

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6839087号  
(P6839087)

(45) 発行日 令和3年3月3日(2021.3.3)

(24) 登録日 令和3年2月16日(2021.2.16)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 15/09 Z N A Z

C 07 K 14/435 (2006.01)

C 07 K 14/435

C 07 K 19/00 (2006.01)

C 07 K 19/00

請求項の数 22 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願2017-539548 (P2017-539548)  
 (86) (22) 出願日 平成28年1月27日 (2016.1.27)  
 (65) 公表番号 特表2018-509887 (P2018-509887A)  
 (43) 公表日 平成30年4月12日 (2018.4.12)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2016/051657  
 (87) 國際公開番号 WO2016/120307  
 (87) 國際公開日 平成28年8月4日 (2016.8.4)  
 審査請求日 平成31年1月25日 (2019.1.25)  
 (31) 優先権主張番号 15152826.2  
 (32) 優先日 平成27年1月28日 (2015.1.28)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 509029645  
 ピエリス ファーマシューティカルズ ゲ  
 ーエムベーハー  
 ドイツ連邦共和国 85354 フライジ  
 ングーヴァイエンステファン リゼーマイ  
 トネルーストラッセ 30  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】血管新生に特異的な新規のタンパク質

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

検出可能な親和性でAng-2に結合することができ、成熟ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(hNGAL)の直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO: 16)と比較して、以下の変異アミノ酸残基のセットの1つを含み、SEQ ID NO:1～14からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(hNGAL)ムテイン：

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Thr; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; および Lys 134 → Glu;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → His; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → His; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Phe; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Trp; および Lys 134 → Trp; 10

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Leu; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Val; および Lys 134 → Ala;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Val; Ile 41 → Glu; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Thr; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asn; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Trp; および 20 Lys 134 → Trp;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Ile; Leu 70 → Tyr; Arg 72 → Thr; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Tyr; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; および Lys 134 → Glu;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Glu; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 30

103 → Gln; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; および Lys 134 → Glu;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Glu; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; および Lys 134 → Glu;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; および Lys 134 → Glu;

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; および Lys 134 → Glu;

(j) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Val; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; および Lys 134 → Glu;

(k) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Leu; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; および Lys 134 → Glu;

(l) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Asn 116 → Asp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; および Lys 134 → Ala;

(m) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Val 126 → Met; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; および Lys 134 → Ala; または

10

20

30

40

(n) Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Asp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Val; および Lys 134 → Ala

。

## 【請求項 2】

約5nM以下のKDでAng-2に結合することができる、請求項1記載のhNGALムテイン。

10

## 【請求項 3】

細胞に基づく増殖アッセイ法において、約5nM以下のIC50値で、内皮細胞増殖を阻害するか、または減少させることができる、請求項1または2記載のhNGALムテイン。

## 【請求項 4】

ヒトAng-2とマウスAng-2の両方と交差反応性である、請求項1～3のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

## 【請求項 5】

検出可能な親和性でマウスAng-2に結合することができる、請求項1～4のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

## 【請求項 6】

ヒトAng-2のhTie-2に対する結合を約25nM以下のIC50値で妨害することができる、請求項1～5のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

20

## 【請求項 7】

マウスAng-2のhTie-2に対する結合を約25nM以下のIC50値で妨害することができる、請求項1～6のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

## 【請求項 8】

SEQ ID NO: 1～14からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～7のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

## 【請求項 9】

SEQ ID NO: 1～14からなる群より選択される配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する、請求項1～8のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

30

## 【請求項 10】

有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、細胞分裂阻害剤、毒素、金属複合体、金属、およびコロイド金からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている、請求項1～9のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

## 【請求項 11】

hNGALムテインが、そのN末端および/またはそのC末端において、タンパク質、タンパク質ドメイン、またはペプチドである融合パートナーに融合している、請求項1～10のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

40

## 【請求項 12】

hNGALムテインの血清半減期を延長する化合物にコンジュゲートされている、請求項1～11のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

