

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-535486

(P2010-535486A)

(43) 公表日 平成22年11月25日(2010.11.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B064
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C084
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-519503 (P2010-519503)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月23日 (2008.7.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年4月2日 (2010.4.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2008/002489
 (87) 国際公開番号 W02009/019427
 (87) 国際公開日 平成21年2月12日 (2009.2.12)
 (31) 優先権主張番号 0715216.8
 (32) 優先日 平成19年8月3日 (2007.8.3)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 60/956,360
 (32) 優先日 平成19年8月16日 (2007.8.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502452978
 アステリオン・リミテッド
 イギリス国, エス10 2ティーエヌ シ
 エフィールド, ウェスタン・バンク, ファ
 ース・コート
 (74) 代理人 100149294
 弁理士 内田 直人
 (74) 代理人 100137512
 弁理士 奥原 康司
 (72) 発明者 アーティミュック, ピーター
 イギリス国, シェフィールド エス10
 2ティーエヌ, ファース コート, ウェス
 タンバンク, アステリオン・リミテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レプチン融合タンパク質

(57) 【要約】

本開示は、レプチン融合ポリペプチド、上述のポリペ
 プチドをコードする核酸分子、ならびに上述のポリペ
 プチドを使用する治療の方法に関する。

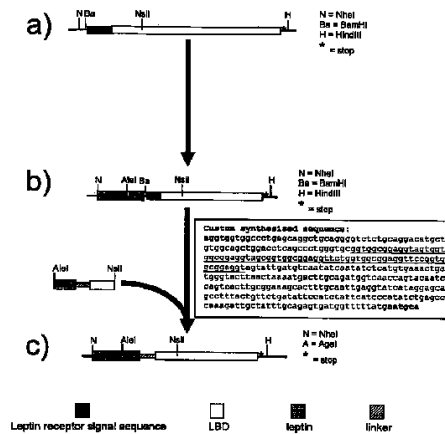


Figure 15.

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

レプチン受容体ポリペプチドの少なくとも 1 つのレプチン結合ドメインに直接または間接的に連結されるレプチンポリペプチドを含む、レプチンの活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子。

【請求項 2】

レプチン受容体ポリペプチドの少なくとも 1 つのレプチン結合ドメインに直接または間接的に連結されるレプチンポリペプチドのアミノ酸配列またはその活性部分を含む融合ポリペプチド。

【請求項 3】

2 つのレプチン結合ドメインを含む、請求項 2 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4】

免疫グロブリン様ドメインを含む、請求項 2 または 3 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5】

少なくとも 1 つのサイトカイン様相同性ドメインを含む、請求項 2 から 4 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6】

2 つのサイトカイン様相同性ドメインを含む、請求項 2 から 4 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 7】

少なくとも 1 つのフィブロネクチン I I I 結合ドメインを含む、請求項 2 から 6 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 8】

2 つのフィブロネクチン I I I 結合ドメインを含む、請求項 2 から 6 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 4 1 のアミノ酸残基 4 2 5 から 5 3 5 を含む、請求項 2 から 8 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号 4 1 のアミノ酸残基 5 3 6 から 6 3 5 を含む、請求項 2 から 9 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号 4 1 のアミノ酸残基 3 2 6 から 4 2 7 を含む、請求項 2 から 10 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号 4 1 のアミノ酸残基 6 2 から 1 7 8 を含む、請求項 2 から 11 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 13】

配列番号 4 1 のアミノ酸残基 2 3 5 から 3 2 5 を含む、請求項 2 から 12 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号 4 1 のアミノ酸残基 6 3 6 から 7 3 3 を含む、請求項 2 から 13 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号 4 1 のアミノ酸残基 7 3 4 から 8 2 9 を含む、請求項 2 から 14 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 16】

配列番号 4 1 のアミノ酸残基 4 2 8 から 6 3 5 を含む、請求項 2 から 15 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記レプチンポリペプチドは、レプチン受容体の少なくとも1つのレプチン結合ドメインに連結され、前記レプチンポリペプチドは、前記融合ポリペプチドにおいて前記レプチン結合ドメインのアミノ末端側に位置する、請求項2から16のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項18】

前記レプチンポリペプチドは、レプチン受容体の少なくとも1つのレプチン結合ドメインに連結され、前記レプチンポリペプチドは、前記融合ポリペプチドにおいて前記レプチン結合ドメインのカルボキシル末端側に位置する、請求項2から16のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項19】

前記レプチンポリペプチドは、ペプチドリンカーによって、レプチン受容体ポリペプチドの少なくとも1つの結合ドメインに連結される、請求項2から18のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項20】

前記ペプチド連結分子は、ペプチドGly Gly Gly Gly Serの少なくとも1コピーを含む、請求項19に記載の融合ポリペプチド。

【請求項21】

前記ペプチド連結分子は、ペプチドGly Gly Gly Gly Serの2、3、4、5、6、7、8、9または10コピーを含む、請求項20に記載の融合ポリペプチド。

【請求項22】

前記ペプチド連結分子は、ペプチドGly Gly Gly Gly Serの6コピーから成る、請求項21に記載の融合ポリペプチド。

【請求項23】

前記ペプチド連結分子は、ペプチドGly Gly Gly Gly Serの8コピーから成る、請求項21に記載の融合ポリペプチド。

【請求項24】

レプチンポリペプチドおよびレプチン受容体ポリペプチドの少なくとも1つのレプチン結合ドメインの直接的な融合物である、請求項2から18のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項25】

i) 配列番号3で表される核酸配列、
 ii) 配列番号5で表される核酸配列、
 iii) 配列番号7で表される核酸配列、
 iv) 配列番号9で表される核酸配列、
 v) 配列番号11で表される核酸配列、
 vi) 配列番号13で表される核酸配列、
 vii) 配列番号15で表される核酸配列、
 viii) 配列番号17で表される核酸配列、
 ix) 配列番号19で表される核酸配列、
 x) 配列番号21で表される核酸配列、
 xi) 配列番号23で表される核酸配列、
 xii) 配列番号25で表される核酸配列、
 xiii) 配列番号27で表される核酸配列
 から選択される核酸配列を含む核酸分子、

配列番号3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25または27とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、レプチン受容体調節活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子。

【請求項26】

レプチンアゴニストをコードする、請求項25に記載の核酸分子。

10

20

30

40

50

- 【請求項 27】
レプチンアンタゴニストをコードする、請求項 25 に記載の核酸分子。
- 【請求項 28】
配列番号 3 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- 【請求項 29】
配列番号 5 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- 【請求項 30】
配列番号 7 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。 10
- 【請求項 31】
配列番号 9 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- 【請求項 32】
配列番号 11 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- 【請求項 33】
配列番号 13 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。 20
- 【請求項 34】
配列番号 15 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- 【請求項 35】
配列番号 17 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- 【請求項 36】
配列番号 19 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- 【請求項 37】
配列番号 21 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。 30
- 【請求項 38】
配列番号 23 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- 【請求項 39】
配列番号 25 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。
- 【請求項 40】
配列番号 27 で表される核酸配列を含む、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の核酸分子。 40
- 【請求項 41】
請求項 1 または 25 から 40 のいずれか一項に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチド。
- 【請求項 42】
配列番号 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド。
- 【請求項 43】
2 つのポリペプチドから成るホモ二量体であって、前記ポリペプチドはそれぞれ、 50

i) レプチンまたはその受容体結合ドメインを含む第 1 の部分と、ペプチド連結分子によってそれと任意選択で連結される

ii) レプチン受容体の少なくとも 1 つのレプチン結合ドメインまたはその部分を含む第 2 の部分と

を含むホモ二量体。

【請求項 4 4】

前記ホモ二量体は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40 を含む 2 つのポリペプチドを含む、請求項 4 3 に記載のホモ二量体。

【請求項 4 5】

請求項 1 または 2 5 から 4 0 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 4 6】

請求項 1、2 5 から 4 0 または 4 5 のいずれか一項に記載の核酸分子またはベクターを用いて形質移入または形質転換される細胞。

【請求項 4 7】

真核細胞である、請求項 4 6 に記載の細胞。

【請求項 4 8】

原核細胞である、請求項 4 6 に記載の細胞。

【請求項 4 9】

賦形剤または担体を含む、請求項 2 から 2 4 または 4 1 または 4 2 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 5 0】

さらなる治療薬と組み合わせられる、請求項 4 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 1】

レプチンアゴニストの投与が有効であろう状態に罹患しているヒト対象を治療するための方法であって、請求項 2 から 2 4 または 4 1 または 4 2 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 5 2】

前記状態は、肥満である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記状態は、肥満関連性の状態である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記肥満関連性の状態は、II 型糖尿病である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記肥満関連性の状態は、心疾患である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記状態は、免疫抑制である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 7】

レプチンアンタゴニストの投与が有効であろう状態に罹患しているヒト対象を治療するための方法であって、請求項 2 から 2 4 または 4 0 または 4 1 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 5 8】

