクレオチド。

4. 該ポリペプチドが融合タンパク質の部分である請求項1～3のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

5. 該ポリペプチドがマーカー配列に融合している請求項4に記載のポリヌクレオチド。

6. 該マーカー配列がヘキサヒスチジンタグまたは赤血球凝集素タグより選択される請求項5に記載のポリヌクレオチド。

7. ケラチノサイト増殖因子-2 (KGF-2)の親水性領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、該ペプチドは長さが50, 100または150アミノ酸以下であり、Gly (41) - Asn (71)、Lys (91) - Ser (109)、Asn (135) - Tyr (164)、およびAsn (181) - Ala (199) よりなる群から選択され、配列番号2またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を含むポリヌクレオチド。

8. E. coliにおける発現のために最適化されている請求項1～7のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

9. 配列番号38, 42, 54, または111のヌクレオチド配列を有する請求項8に記載のポリヌクレオチド。

10. 請求項1～9に記載のいずれかにポリヌクレオチドをベクター中に挿入することを含む組換えベクターの製造方法。

11. 請求項1～9のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むか、または請求項10に記載の方法により製造したベクター。

12. ポリヌクレオチドが発現調節配列に作動可能に結合し、原核または真核宿主細胞で発現を可能にする請求項11に記載のベクター。

13. 請求項11または12に記載のベクターを宿主細胞中に導入することを含む組換え宿主細胞の製造方法。

14. 請求項1～9のいずれかに記載のポリヌクレオチドで遺伝的に操作するか、または請求項13に記載の方法により製造した組換え宿主細胞。

15. 細菌、酵母、植物、昆虫または哺乳動物細胞である請求項14に記載の

宿主細胞。

16. *E. coli*, SF9, COSまたはCHO細胞である請求項15に記載の宿主。

17. 変異体KGF-2ポリペプチドを製造する方法であって、請求項14～16のいずれかに記載の宿主細胞を培養し、培養物から該ポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチドを回収することを含む方法。

18. 該変異体KGF-2ポリペプチド、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、および／または高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により細胞培養から回収し、精製する請求項17に記載の方法。

19. (a) 細胞を遠心分離により収穫し；
(b) カオトロピック試薬中でペレットを可溶化し；
(c) タンパク質の強固な結合を可能にする条件の下でヘパリンアフィニティークラムでクロマトグラフィーにより可溶化したKGF-2変異体ポリペプチドを精製し；そして
(d) 高塩緩衝液によりカラムからHGF-2変異体を溶出させることを含む請求項17又は18に記載の方法。

20. (a) 細胞を遠心分離により収穫し；
(b) 60mM NaPO_4 、360mM NaCl を含む緩衝液中で細胞を、5容積の緩衝液、1容積の細胞ペーストの比で再懸濁し、
(c) *Mautin Gaulin*中でディスラプションした後、 NaOH の添加で置換によりpH8.0に抽出物を調節し、遠心分離で清澄化し；
(d) 清澄化された可溶性の抽出物をPoros HS-50カラムに適用し、結合したタンパク質を0.5M, 1.0M, 1.5M NaCl を含む50mM NaPO_4 、pH8.0で段階溶出し；
(e) 1.5M塩画分で溶出したKGF-2を50mM NaPO_4 、pH6.5で最終塩濃度300mMまで5倍に希釈し；

(f) このKGF-2を含む画分をP o r o s H Q-20カラムに順次通し、次にP o r o s CMカラム-20に結合させ；

(g) 約500mM～約750mM NaClで溶出したKGF-2を含む画分をプールし；

(h) 希釈し、CM-20カラムに再適用し濃縮し；

(i) 40mM NaOAc pH6.5；150mM NaCl中、またはリン酸塩緩衝食塩水中でゲル濾過カラム上でタンパク質を分離し；

(j) KGF-2を含む画分をプールする；

ことを含む請求項18または19に記載の方法。

21. 請求項1～9のいずれかに記載のポリヌクレオチドによりコードされる、請求項17～20のいずれかに記載の方法により得られ得るKGF-2変異体ポリペプチド。

22. (a) KGF-2 N末端削除変異体であって、該変異体は図1のアミノ酸配列Ala(63)－Ser(208)またはプラスミドATCC75977に含まれるcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列Ala(63)－Ser(208)より本質的になる変異体；