## 【請求項 13】

請求項1～12のいずれか一項記載のhNGALムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

## 【請求項 14】

請求項13記載の核酸分子を含む宿主細胞。

## 【請求項 15】

hNGALムテインが、該hNGALムテインをコードする核酸から出発して、遺伝子操作方法に

50

より產生される、請求項1～12のいずれか一項記載のhNGALムテインを產生する方法。

【請求項16】

請求項1～12のいずれか一項記載のhNGALムテインを含む薬学的組成物。

【請求項17】

少なくとも(a)請求項1～12のいずれか一項記載のhNGALムテインおよび(b)抗血管新生剤の組み合わせを含む、組成物。

【請求項18】

抗血管新生剤が、(i)Ang-1、Ang-2、Ang-3、Ang-4、および/またはTie-2のアンタゴニスト；(ii)Flt1、KDR、Flt4、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PIGF、および/またはEG-VEGFのアンタゴニスト；(iii)デルタ様リガンド4(DLL4、血管特異的ノッチリガンド)のアンタゴニスト、(iv)上皮増殖因子受容体(EGFR)のアンタゴニスト；ならびに(v)サイトカイン阻害剤からなる群より選択される、請求項17記載の組成物。  
10

【請求項19】

無秩序な血管新生に関連している疾患または障害の治療、予防、および/または改善に適した薬学的組成物を製造するための、請求項1～12のいずれか一項記載のhNGALムテインまたは請求項17もしくは18記載の組成物の使用。

【請求項20】

対象におけるAng-2の結合のための組成物を製造するための、請求項1～12のいずれか一項記載のhNGALムテインまたは請求項17もしくは18記載の組成物の使用。  
20

【請求項21】

対象における血管新生を部分的にまたは完全に阻害するための組成物を製造するための、請求項1～12のいずれか一項記載のhNGALムテインまたは請求項17もしくは18記載の組成物の使用。

【請求項22】

無秩序な血管新生に関連している疾患または障害が、腫瘍増殖、眼障害、血管疾患、炎症性疾患または感染症、癌、眼の新血管新生疾患、関節炎、および乾癬からなる群より選択される、請求項19記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

I. 背景

血管新生、すなわち既存の血管からの新しい血管の形成は、多くの生理学的プロセスおよび病理学的プロセスに不可欠である。通常は、血管新生は血管新生促進因子および抗血管新生因子によってしっかりと調節されているが、癌、眼の新血管新生疾患、関節炎、および乾癬などの疾患の場合には、このプロセスはおかしくなり得る。Folkman, J., Nat. Med., 1:27-31 (1995) (非特許文献1)。無秩序な血管新生または望まれない血管新生に関連していることが公知であるいくつかの疾患がある。このような疾患には、眼の新血管新生、例えば網膜症(糖尿病性網膜症を含む)、加齢黄斑変性症、乾癬、血管芽細胞腫、血管腫、動脈硬化症、炎症性疾患、例えば、リウマチ様もしくはリウマチ性の炎症性疾患、特に関節炎(関節リウマチを含む)、または他の慢性炎症性障害、例えば慢性喘息、動脈アテローム性硬化または移植後アテローム性動脈硬化症、子宮内膜症、ならびに新生物疾患、例えば、いわゆる固形腫瘍および液状(もしくは造血器)腫瘍(例えば、白血病およびリンパ腫)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。望まれない血管新生に関連している他の疾患は、当業者には明らかであると考えられる。  
40

【0002】

多くのシグナル伝達系が血管新生の調節に関係付けられているが、最もよく特徴がわかつており、最も内皮細胞選択性の1つは、血管内皮内で選択性に発現されるTie-2受容体型チロシンキナーゼ(「Tie-2」または「Tie-2R」と呼ばれる(「ORK」とも呼ばれる)；マウスTie-2は「tek」とも呼ばれる)およびそのリガンド、すなわちアンギオポエチンを必要とする(Yancopoulos, G. D., et al., Nature 407 [2000] 242-48 (非特許文献2)；Ga  
50