前記状態は、食欲不振症である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記状態は、自己免疫疾患である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記自己免疫疾患は、多発性硬化症、1 型糖尿病、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫性肝炎、慢性関節リウマチ、自己免疫性大腸炎、クローン病、セリアック病、自己免疫性腎炎、自己免疫性ニューロパチー、脳障害、線維化肺胞炎から成る群から選択される、請求項 5 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 1】

前記ポリペプチドは、静脈内に投与される、請求項 5 1 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記ポリペプチドは、皮下に投与される、請求項 5 1 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記ポリペプチドは、2日間隔で投与される、請求項 5 1 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記ポリペプチドは、1週間隔で投与される、請求項 5 1 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記ポリペプチドは、2週間隔で投与される、請求項 5 1 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記ポリペプチドは、1か月間隔で投与される、請求項 5 1 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 7】

請求項 2 から 2 4 または 4 0、4 1 または 4 3 または 4 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは二量体に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 6 8】

ポリペプチドまたは二量体に結合するが、レプチンまたはレプチン受容体にそれぞれ特異的に結合しないモノクローナル抗体である、請求項 6 7 に記載の抗体。

【請求項 6 9】

本発明によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を調製するための方法であって、

i) 本発明による少なくとも1つのポリペプチドを含む免疫原を用いて免疫応答性哺乳動物を免疫するステップ、

ii) 免疫された免疫応答性哺乳動物のリンパ球を骨髄腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成するステップ、

iii) ステップ (ii) のハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体を、(i) のポリペプチドに対する結合活性についてスクリーニングするステップ、

iv) ハイブリドーマ細胞を培養して、前記モノクローナル抗体を量産および/または分泌するステップ、ならびに

v) 培養上清からモノクローナル抗体を回収するステップを含む方法。

【請求項 7 0】

前記免疫応答性哺乳動物は、マウスまたはラットである、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

請求項 6 9 または 7 0 に記載の方法によって得られるまたは入手可能なハイブリドーマ細胞株。

【請求項 7 2】

生体試料において、本発明によるポリペプチドを検出するための診断試験であって、

i) 試験対象となる単離試料を提供するステップ、

ii) 前記試料を、請求項 2 から 2 4 または 4 0 または 4 1 または 4 3 または 4 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは二量体に結合するリガンドと接触させるステップ、および

iii) 前記試料において前記リガンドの結合を検出するステップを含む診断試験。

【請求項 7 3】

前記リガンドは、抗体である、請求項 7 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 4】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 7 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レプチン融合ポリペプチドおよび二量体、上述のポリペプチドをコードする核酸分子、ならびに上述のポリペプチド/二量体を使用する治療の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

サイトカイン受容体は、3つの別個のグループに分類することができる。クラス 1 (ヘマトポエチンまたは成長ホルモンファミリーと呼ばれる) 受容体は、それらの細胞外ドメインのアミノ末端部分における4つの保存システイン残基およびC末端部分における保存 Trp - Ser - Xaa - Trp - Ser モチーフの存在によって特徴づけられる。受容体は、2つのポリペプチド鎖から成る。クラス I 受容体は、GM - CSF サブファミリー (IL - 3、IL - 5、GM - CSF、GCSF を含む) ならびに IL - 6 サブファミリー (IL - 6、IL - 11、および IL - 12 を含む) に細分することができる。IL - 6 サブファミリーにおいて、1つまたは2つの異なるサイトカインサブユニットと結合する、共通の伝達サブユニット (gp130) がある。IL - 2 サブファミリー (IL - 2、IL - 4、IL - 7、IL - 9、および IL - 15 を含む) と呼ばれる、さらなるサブファミリーがある。繰り返し Cys モチーフはまた、リガンドが、 、 、 および インターフェロンであるが、保存 Trp - Ser - Xaa - Trp - Ser モチーフを欠くクラス 2 (インターフェロン受容体ファミリー) においても存在する。

10

20

【0003】

ヒトレプチンは、ヒトにおける lep 遺伝子およびマウスにおける ob 遺伝子によってコードされる 16 kD タンパク質ホルモンである。レプチンは、サイトカインファミリーの単一膜貫通受容体であるレプチン受容体を通して作用する。3つのエクソンおよび2つのイントロンを含み、約 18 kb のゲノム DNA にわたる、ヒトにおけるレプチンをコードする単一遺伝子がある。レプチンは、とりわけ食欲および免疫機能をコントロールするために栄養状態および免疫系と関連する。レプチンまたはレプチン受容体のいずれかにおける突然変異の存在は、肥満と関連する付随する二次的症候 (たとえば心疾患、II 型糖尿病) を伴う肥満表現型をもたらす。レプチンは、肥満度指数 (BMI) に比例して脂肪組織によって主に産生され、より低度なレベルで、胃および胎盤などのような器官によって産生される。レプチンは、食物摂取の阻害およびエネルギー消費の刺激を通して体重を調節する。さらに、レプチンは、自然および適応免疫の両方に影響を与える。自然免疫に関して、レプチンは、好中球の活性を調節し、単球/マクロファージの食作用を増加させ、急性期応答の炎症性メディエーターの分泌を増強する。適応免疫に関して、レプチンは、ナイーブ T 細胞による増殖およびインターロイキン 2 (IL - 2) 分泌を促進するのに対して、メモリー T 細胞に関して、それは、インターフェロン - (INF -) および腫瘍壊死因子 - (TNF - 分泌) を増加させることによって、ヘルパー T 1 (Th 1) 免疫応答への切り換えを促進する。

30

40

レプチンの発現および/または産生が混乱すると、疾患の病理学的発現は、エネルギー代謝および免疫状態に対する影響により複雑になる。肥満に対する確立された関連とは別に、レプチンの低下は、不妊症、骨粗鬆症、および免疫抑制と関連する。

【発明の概要】

【0004】

本開示は、薬物動態 (PK) および活性が改善されたレプチン組換え形態の同定に関する。新しいレプチン分子は、生物学的活性を有し、二量体を形成し、安定性が改善されている。

【図面の簡単な説明】

【0005】

50

【図1】 aは細菌発現レプチンの核酸配列を示す図であり、bはアミノ酸配列を示す図である。

【図2】 aはLR 2A1の核酸配列を示す図であり、bはLR 2A1のアミノ酸配列を示す図である。

【図3】 aはLR 2A1の核酸配列を示す図であり、bは細菌発現に適したLR 2A1のアミノ酸配列を示す図である。

【図4a】 LR 2B1の核酸配列を示す図である。

【図4b】 LR 2B1のアミノ酸配列を示す図である。

【図5a】 LR 2D1の核酸配列を示す図である。

【図5b】 LR 2D1のアミノ酸配列を示す図である。

10

【図6】 aはLR 2E1の核酸配列を示す図であり、bはLR 2E1のアミノ酸配列を示す図である。

【図7】 aはLR 2F1の核酸配列を示す図であり、bはLR 2F1のアミノ酸配列を示す図である。

【図8】 aはLR 2G1の核酸配列を示す図であり、bはLR 2G1のアミノ酸配列を示す図である。

【図9a】 LR 2H1の核酸配列を示す図である。

【図9b】 LR 2H1のアミノ酸配列を示す図である。

【図10a】 LR 2I1の核酸配列を示す図である。

【図10b】 LR 2I1のアミノ酸配列を示す図である。

20

【図11】 aはLR 2J1の核酸配列を示す図であり、bはLR 2J1のアミノ酸配列を示す図である。

【図12】 aはLR 2K1の核酸配列を示す図であり、bはLR 2K1のアミノ酸配列を示す図である。

【図13a】 LR 2L1の核酸配列を示す図である。

【図13b】 LR 2L1のアミノ酸配列を示す図である。

【図14a】 LR 2M1の核酸配列を示す図である。

【図14b】 LR 2M1のアミノ酸配列を示す図である。

【図15】 a) レプチン結合ドメイン(LBD)は、発現ベクターpSecTagの中にライゲーションされて、pSecTaglinkSSLBDを生成する。b) レプチンは、pSecTaglinkSSLBDの中にライゲーションされて、pSecTag2A1(1m)を生成する。c) DNAは、合成され、pSecTag2A1(1m)の中にライゲーションされて、(G₄S)₅を導入する。

30

【図16】 レプチンLR融合物を発現するCHO細胞からの培地のウェスタンブロットを示す図である。レーンの内容物は、1、2A1発現；2、2B1発現；3、2D1発現；4、マーカー(20、25、37、50、75、100、150、200kDa)とする。ウェスタンブロットは、レプチンに対する抗体を用いてプローブした。

【図17】 a) レプチン受容体細胞外ドメイン(ObRex)は、発現ベクターpSecTagの中にライゲーションされて、pSecTaglinkSSObRexを生成する。b) レプチンは、pSecTaglinkSSObRexの中にライゲーションされて、pSecTag2B1(1m)を生成する。c) DNAは、合成され、pSecTag2B1(1m)の中にライゲーションされて、(G₄S)₅を導入する。