(b) (a)のKGF-2変異体のアミノ酸配列に少なくとも90%、95%、97%、または99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(c) 該ポリペプチドがArg(194)Glu, Arg(194)Gln, Lys(191)Gln、Arg(188)Glu、Lys(183)Gluよりなる群から選択される少なくとも1のアミノ置換を有する(a)のポリペプチド；

よりなる群から選択されるKGF-2変異体ポリペプチド。

23. グリコシル化されているか、またはグリコシル化されていない請求項21又は22に記載のポリペプチド。

24. 該ポリペプチドがN末端に付加されたアミノ酸Metを含む請求項21～23のいずれかに記載のポリペプチド。

25. 請求項22～24のいずれかに記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。

26. 請求項22～24のいずれかに記載のポリペプチドがマーカ配列に融合している請求項25に記載の融合タンパク質。

27. マーカ配列がヘキサヒスチジンタグまたは赤血球凝集素タグより選択される請求項26に記載の融合タンパク質。

28. 請求項22～27のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

29. *E. coli*における発現に最適化された請求項28に記載のポリヌクレオチド。

30. 請求項28又は29に記載のポリヌクレオチドをベクターに挿入することを含む組み替えベクターの製造方法。

31. 請求項28又は29に記載のポリヌクレオチドを含むか、請求項30に記載の方法により製造されたベクター。

32. ポリヌクレオチドが発現調節配列に作動可能に結合し、原核または真核宿主細胞で発現を可能にする請求項31に記載のベクター。

33. 請求項31又は32に記載のベクターを宿主細胞に導入することを含む組み替え宿主細胞の製造方法。

34. (a) 請求22～27のいずれかに記載のポリペプチドを発現する；
(b) 請求項28又は29に記載のポリヌクレオチドで操作されている；
(c) 請求項30又は31に記載のベクターで操作されている；または
(d) 請求項33に記載の方法により製造される；
組み替え宿主細胞。

35. 細菌、酵母、植物、昆虫または哺乳動物細胞である請求項14に記載の宿主細胞。

36. *E. coli*, SF9, COSまたはCHO細胞である請求項35に記載の宿主細胞。

37. 変異体KGF-2ポリペプチドを製造する方法であって、請求項34～36のいずれかに記載の宿主細胞を培養し、培養物から該ポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチドを回収することを含む方法。

38. 請求項37に記載の方法により得られうるポリペプチド。

39. 請求項1～9, 28, または29のいずれかに記載のポリヌクレオチド、請求項11, 12, 31又は32のいずれかに記載のベクター、または請求項21～27, または38のいずれかに記載のポリペプチドを医薬的に受容しうる担体または賦形剤とともに含む医薬組成物。

40. 上皮細胞の生長または増殖を刺激するインビトロの方法であって、該細胞を請求項21～27, または38のいずれかに記載のポリペプチドの有効量と接触させることを含む方法。

41. 個体における上皮細胞の生長または増殖を刺激する医薬組成物の製造のための請求項21～27, または38のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

42. 上皮細胞がケラチノサイトまたは基部ケラチノサイトである請求項40又は41に記載の使用。

43. 上皮細胞が、肺、乳房、膵臓、胃、小腸または大腸に由来する請求項40又は41に記載の使用。

44. 上皮細胞が、セボサイト、毛髪小胞、肝細胞、タイプI Iニューモサイト、またはムチン製造杯状細胞、または他の上皮細胞および皮膚、肺、肝臓および胃腸管内部に含まれるそれらの先祖である請求項40又は41に記載の使用。