40

【図18】 a) PCRは、適した制限部位(プライマーR1~4内に含有される)が側面に位置する、興味のある遺伝子から成るDNAを生成するために使用した。b) PCR産物は、リンカー領域の両側に、適したベクターの中にライゲーションした。c) 構築物は、その後、適切なリンカーを導入するために修飾した。リンカーは、いかなる不要な配列(つまり非天然制限部位)も含有しなかった。

【図19】 a) オリゴヌクレオチドは、特有のオーバーラップを有する部分的に二本鎖の領域を形成するように設計し、アニールし、処理した場合、リガンドおよび受容体にアニールするであろう隣接領域を有するリンカーをコードするであろう。b) PCRは、LR

50

融合遺伝子を産生するために「メガプライマー」ならびに末端プライマー（R1およびR2）を使用して行った。R1およびR2プライマーは、標的ベクターの中へのライゲーションに有用な隣接制限部位を導入するように設計した。

【図20】完全長レプチン受容体のアミノ酸配列を示す図である。

【図21】レプチンLR融合構築物の模式図を示す図である。

【図22】2A1、2B1、および2D1構築物を発現するCHO Flp-In安定細胞株の免疫プロット分析を示す図である。レーンM=マーカー（250、150、100、75、50、37、25、および20kDa）；レーン1=CHO Flp-Inコントロール細胞、レーン2=2A1発現培地、レーン3=2B1発現培地、レーン4=2D1発現培地。

10

【図23】2A1Ecoptの発現を示す図である。A) 2A1Ecopt発現を示すクーマシー染色ゲル。レーンM=マーカー（250、150、100、75、50、37、25、20、および15kDa）；レーン1=誘発時の発現、レーン2=誘発4時間後の発現、レーン3=誘発後、一晚のインキュベーションの後の発現、レーン4=2A1Ecopt発現細胞の不溶性画分、レーン5=2A1Ecopt発現細胞の可溶性画分。B) 2A1Ecopt発現の免疫プロット。レーンM=マーカー（250、150、100、75、50、37、25、20、および15kDa）；レーン1=誘発時の発現、レーン2=誘発4時間後の発現、レーン3=誘発後、一晚のインキュベーションの後の発現。

【図24】2A1Ecoptの封入体調製物のクーマシー染色SDS-PAGEゲルを示す図である。レーンM=マーカー（250、150、100、75、50、37、25、および20kDa）；レーン1=大腸菌BL21(DE3)：2A1Ecopt全細胞、レーン2=細胞溶解物-可溶性画分、レーン3=細胞溶解物-不溶性画分、レーン4~7=2%デオキシコール酸ナトリウム洗浄1~4、レーン8~9=水洗浄1~2、レーン10=封入体調製物。

20

【図25】2A1を発現するCHO Flp-In細胞からの粗製培地のインビトロバイオアッセイを示す図である。2A1を発現するCHO Flp-In細胞からの粗製培地（10x濃縮物）を、レプチンインビトロバイオアッセイにおいて細胞を刺激するために使用した。培地はアゴニスト活性を与えたが、2A1を発現しない細胞からの培地は活性を与えなかった（黒色のカラム）。

【図26】精製2A1Ecoptのインビトロバイオアッセイを示す図である。免疫プロットにおいて2A1Ecoptの適切なサイズで単一のバンドを示したりフォールディングした2A1Ecopt試料を、レプチンインビトロバイオアッセイにおいて細胞を刺激するために使用した。試料はアゴニスト活性を示した。

30

【発明を実施するための形態】

【0006】

本発明の一態様によれば、レプチン受容体ポリペプチドの少なくとも1つのレプチン結合ドメインに直接または間接的に連結されるレプチンポリペプチドを含む、レプチンの活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子が提供される。

【0007】

本発明の一態様によれば、レプチン受容体ポリペプチドの少なくとも1つのレプチン結合ドメインに直接または間接的に連結されるレプチンポリペプチドのアミノ酸配列またはその活性部分を含む融合ポリペプチドが提供される。

40

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、2つのレプチン結合ドメインを含む。

本発明のさらなる好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、免疫グロブリン様ドメインを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、少なくとも1つのサイトカイン様相同性ドメイン、好ましくは2つのサイトカイン様相同性ドメインを含む。

【0008】

本発明のさらなる好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、少なくとも

50

1つのフィブロネクチン I I I 結合ドメイン、好ましくは2つのフィブロネクチン I I I 結合ドメインを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 4 1 のアミノ酸残基 4 2 8 ~ 5 3 5 を含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 4 1 のアミノ酸残基 5 3 6 ~ 6 3 5 を含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 4 1 のアミノ酸残基 3 2 6 ~ 4 3 7 を含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 4 1 のアミノ酸残基 6 2 ~ 1 7 8 を含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 4 1 のアミノ酸残基 2 3 5 ~ 3 2 5 を含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 4 1 のアミノ酸残基 6 3 9 ~ 7 3 2 を含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 4 1 のアミノ酸残基 7 3 4 ~ 8 2 9 を含む。

本発明のさらなる好ましい実施形態において、上述の融合ポリペプチドは、配列番号 4 1 のアミノ酸残基 4 2 8 ~ 6 3 5 を含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のレプチンポリペプチドは、レプチン受容体の少なくとも1つのレプチン結合ドメインに連結され、上述のレプチンポリペプチドは、上述の融合ポリペプチドにおいて上述のレプチン結合ドメインのアミノ末端側に位置する。

本発明の好ましい実施形態において、上述のレプチンポリペプチドは、レプチン受容体の少なくとも1つのレプチン結合ドメインに連結され、上述のレプチンポリペプチドは、上述の融合ポリペプチドにおいて上述のレプチン結合ドメインのカルボキシル末端側に位置する。

本発明の好ましい実施形態において、上述のレプチンポリペプチドは、ペプチドリンカー、好ましくは柔軟なペプチドリンカーによって、レプチン受容体ポリペプチドの少なくとも1つの結合ドメインに連結される。

【 0 0 0 9 】

本発明の好ましい実施形態において、上述のペプチド連結分子は、ペプチド G l y G l y G l y S e r の少なくとも1コピーを含む。

本発明の好ましい実施形態において、上述のペプチド連結分子は、ペプチド G l y G l y G l y S e r の 2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 コピーを含む。

好ましくは、上述のペプチド連結分子は、ペプチド G l y G l y G l y G l y S e r の 6 コピーから成る。

好ましくは、上述のペプチド連結分子は、ペプチド G l y G l y G l y G l y S e r の 8 コピーから成る。

本発明の代替の実施形態において、上述のポリペプチドは、ペプチド連結分子を含まず、レプチンポリペプチドおよびレプチン受容体ポリペプチドの少なくとも1つのレプチン結合ドメインの直接的な融合物である。

本発明の一態様によれば、

- i) 配列番号 3 で表される核酸配列、
- i i) 配列番号 5 で表される核酸配列、
- i i i) 配列番号 7 で表される核酸配列、
- i v) 配列番号 9 で表される核酸配列、
- v) 配列番号 1 1 で表される核酸配列、
- v i) 配列番号 1 3 で表される核酸配列、
- v i i) 配列番号 1 5 で表される核酸配列、

10

20

30

40

50

v i i i) 配列番号 17 で表される核酸配列、
 i x) 配列番号 19 で表される核酸配列、
 x) 配列番号 21 で表される核酸配列、
 x i) 配列番号 23 で表される核酸配列、
 x i i) 配列番号 25 で表される核酸配列、
 x i i i) 配列番号 27 で表される核酸配列

から選択される核酸配列を含む核酸分子、

配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25 または 27 とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし、レプチン受容体調節活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、レプチンアゴニストをコードする。

本発明の代替の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、レプチンアンタゴニストをコードする。

核酸分子のハイブリダイゼーションは、2つの相補的な核酸分子が、互いに、かなりの量の水素結合を起こす場合に起こる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、核酸を取り囲む環境条件、ハイブリダイゼーション方法の性質、ならびに使用される核酸分子の組成および長さによって変動し得る。特定の程度のストリンジェンシーを達成するのに必要とされるハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001) および Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes 第I部、第2章 (Elsevier, New York, 1993) において説明される。 T_m は、核酸分子の所与の鎖の50%が、その相補鎖にハイブリダイズする温度である。以下は、ハイブリダイゼーション条件の例示的なセットであり、限定的なものではない。

非常に高度なストリンジェンシー (少なくとも90%の同一性を共有する配列がハイブリダイズすることを可能にする)

ハイブリダイゼーション: 16時間、65 で $5 \times S S C$

2度洗浄: それぞれ15分間、室温 (RT) で $2 \times S S C$

2度洗浄: それぞれ20分間、65 で $0.5 \times S S C$

高度なストリンジェンシー (少なくとも80%の同一性を共有する配列がハイブリダイズすることを可能にする)

ハイブリダイゼーション: 16 ~ 20時間、65 ~ 70 で $5 \times \sim 6 \times S S C$

2度洗浄: それぞれ5 ~ 20分間、RTで $2 \times S S C$

2度洗浄: それぞれ30分間、55 ~ 70 で $1 \times S S C$

低度なストリンジェンシー (少なくとも50%の同一性を共有する配列がハイブリダイズすることを可能にする)

ハイブリダイゼーション: 16 ~ 20時間、RT ~ 55 で $6 \times S S C$

少なくとも2度洗浄: それぞれ20 ~ 30分間、RT ~ 55 で $2 \times \sim 3 \times S S C$ 。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号3で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号5で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号7で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号9で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号 11 で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号 13 で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号 17 で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号 19 で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号 21 で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号 23 で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号 25 で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の好ましい実施形態において、上述の核酸分子は、配列番号 27 で表される核酸配列を含むまたはそれから成る。

本発明の一態様によれば、本発明による核酸によってコードされるポリペプチドが提供される。

本発明のさらなる態様によれば、配列番号 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40 で表されるアミノ酸配列を含むまたはそれから成るポリペプチドが提供される。

本発明の一態様によれば、2つのポリペプチドから成るホモ二量体であって、上述のポリペプチドはそれぞれ、

i) レプチンまたはその受容体結合ドメインを含む第1の部分と、ペプチド連結分子によってそれと任意選択で連結される

ii) レプチン受容体の少なくとも1つのレプチン結合ドメインまたはその部分を含む第2の部分と

を含むホモ二量体が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のホモ二量体は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40 を含むまたはそれから成る2つのポリペプチドを含む。

本発明のさらなる態様によれば、本発明による核酸分子を含むベクターが提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述のベクターは、本発明による核酸分子を発現するように適合された発現ベクターである。

本発明による(1つまたは複数の)核酸を含むベクターは、特に、ベクターが、安定した形質移入のための、ゲノムの中への組換えのために細胞の中に核酸を導入するために使用されることになっている場合、プロモーターまたは他の調節配列を含む必要はない。好ましくは、ベクターにおける核酸は、適切なプロモーターまたは宿主細胞における転写のための他の調節エレメントに作動可能に連結される。ベクターは、複数の宿主において機能する二機能性発現ベクターであってもよい。「プロモーター」によって、転写開始部位から上流の、転写に必要とされる調節領域をすべて含有するヌクレオチド配列が意味される。適したプロモーターは、真核細胞または原核細胞における発現のための構成的、組織特異的、誘発性、発生的、または他のプロモーターを含む。「作動可能に連結される」は、転写がプロモーターから開始されるように適切に位置し、配向する同じ核酸分子の一部としてつながれていることを意味する。プロモーターに作動可能に連結されるDNAは、プロモーターの「転写開始調節下に」ある。

好ましい実施形態において、プロモーターは、構成的、誘発性、または調節可能プロモーターである。

10

20

30

40

50

本発明のさらなる態様によれば、本発明による核酸分子またはベクターを用いて形質移入または形質転換される細胞が提供される。

好ましくは、上述の細胞は、真核細胞である。その代わりに、上述の細胞は、原核細胞である。

本発明の好ましい実施形態において、上述の細胞は、真菌細胞（たとえばピキア種、サッカロミセス種、アカパンカビ種）、昆虫細胞（たとえばスポドプテラ種）、哺乳動物細胞（たとえばCOS細胞、CHO細胞）、植物細胞から成る群から選択される。

本発明のさらなる態様によれば、賦形剤または担体を含む、本発明によるポリペプチドを含む医薬組成物が提供される。

本発明の好ましい実施形態において、上述の医薬組成物は、さらなる治療薬と組み合わせられる。

投与される場合、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる調製物で投与される。そのような調製物は、薬学的に許容できる濃度の塩、緩衝剤、防腐剤、適合性の担体、および任意選択で他の治療薬を規定どおりに含有していてもよい。

本発明の医薬組成物は、注射を含む、任意の通常の経路によって投与することができる。投与および適用は、たとえば経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、関節内、皮下、局所（目）、皮膚（たとえば皮膚または粘膜へのクリーム状の脂質可溶性挿入物）、経皮、鼻腔内であってもよい。

本発明の医薬組成物は、有効量で投与される。「有効量」は、単独でまたはさらなる薬もしくは共力性の薬剤と共に所望の応答をもたらす医薬品/組成物の量である。これは、一時的に疾患の進行を単に遅らせることを伴ってもよいが、より好ましくは、それは、持続的に疾患の進行を食い止めることを伴う。これは、ルーチン的な方法によってモニターすることができるまたは診断方法に従ってモニターすることができる。

対象に投与される医薬組成物の用量は、異なるパラメーターに従って、特に、使用される投与のモードおよび対象の状態（つまり年齢、性別）に従って選ぶことができる。投与される場合、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容できる量および薬学的に許容できる組成物で適用される。医薬で使用される場合、塩は、薬学的に許容できるはずであるが、薬学的に許容できない塩は、その薬学的に許容できる塩を調製するために好都合に使用されてもよく、本発明の範囲から除外されない。そのような薬理学的におよび薬学的に許容できる塩は、以下の酸から調製されるものを含むが、これらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、およびその他同種のもの。さらに、薬学的に許容できる塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、またはカルシウム塩などのようなアルカリ金属塩またはアルカリ土類塩として調製することができる。

医薬組成物は、所望される場合、薬学的に許容できる担体と組み合わせられてもよい。本明細書において使用されるような用語「薬学的に許容できる担体」は、ヒトへの投与に適した1つまたは複数の適合性の固体または液体の増量剤、希釈剤、またはカプセル化する物質を意味する。用語「担体」は、適用を容易にするために有効成分が組み合わせられる天然または合成の有機または無機成分を示す。医薬組成物の構成成分はまた、所望の医薬品効力を実質的に損なうであろう相互作用がない方法で本発明の分子とおよび互いに混合することもできる。

医薬組成物は、塩中の酢酸、塩中のクエン酸、塩中のホウ酸、および塩中のリン酸を含む適した緩衝剤を含有していてもよい。

医薬組成物はまた、任意選択で、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベン、およびチメロサルなどのような適した防腐剤を含有していてもよい。

医薬組成物は、単位剤形で好都合に与えられてもよく、薬学の技術分野においてよく知られている方法のいずれかによって調製されてもよい。方法はすべて、活性作用物質を、1つまたは複数の補助成分を構成する担体と結合させるステップを含む。一般に、組成物は、活性化化合物を、液体の担体、微粉化した固体の担体、またはその両方と均一におよび完全に結合させることならびにその後、必要であれば、産物を成形することによって調製

10

20

30

40

50

される。

経口投与に適した組成物は、カプセル、錠剤、ロゼンジなどのように、別々の単位として与えられてもよく、それぞれが、所定の量の活性化化合物を含有する。他の組成物は、シロップ剤、エリキシル剤、または乳剤などのような、水性の液体または非水系の液体中の懸濁剤を含む。

非経口投与に適した組成物は、好ましくは、レシピエントの血液と等張である滅菌した水性または非水系の調製物を好都合に含む。この調製物は、適した分散剤または湿潤剤および懸濁剤を使用して、知られている方法に従って製剤されてもよい。滅菌注射調製物はまた、たとえば1, 3-ブタンジオール中の液剤のように、無毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶剤中の滅菌注射液剤または懸濁剤であってもよい。用いられてもよい許容できる溶剤の中には、水、リンガー溶液、および等張食塩水がある。さらに、滅菌した不揮発性油は、溶剤または懸濁化剤として慣習的に用いられる。この目的のために、合成モノグリセリドまたは合成ジグリセリドを含む任意の無刺激の不揮発性油が用いられてもよい。さらに、オレイン酸などのような脂肪酸は、注射剤の調製物において使用されてもよい。経口、皮下、静脈内、筋肉内などの投与に適した担体制剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、Easton、PAにおいて見つけることができる。

本発明のさらなる態様によれば、レプチンアゴニストの投与が有効であろう状態に罹患しているヒト対象を治療するための方法であって、本発明による少なくとも1つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が提供される。

本発明の好ましい方法において、上述の状態は、肥満である。

本発明のさらなる好ましい方法において、上述の状態は、肥満関連性の状態である。

本発明の好ましい方法において、上述の肥満関連性の状態は、II型糖尿病である。

本発明の好ましい方法において、上述の肥満関連性の状態は、心疾患である。

本発明の代替の好ましい方法において、上述の状態は、免疫抑制である。

本発明のさらなる態様によれば、レプチンアンタゴニストの投与が有効であろう状態に罹患しているヒト対象を治療するための方法であって、本発明による少なくとも1つのポリペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が提供される。

本発明の好ましい方法において、上述の状態は、食欲不振症である。

本発明のさらなる好ましい方法において、上述の状態は、自己免疫疾患である。本発明の好ましい方法において、上述の自己免疫疾患は、多発性硬化症、1型糖尿病、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫性肝炎、慢性関節リウマチ、自己免疫性大腸炎、クローン病、セリアック病、自己免疫性腎炎、自己免疫性ニューロパチー（ギランバレー）、脳障害（ラスマッセン）、線維化肺胞炎から成る群から選択される。