45. 皺または老化した皮膚の外観を防止または改良し、皮膚強度を改良し、表皮性の肥厚または瘢痕減少を促進する医薬組成物の製造における請求項21～27または38のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

46. 整容手術後の治癒を改善するための医薬組成物の製造のための請求項21～27または38のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

47. 個体における創傷治癒を促進するための医薬組成物の製造のための請求項21～27または38のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

48. 創傷が、外科手術創傷、切除創傷、真皮および表皮の損傷を含む深い創傷、眼の組織の創傷、歯の組織の創傷、口腔の創傷、潰瘍、または火傷から選択される請求項47に記載の使用。

49. 潰瘍が糖尿病性潰瘍、皮膚潰瘍、ひじの潰瘍、動脈潰瘍または静脈鬱血潰瘍である請求項48に記載の使用

50. 結腸または胃腸(G I)の外科手術により生じる創傷を処置する医薬組成

物を製造するための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

5 1. 該外科手術が吻合である請求項 5 0 に記載の使用。

5 2. 個体が創傷治癒が損なわれている請求項 4 7～5 1 のいずれかに記載の使用。

5 3. 創傷治癒が損なわれるのが、糖尿病、虚血性遮断もしくは損傷、ステロイド、非ステロイド化合物、尿毒症、栄養不良、ビタミン欠除、肥満、感染、免疫抑制、放射線療法、または化学療法により起されるか、またはステロイドによる全身的治療に伴う合併症である請求項 5 2 に記載の使用。

5 4. 粘膜炎を治療または予防する医薬組成物を製造するための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

5 5. 粘膜炎が、口、食道、胃、腸、結腸、直腸、または肛門の粘膜炎から選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

5 6. 炎症性の腸の病気を処置する医薬組成物を製造するための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

5 7. 該病気が潰瘍性的大腸炎またはクローン病から選択される請求項 5 6 に記載の使用。

5 8. 炎症を減少させる医薬組成物を製造するための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

5 9. 炎症が、乾癬、または関節炎から選択される病気または状態に伴う請求項 5 8 に記載の使用。

6 0. 炎症が、湿疹、または皮膚炎から選択される病気または状態に伴う請求項 5 8 に記載の使用。

6 1. 尿路上皮の治癒を促進するための、または女性の生殖管における組織生長または修復を促進するための医薬組成物を製造するための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

6 2. 毛髪生長を促進するための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

6 3. 放射線に暴露された組織を処置し、または放射線に暴露されるべき組織

を保護するための医薬組成物を製造するための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

6 4. 医薬組成物が個体の悪性疾患を治療するのに用いる放射線量を増加させることを可能にするために投与されるよう設計された請求項 6 3 に記載の使用。

6 5. 医薬組成物を、口の損傷、胃腸の損傷、粘膜炎、間質性線維症、直腸炎、肺線維症、肺炎、胸膜退縮、造血性症候群、または骨髄毒性より選択される放射線による誘起される状態を処置するために投与するよう設計された、請求項 6 3 に記載の使用。

6 6. 肺の病気を処置するための医薬組成物の製造のための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

6 7. 肺の病気が急性または慢性の肺の病気である請求項 6 6 に記載の使用。

6 8. 肺の病気が肺気腫、吸入障害、ヒアリン膜症、幼児の呼吸困難症候群または気管支肺の形成異常である請求項に記載の 6 6 の使用。

6 9. 肝臓の病気のための医薬組成物の製造のための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

7 0. 肝臓の病気が硬変により起きる電撃的に発症する肝臓の病気である請求項 6 9 に記載の使用。

7 1. 肝臓の病気がウイルス性肝炎または毒性物質により起こされる肝臓障害である請求項 6 9 に記載の使用。

7 2. 糖尿病のための医薬組成物の製造のための請求項 2 1～2 7 または 3 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

7 3. 医薬組成物が治療的投与のためである請求項 4 1～7 2 のいずれかに記載の使用。

7 4. 医薬組成物が予防的投与のためである請求項 4 1～7 2 のいずれかに記載の使用。