本発明の好ましい方法において、上述のポリペプチドは、静脈内に投与される。

本発明の代替の好ましい方法において、上述のポリペプチドは、皮下に投与される。

本発明のさらなる好ましい方法において、上述のポリペプチドは、2日間隔で投与され、好ましくは、上述のポリペプチドは、1週、2週、または1か月間隔で投与される。

本発明のさらなる態様によれば、本発明によるポリペプチドまたは二量体に結合するモノクローナル抗体が提供される。

好ましくは、上述のモノクローナル抗体は、ポリペプチドまたは二量体に結合するが、レプチンまたはレプチン受容体にそれぞれ特異的に結合しない抗体である。

モノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドを含む二量体のいずれかによって提示される立体構造抗原（conformational antigen）に結合する。

本発明のさらなる態様において、本発明によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を調製するための方法であって、

i) 本発明による少なくとも1つのポリペプチドを含む免疫原を用いて免疫応答性哺乳動物を免疫するステップ、ii) 免疫された免疫応答性哺乳動物のリンパ球を骨髓腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成するステップ、

10

20

30

40

50

i i i) ステップ (i i) のハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体を、(i) のポリペプチドに対する結合活性についてスクリーニングするステップ、
i v) ハイブリドーマ細胞を培養して、上述のモノクローナル抗体を量産および/または分泌するステップ、ならびに
v) 培養上清からモノクローナル抗体を回収するステップを含む方法が提供される。

好ましくは、上述の免疫応答性哺乳動物は、マウスである。その代わりに、上述の免疫応答性哺乳動物は、ラットである。

ハイブリドーマ細胞を使用するモノクローナル抗体の産生は、当技術分野においてよく知られている。モノクローナル抗体を産生するために使用される方法は、Nature 256、495~497ページ(1975)におけるKohlerおよびMilsteinならびにDonilardおよびHoffman、Compendium of Immunology V. II、Schwartz編、1981における「Basic Facts about Hybridomas」によって開示され、これらは、参照によって組み込まれる。

本発明のさらなる態様によれば、本発明による方法によって得られるまたは入手可能なハイブリドーマ細胞株が提供される。

本明細書の説明および請求項の全体にわたって、その用語「~を含む(comprise)」および「~を含有する(contains)」および用語の変化形、たとえば「~を含む(comprising)」および「~を含む(comprises)」は、「~を含むが、これらに限定されない」を意味し、他の部分、添加剤、構成成分、整数、またはステップを除外することを意図しない(および除外しない)。

本明細書の説明および請求項の全体にわたって、文脈上、他の意味に解すべき場合を除き、単数形は複数形を包含する。特に、不定冠詞が使用される場合、明細書は、文脈上、他の意味に解すべき場合を除き、複数および単数を企図するものとして理解されたい。

本発明の特定の態様、実施形態、または実施例に関連して記載される特色、整数、特徴、化合物、化学的部分、または化学基は、矛盾しない限り、本明細書において記載される他の態様、実施形態、または実施例に適用可能であることが理解されたい。

本発明の実施形態は、ここで、ほんの一例として、以下の図に関連して記載することとする。

表1は、LR融合物名称を示す表である。

表2は、レプチン受容体に対する抗体を使用して、ELISAによって決定されるようなレプチンLR融合物の発現レベルを示す表である(nd=検出できず)。

材料および方法

インビトロ試験 レプチンの活性を検出し、評価するためのインビトロの方法は、当技術分野において知られている。たとえばLiur(Endocrinology(1997)138、8:3548~3554ページ)、Whiteら(J. Biol. Chemistry(1997)272(7):4065~4071ページ)、およびMaamraら(Endocrinology(2007)142(10):4389~4393ページ)を参照されたい。これらは、それぞれ、とりわけ、細胞ベースのアッセイにおけるレプチン受容体の発現を記載する。

さらに、レプチンLR融合物は、デュアルルシフェラーゼバイオアッセイを使用して、インビトロ活性について試験した。手短かに言えば、MCF-7哺乳動物細胞を、SIE、レプチン受容体(OBR)、STAT3によって誘発されるホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼを発現するプラスミドを用いて形質移入した(後者の3つのタンパク質は恒常的に発現される)。24時間後に、細胞は、レプチンLR融合物を用いて6時間刺激する。細胞を溶解し、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。これは、LR融合物によるレプチン受容体の刺激に比例する。恒常的に発現されるウミシイタケルシフェラーゼの活性でこの値を割ることによって、実験誤差について補正した活性を得る。

インビボ試験

インビボ動物モデルは、当技術分野において知られている。ob/obマウスモデル(

Zhangら Nature (1994) 372: 425~432ページ)は、レプチン突然変異についてホモ接合性であり、レプチンのアゴニストおよびアンタゴニストの活性を評価するために使用されてきた。Chehabら (Nature Genetics (1996) 12: 318~320ページ)、Lordら (Nature (1998) 394: 897~901ページ)、および Pellymounterら (Science (1995) 269: 540~542ページ)を参照されたい。

免疫試験

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体へのリガンドまたは受容体の結合を測定するイムノアッセイは、当技術分野において知られている。市販で入手可能な抗体は、試料におけるリガンドまたは受容体を検出するためにおよびまた競合的阻害研究における使用のためにも入手可能である。たとえば <http://www.abc.com/index.html>、Abcam PLCを参照されたい。

融合タンパク質の組換え産生

融合タンパク質の構成成分は、リガンドまたは受容体にアニールし、標的ベクターの中にクローニングするための適した制限部位を導入するように設計したプライマーを使用して、PCRによって生成した(図X1a)。PCRのための鋳型は、標的遺伝子を含み、IMAGEクローン、cDNAライブラリー、または特注合成遺伝子から得た。適切な隣接制限部位を有するリガンドおよび受容体の遺伝子を合成したら、これらは、その後、標的ベクターにおけるリンカー領域の両側にライゲーションした(図X1b)。構築物は、その後、リンカー領域の両側の2つの特有の制限部位の間への特注合成のDNAの挿入によって、ssDNA修飾技術によるリンカー領域の変更によって、適した制限部位の間へのプライマーデュプレックス/マルチプレックスの挿入によって、またはPCR修飾によって、隣接制限部位を有していない適切なリンカーを含有するように修飾した(図X1c)。

その代わりに、最適なりガンドまたは受容体のドメインにアニールするように設計した隣接配列を有するリンカーを、オリゴヌクレオチドデュプレックスを作製することによって、最初に合成し、これを、二本鎖のDNAを生成するように処理した(図X2a)。その後、「メガプライマー」としてのリンカー配列、「メガプライマー」がアニールするリガンドおよび受容体の反対側の末端に対して設計したプライマーを使用し、鋳型としてのリガンドおよび受容体を用いてPCRを行った。末端プライマーは、最適な発現ベクターへのライゲーションに適した制限部位を用いて設計した(図X2b)。

融合タンパク質の発現および精製

発現は、適した系(たとえば哺乳動物CHO細胞および大腸菌など)において実行し、これは、LR融合遺伝子を生成したベクターに依存した。発現は、その後、1つまたは複数のSDS-PAGE、未変性PAGE、ウェスタンブロットティング、ELISAを含むことができる多種多様の方法を使用して分析した。

適したレベルの発現が達成されたら、LR融合物は、精製および後の分析のための十分なタンパク質を産生するためにより大規模で発現させた。

精製は、イオン交換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、硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、サイズ排除、および/またはアフィニティークロマトグラフィーなどのような1つまたは複数のクロマトグラフィー手順の適した組み合わせを使用して実行した(ニッケル/コバルト樹脂、抗体固定化樹脂、および/またはリガンド/受容体固定化樹脂を使用)。

精製タンパク質は、1つまたは複数のブラッドフォードアッセイ、SDS-PAGE、未変性PAGE、ウェスタンブロットティング、ELISAを含むことができる、多種多様の方法を使用して分析した。

LR融合物の特徴づけ

変性PAGE、未変性PAGEゲル、およびウェスタンブロットティングは、融合ポリペプチドを分析するために使用し、ウェスタンブロットティングは、LR融合物に対して非立体構造感受性の抗体を用いて行った。未変性溶液状態の分子量情報は、Superose

G 2 0 0 分析カラムを使用するサイズ排除クロマトグラフィーおよび分析超遠心法などのような技術から得ることができる。

L R 融合物の構築

2 A 1、2 B 1 および 2 D 1 遺伝子は、O b、L B D、O b R E c、および両端に特有の適合性の制限部位を有するリンカー構成成分を生成することによって合成し、それらを相互にライゲーションして、完全な遺伝子を形成した。2 B 1 および 2 D 1 における外来配列（つまり制限部位）は、O b、L B D、および O b R E c 遺伝子の内の特有の制限部位の間に特注合成 DNA 断片（G e n e c u s t、F r a n c e）をライゲーションすることによって続いて除去し、これにより 2 B 2 および 2 D 2 を生成した。2 A 1 E c o p t 遺伝子は、特注 DNA 合成（G e n e c u s t、F r a n c e）によって生成し、p E T 2 1 a + の中にライゲーションした。2 A 1 E c o p t 配列は、大腸菌における発現のためにコドン最適化されており、C 末端 H i s タグを有する。

10

L R 融合物の発現

哺乳動物発現：

安定細胞株は、形質移入試薬として F u g e n e - 6 を使用して、6 ウェルプレートにおいて改良 I n v i t r o g e n ベクター p S e c T a g - V 5 / F R T - H i s t を使用して生成した。C H O F l p - I n 細胞は、発現ベクターおよび細胞染色体の「ホット-スポット」への L R 融合物遺伝子の組換えを引き起こす酵素である f l p リコンビナーゼを発現するプラスミドである p O G 4 4 を用いて同時形質移入した。ハイグロマイシン B は、陽性組換え体を有する細胞を選択するために使用した。

20

安定細胞株が確立されたら、それらを、50 ~ 70 % の培養密度で 7 5 c m ² 培養プレート上で成長させ、培地を無血清培地に交換した。培養物を、さらに 2 ~ 4 日間、インキュベートし、その後、培地試料を採取した。これらを、13 % S D S - P A G E ゲル上で流し、免疫プロットングのために P V D F 膜に転写した。P B S + 0 . 0 5 % (v / v) T w e e n 2 0 中の 5 % (w / v) 牛乳タンパク質中でブロックした後に、試料検出は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（H R P）抱合二次抗体と共に特異的抗レプチン抗体を使用して実行した。視覚化は、H R P 検出キットを使用する、写真用フィルム上での化学発光によるものとした。

哺乳動物系からの L R 融合物の発現を示す免疫プロットを図 2 2 に示す。

大腸菌発現：

p E T 2 1 a + : 2 A 1 E c o p t を、化学的コンピテント大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 細胞に形質転換した。その後、2 A 1 E c o p t を発現するクローンは、カルベニシリン（100 μ g / m l）を補足した L B 培地において成長させ、室温で、平台型の振盪機上で成長させた。誘発は、0 . 4 の O D ₆₀₀ で 1 m M I P T G を用いて行い、培養物を一晩成長させた。その後、細胞を摘出し、溶解し、その後、試料を S D S - P A G E ゲル上で流し、クマシー染色したまたは免疫プロットした。

大腸菌系からの L R 融合物の発現を示す免疫プロットを図 2 3 に示す。

L R 融合物の精製

大腸菌が発現した L R 融合物の精製（2 A 1 E c o p t）

2 A 1 E c o p t は、プラスミド p E T 2 1 a + : 2 A 1 E c o p t から大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 細胞において発現された。

40

2 A 1 E c o p t は、N i - P r o b o n d 樹脂カラムを使用して精製した。溶解した細胞の不溶性画分は、2 % デオキシコール酸ナトリウムを用いて 4 回および蒸留水を用いて 2 回洗浄して、封入体調製物を得た。このステップにより、ほとんどの混入タンパク質を除去し、2 A 1 E c o p t について > 80 % の純度を得た；図 2 4。

統計

2 つのグループは、それらの分散が正常に分布した場合、スチューデント検定を用いてまたは正常に分布しなかった場合、スチューデント-サタースウェイト検定（S t u d e n t - S a t t e r t h w a i t e ' s t e s t）によって比較した。分布は、F 検定を用いて試験した。一元配置 A N O V A は、3 つ以上のグループの平均値を比較するため

50

に使用し、有意水準が $p < 0.05$ であった場合、個々の比較はダネット検定を用いて行った。統計的検定はすべて、5%の有意水準で両側とし、欠測値に対するインピュテーションは行わなかった。

実施例 1 : 2 A 1

BamHIおよびHindIIIが側面に位置する、レプチン受容体(OBR)のレプチン結合ドメイン(LBD)ドメインをコードするDNAをPCRによって産生した。その後、これを、改良pSecTag-FRT-V5-His TOPOベクターの中にライゲーションして、pSecTagLinkSSLBDを産生した(図15a)。NheIおよびBamHIが側面に位置する、レプチンをコードするDNAを、プライマー; NheObsSF(5'-gggaaagctagccaccatgcatctggggaaaccctgtgcg-3')およびObBamR(5'-gggaaaggatccgcacccagggctgaggtcc-3')を使用してPCRによって産生した。これを、pSecTagLinkSSLBDの中にライゲーションして、pSecTag2A1(1m)を産生した(図15b)。リンカー領域は、A1eIおよびNsiIの制限部位の間に特注合成し、これをpSecTag2A1(1m)に挿入して、pSecTag2A1stopを得た(図15c)。pSecTag2A1stopをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の中に形質移入し、一時的なおよび安定した発現細胞株を作製した。しかしながら、レプチンに対する抗体を使用する発現培地のウェスタンブロットは、2A1が発現したことを示した(図16)。2A1はまた、大腸菌細胞においても発現した。2A1のアミノ酸配列は、大腸菌コドン使用頻度について最適化して翻訳し戻した。コドン最適化遺伝子(2A1Ecopt)を特注で遺伝子合成し、その後、pET21a+発現ベクターの中に挿入し、タンパク質を大腸菌BL21(DE3)細胞から発現した。

実施例 2 : 2 B 1

BamHIおよびHindIIIが側面に位置する、レプチン受容体細胞外ドメイン(OBRex)をコードするDNAをPCRによって産生した。その後、これを、改良pSecTag-FRT-V5-His TOPOベクターの中にライゲーションして、pSecTagLinkSSOBRexを産生した(図17a)。NheIおよびBamHIが側面に位置する、レプチンをコードするDNAを、プライマー; NheObsSF(5'-gggaaagctagccaccatgcatctggggaaaccctgtgcg-3')およびObBamR(5'-gggaaaggatccgcacccagggctgaggtcc-3')を使用してPCRによって産生した。これを、pSecTagLinkSSOBRexの中にライゲーションして、pSecTag2B1(1m)を産生した(図17b)。リンカー領域は、A1eIおよびBstBIの制限部位の間に特注合成し、これをpSecTag2B1(1m)に挿入して、pSecTag2B1stopを得た(図17c)。pSecTag2B1stopをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の中に形質移入し、一時的なおよび安定した発現細胞株を作製した。発現レベルは、OBRに対する抗体を使用するELISAによって測定されるように、低度なng/mlレベルであることが分かった(表2)。しかしながら、発現培地のウェスタンブロットが、より高度なレベルの発現が達成されたことを示唆するので(図16)、これらの発現レベルは、ELISAによって過小評価された可能性がある。

実施例 3 : 2 D 1

pSecTag2D1stopを、上記のpSecTag2B1stopに類似する方法において合成した。pSecTag2B1stopをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の中に形質移入し、一時的なおよび安定した発現細胞株を作製した。発現レベルは、OBRに対する抗体を使用するELISAによって測定されるように、低度なng/mlレベルであることが分かった(表2)。しかしながら、発現培地のウェスタンブロットが、より高度なレベルの発現が達成されたことを示唆するので(図16)、これらの発現レベルは、ELISAによって過小評価された可能性がある。

実施例 4 インビトロバイオアッセイ結果

【 14 a 】

Figure 14a

```

ATGATTTGTCAAAATTCCTGCTGGGTTTGTACATGCGGAATTAATTAATGCGTAACCTCCG
ggacattatggagacgctgttgaccctgaatttfaatccaaagtgtaactccttctcaacttatc
caaaacaccttccactgttcttccggagtgacgaatagaacctgctccttatgtgcagaca
acattgagggaagacatttggttcaacagtaattcttattttttcaaaaatagatgcaaac
tggacaatcacgtgctgctcaaaaggagactaaaatttctcactgttattgtggatcattatt
taagaactctccaggaaatataactcaaggccactctttatattgtctccggaggtgttag
aagatccactcctgttctccaaaaggactttccagatggcttccccaattccagggttccat
gaatgtgtgaatgctctgctcgtgccaacgcaactcaacgacactcctctatgtgttt
gaaaatcacactcgtggagtaatttccagcactctaatgtcagttcagcccaataatagg
tgaagcctgatccacatttagtttgcataatggaatcacagatgatggttaattaaagattctc
tggccagcccccacttggtaaccttccactccaatccaaagcagatgattgtgtgtgagtagt
aacagttatccaggaaagtgcaagattgtctcagctacactcctcgtagtagacagatatactc
ctgggtctcgtatgagttccaggtgagggcaagagactggatgcccaggaaactcggagtagc
tggagtactcctcgtctcttaccacaagaatgtcatataacttccactcaaaatctgcaacag
tgttggctcaatgttctcttccactcgtatataagaaggaaacaagattgttccctcaaaaag
agatgttttggtagaatttagctgagaaattctccaaagcagatgattgtgtgtgagtagt
catgttagcaagttactttttccactcgaatgaacaaacctcggagaaatttaccatatac
tgcagtgactgctgcaatgaatgcatatcgtatcgtgtaattatattgtagttagt
tcaatcaatctcactgtgaaactgattggtacttaacaaatgactgcaagtgtaacc
agtcaactcagctcactgcaagaaacttgcattgaggtatcatagagcagccttactg
tcttgcattccactcattcactccatctcagcccaaaagtgtctatttggagtagtggtt
ttatagtagcaatttccagcaacttctccttatactcgaacaaatggtggattagtagcaat
cactctcagttcactgactcctccacaactgtgctcctcctgactcgtggtgagccact
gctccactcagtgtagaagcagaattactataaacattggattatgaaatattctgggaa
agccagctcttccagagaataactcactccagattcagatggttcaagtgaaagaaagta
caatggagagtagtaggtttagtagcaaaatcaaatctgtcaggtcccaagttccagactt
ggagcaatccagctcacagttgtcattgagat
GGTGGCGAGGAGTGTGGTGGCGAGGTAGCGGTGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGAGGTTCCGGTGG
CGGAGGTTGTTGGTGGCGAGGTTAGC
GTTCGCATCAAATTCCTGAGTGCACCAACCAACCTTCATCAGACAATTTGTCACCAAGATCAA
TGCAATTCACACACAGCAGTCTGCTCTCCCAACAGAAAGTCAACCGGTTGACTTCATCTCTG
GGCTCCACCCCTCTGACCTTATCCAAAGTGGACAGACACTGGCACTTACCAACAGATCCTC
ACCAATGCTTCACAGAACTGATCCAAATATCCACGACTGGAGAACCTCCGGGATCTTCT
TCACGCTGGCCCTCTTAAGAGCTGCCCTTTCCTGGCCAGCTGGCTGGAGACCTTCGACA
GCTCGGGGCTGTCTTGAACCTTTCAGCTACTCCACAGAGGTTGGTCCCTGAGCAGGCTCGAG
GGTCTCTCAGACATGCTGTGGCAGCTGACCTCAGCCCTCGGTTGCTtaatga

```

【 14 b 】

Figure 14b

```

MIGKPCVLLHHEFIVITA
ghyetavepktnsegthfaniakttfhccfrseqdrnosl cadniegkttfvstvnslvfqqidan
vniqwkldkikificyeiefrlnlfrnykwhllylvpeviedplvpgkfgwfhcncevh
ecccelpvptaklndtlmlclktsggvifqspmvqpinmvpkppplghmeitddgnlkias
waspplvpfplqykvysenstvi readkivsatsllvdsilpgasvayvrgkrldgpgwisd
wstprvfttdqvifypkiltsvgsnsvfhciykenkivpskei vwmnl aekipqaydvsvd
hvkvtifininetkprkiftvdavycnehechryaelvi dvniniecedtdyiltmcorwst
stiqplaeatliqlryhrsllycdidpslhipisepkdyldgdfyeci fgpifllsgytmwim
hslglspptcvlpdsvvklppasvkaeitiniglikiswepfpennlqfrylgkew
qkmyevyda ksvslpvpdlcavyvqvrkrl dglgywanwspaytvmdGGGSGGGSGG
GGSGGGSGGGSGGGSGGSPVPIQKVDVDTKLIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFI PGLH
PFLTLRMDQTLAVYQQFLTSMPSRNVQISNDLENLRDLHLVAFSKSCHLFWASGLBTLDSLQ
GVLASGYSTFVVALSRUQSLQMLWQLDLSLPGC

```

【 16 】

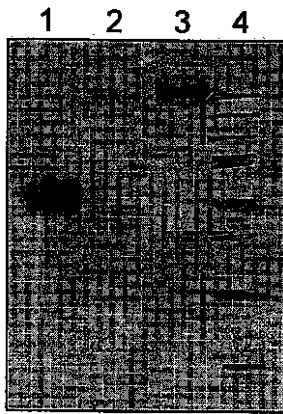


Figure 16

【 15 】

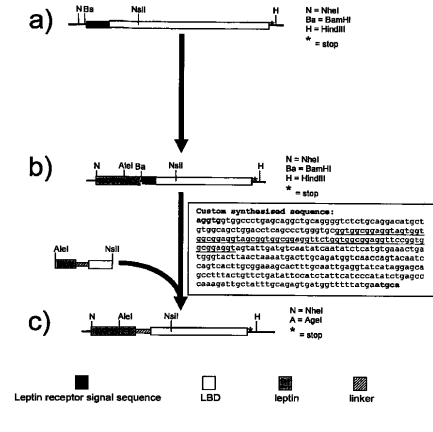


Figure 15

【 17 】

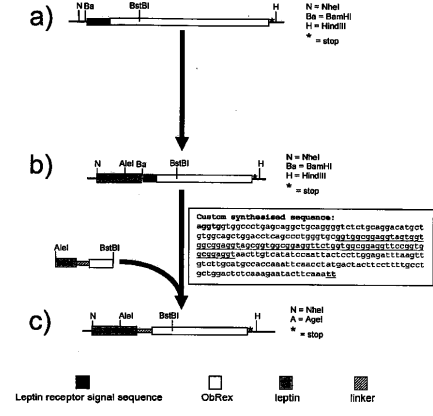


Figure 17

【 18 】

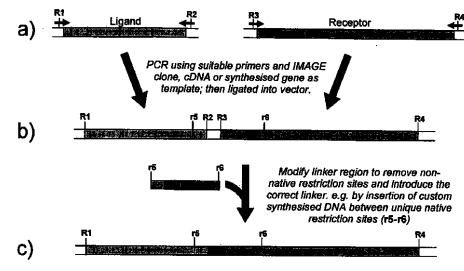
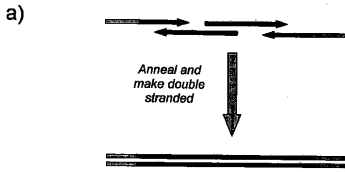
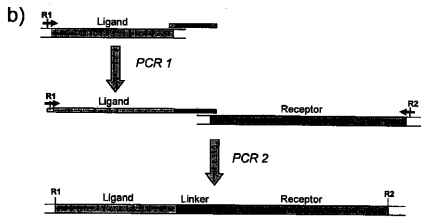


Figure 18

【 19 a)】



【 19 b)】



【 20】

Figure 20
1-21 Signal, 840-862 transmembrane, 863-1165 cytoplasmic (numbering includes signal)

MICGKFCVLLHMEFLVYIFAFNLVPTTFWRKLSCHFPNSTDYDFLLPAGLSKNVSNNGHYETAVERFK
 FNSGTHFNSLSTTFHCCFSEQDRNCSLCDNIEGKTFVSTVNSLVFQGITDMNNTQCMIGDLKLFIC
 YVESLFKNLFRNRYKVVHLLVPEVLEDSLPVQKGSFQMVHCNCSVHBCCECLVVPVAKLNDOTLMLCL
 KITSGVIFQSPFMSVQPINWKPDPPLGLMEITDDGNLKIWSSEPLVFPFLQVQVYSENSTVIREA
 DKIVKPSHLVDSILPSSYYVQVRKLDGFGINSWSTFRVFTQVYFPPKILTSGVSNVSHCIYK
 KENKIVFSELVWNNLAKKI PQSOYDVVSDVNSVRYFTFALNETKRGKFTYDARVYCCNEHCHRYAELY
 VIDVNIISCEVGLTKMTCRWSTSTQSAEASTLQLRVHRSSLYCSDIPIHPISEFVCLGSDGYE
 CTFPFIPLSGYTWIRINHSLGSDSPPTCVLPDSVVKPLPSSVKAETIINIGLLKISWEKPVFFENNL
 QDPIRYGLSGEVQWRYEYVDKSNVSLVPELCAVAVQVRKRLDGLGYNSNNSNPAAYTVVMDIKVP
 MRGSEFVRLINDPMKSKVNLTKLWPKMNDLCSQVRYVIMHESNCTMSDVGNIHTFTFLMTQAR
 TVTVLAINISGASVANFNLTFSWMSKVINIVQSLSAYPELNSCVIVNSLPSDYKLYEYIIDWNLNEDG
 EIKWLISSSVKYYIHDHFIPIEKYQFSLVPIFMEGVGKPKINSFTQDDIEKHQSDaglyvfvvifss
 slllgclliahgckklfwedvmpkncwagglnfgtpatfehlfikhtasvtogpillepetisadis
 vtaawkdeemptvrelletcldegeveisagfnvntseagtevtvyeasgrqpfvkyatlianak
 paetgeegllinsvtkofesknplkdfansawelaeqafzileagpniisphiifaeplidellkleg
 nfpennndksyylygvtaiikkraevlltdksrvaqfpapclfdtrvlgdsachfvnennlqtsakk
 tfasypqfqtostqtkhinaenkaodlty

【 23】

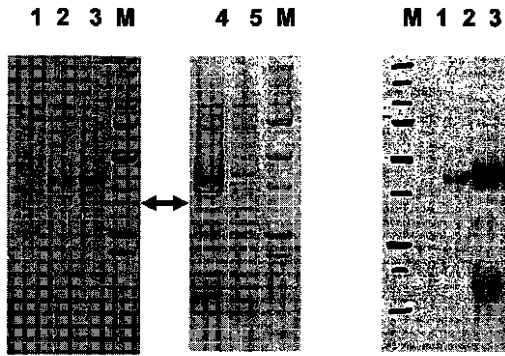


Figure 23

【 24】

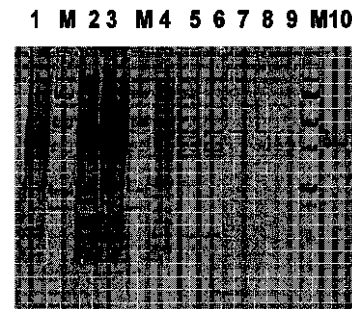


Figure 24

【 21】

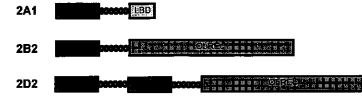


Figure 21

【 22】

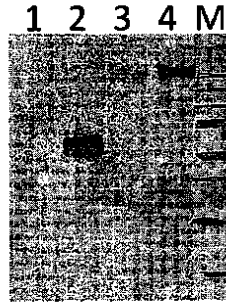


Figure 22

【 25】

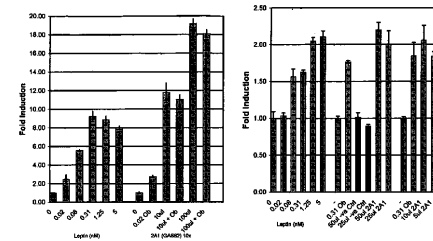


Figure 25

【 26】

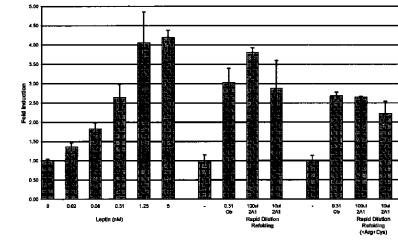


Figure 26

【配列表】

2010535486000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/002489

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K14/575	C07K14/715	C12N15/62
ADD. A61K38/22	C07K16/00	G01N33/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/96565 A (ASTERION LTD [GB]; ROSS RICHARD [GB]; ARTYMIUK PETER [GB]; SAYERS JON) 20 December 2001 (2001-12-20) the whole document	1, 2, 5, 7, 9-11, 16, 17, 19, 20, 25-27, 41-74.
A	WO 2006/010891 A (ASTERION LTD [GB]; ARTYMIUK PETER [GB]; PRADHANANGA SARBENDRA [GB]; SA) 2 February 2006 (2006-02-02) page 6, line 28 - line 29 page 13, line 10 - page 14, line 2	
A	WO 99/02552 A (YEDA RES & DEV [IL]; REVEL MICHEL [IL]; CHEBATH JUDITH [IL]; LAPIDOT T) 21 January 1999 (1999-01-21) the whole document	
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 12 November 2008		Date of mailing of the international search report 01/12/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wiame, Ilse

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/002489

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FONG T M ET AL: "Localization of leptin binding domain in the leptin receptor" MOLECULAR PHARMACOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 53, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 234-240; XP002329230 ISSN: 0026-895X abstract	
A	DATABASE UniProt [Online] 1 February 1995 (1995-02-01), "RecName: Full=Leptin; AltName: Full=Obesity factor; AltName: Full=Obese protein; Flags: Precursor;" XP002501728 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P41159 Database accession no. P41159 the whole document	
A	DATABASE UniProt [Online] 1 February 1996 (1996-02-01), "RecName: Full=Leptin receptor; Short=LEP-R; AltName: Full=OB receptor; Short=OB-R; AltName: Full=HuB219; AltName: CD_antigen=CD295; Flags: Precursor;" XP002501729 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P48357 Database accession no. P48357 the whole document	
A	WO 2007/080404 A (ASTERION LTD [GB]; MATERESE GIUSEPPE [IT]) 19 July 2007 (2007-07-19) abstract page 10, line 4 - page 12, line 20	52-56, 58-60
X	FAZELI ET AL: "Identification of a monoclonal antibody against the leptin receptor that acts as an antagonist and blocks human monocyte and T cell activation" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 312, no. 1-2, 30 May 2006 (2006-05-30), pages 190-200, XP005479381 ISSN: 0022-1759 abstract	67,71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/002489

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	WILKINSON IAN R ET AL: "A ligand-receptor fusion of growth hormone forms a dimer and is a potent long-acting agonist" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol: 13, no. 9, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 1108-1113; XP009089546 ISSN: 1078-8956 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2008/002489

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0196565	A	20-12-2001	AU 7423401 A 24-12-2001
			CA 2447632 A1 20-12-2001
			EP 1290170 A2 12-03-2003
			JP 2004503243 T 05-02-2004
			US 2004071655 A1 15-04-2004
WO 2006010891	A	02-02-2006	AU 2005266184 A1 02-02-2006
			CA 2575441 A1 02-02-2006
			EP 1771467 A2 11-04-2007
			JP 2008507292 T 13-03-2008
			KR 20070067678 A 28-06-2007
WO 9902552	A	21-01-1999	AT 342915 T 15-11-2006
			AU 758161 B2 20-03-2003
			AU 8127198 A 08-02-1999
			BG 64680 B1 30-11-2005
			BG 104070 A 30-11-2000
			BR 9812096 A 18-07-2000
			CA 2295936 A1 21-01-1999
			CN 1269835 A 11-10-2000
			DE 69836217 T2 23-08-2007
			DK 0991661 T3 05-02-2007
			EA 4793 B1 26-08-2004
			EE 200000012 A 15-08-2000
			EP 0991661 A2 12-04-2000
			ES 2271999 T3 16-04-2007
			HK 1031895 A1 09-09-2005
			HU 0002426 A2 28-11-2000
			JP 2001509371 T 24-07-2001
			NO 20000086 A 08-03-2000
			NZ 502139 A 28-03-2002
			PL 338002 A1 25-09-2000
			SK 62000 A3 11-07-2000
			US 7198781 B1 03-04-2007
			US 2007172455 A1 26-07-2007
WO 2007080404	A	19-07-2007	NONE

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 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K 14/52	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P	3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P	5/14 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	1 0 1
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
G 0 1 N	33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
		G 0 1 N 33/577	B
		C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ロス, リチャード

イギリス国, シェフィールド エス 1 0 2 ティーエヌ, ウェスタンバンク, ファース コート, アステリオン・リミテッド

(72)発明者 セイヤーズ, ジョン

イギリス国, シェフィールド エス 1 0 2 ティーエヌ, ファース コート, ウェスタンバンク, アステリオン・リミテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA53 BA63 CA04 CA07 DA02 DA05 DA11
EA02 EA04 FA02 GA01 GA11 HA01 HA11
4B064 AG02 AG20 AG27 CA19 CA20 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA90X AA90Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 BA01 BA41 BA44 DB01 DB63 MA01
MA65 MA66 NA14 ZA022 ZA362 ZA592 ZA662 ZA702 ZA752 ZA812
ZA962 ZB082 ZB152 ZC062 ZC352
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA01 DA51 DA76 EA20 EA50
FA72 FA74

专利名称(译)	瘦素融合蛋白		
公开(公告)号	JP2010535486A	公开(公告)日	2010-11-25
申请号	JP2010519503	申请日	2008-07-23
申请(专利权)人(译)	Asuterion有限公司		
[标]发明人	アーティミュークピーター ロスリチャード セイヤーズジョン		
发明人	アーティミューク,ピーター ロス,リチャード セイヤーズ,ジョン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C07K14/52 A61K38/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P37/06 A61P3/00 A61P25/00 A61P5/14 A61P1/16 A61P19/02 A61P29/00 A61P1/00 A61P13/12 A61P11/00 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/5759 C07K14/715 C07K2319/31 C07K2319/32 C07K2319/75		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K16/18 C07K14/52 A61K37/02 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P37/06 A61P3/00 A61P25/00 A61P5/14 A61P1/16 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P1/00 A61P13/12 A61P25/00.101 A61P11/00 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA53 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024 /DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG02 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064 /DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065 /AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/DB01 4C084 /DB63 4C084/MA01 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA362 4C084 /ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA702 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA962 4C084/ZB082 4C084 /ZB152 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045 /CA40 4H045/DA01 4H045/DA51 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	内田直人		
优先权	2007015216 2007-08-03 GB 60/956360 2007-08-16 US		
其他公开文献	JP2010535486A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及瘦蛋白融合多肽；编码所述多肽的核酸分子和使用所述多肽的治疗方法。