Ie, N. W. and Yancopoulos, G. D., Genes Dev. 13:1055-1066 [1999] (非特許文献3))  
。

〔 0 0 0 3 〕

アンギオポエチン-1(「Ang-1」、あるいはANGPT1またはAng1と略される)からアンギオポエチン-4(「Ang-4」)まで、4種の公知のアンギオポエチンが存在する。これらのアンギオポエチンは、「Tie-2リガンド」とも呼ばれる(Davis, S., et al., *Cell*, §7:1161-1169 [1996] (非特許文献4) ; Grosios, K., et al, *Cytogenet Cell Genet*, §4:118-120 [1999] (非特許文献5) ; Holash, J., et al, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42:1611-1625 [1999] (非特許文献6) ; Koblizek, T. I., et al, *Current Biology*, S:529-532 [1998] (非特許文献7) ; Lin, P., et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:8829-8834 [1998] (非特許文献8) ; Maisonpierre, P. C, et al, *Science*, 277:55-60 [1997] (非特許文献9) ; Papapetropoulos, A., et al, *Lab Invest*, 79:213-223 [1999] (非特許文献10) ; Sato, T. N., et al, *Nature*, 375:70-74 [1998] (非特許文献11) ; Shyu, K. G., et al, *Circulation*, 95:2081-2087 [1998] (非特許文献12) ; Suri, C, et al, *Cell*, <37:1171-1180 [1996] (非特許文献13) ; Suri, C, et al, *Science*, 252:468-471 [1998] (非特許文献14) ; Valenzuela, D. M., et al, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96:1904-1909 [1999] (非特許文献15) ; Witzenbichler, B., et al, *J Biol Chem*, 273:18514-18521 [1998] (非特許文献16))。

[ 0 0 0 4 ]

Ang-1とAng-2の両方とも、3nM(Kd)の親和性でTie-2に結合する(Maisonpierre, P. C., et al., Science 277 (1997) 55-60 (非特許文献9))。培養内皮細胞においてAng-1がTie-2に結合すると受容体リン酸化が促進されるのに対し、Ang-2はTie-2受容体リン酸化の刺激と拮抗の両方を行うことが観察されている(Davis, S., et al, [1996], 前記(非特許文献4)；Maisonpierre, P.C., et al, [1997], 前記(非特許文献9)；Kim, I, J.H. Kim, et al, Oncogene 19(39): 4549-4552 (2000) (非特許文献17)；Teichert-Kuliszewska, K., P.C. Maisonpierre, et al, Cardiovascular Research 49(3): 659-70 (2001) (非特許文献18))。マウスのTie-2ノックアウトおよびAng-1ノックアウトの表現型は、類似しており、Ang-1に刺激されたTie-2リン酸化によって、内皮細胞-支持細胞接着の維持を通して、子宮内で発達中の血管のリモデリングおよび安定化が実現することが示唆される(Dumont, D. J., et al, Genes & Development, 8:1897-1909 [1994] (非特許文献19)；Sato, T. N., et al, Nature, 376:10-14 [1995] (非特許文献20)；Suri, C, et al, [1996], 前記(非特許文献13))。血管安定化におけるAng-1の役割は、成体で保存されていると考えられており、成体においてAng-1は広範囲かつ構成的に発現される(Hanahan, D., Science, 277:48-50 [1997] (非特許文献21)；Zagzag, D., et al, Experimental Neurology, 59:391-400 [1999] (非特許文献22))。一方、Ang-2発現は、主として血管リモデリングの部位に限定されており、そこでAng-1機能を妨害し、それによって血管新生の助けとなる血管可塑性の状態を誘導すると考えられている(Hanahan, D., [1997], 前記(非特許文献21)；Holash, J., et al, Science, 284:1994-1998 [1999] (非特許文献23)；Maisonpierre, P. C, et al, [1997], 前記(非特許文献9))。

[ 0 0 0 5 ]

negative Ophthalmology & Visual Science, 40:1912-1920 [1999] (非特許文献29) ; Stratmann, A., et al, American Journal of Pathology, 153: 1459-1466 [1998] (非特許文献30) ; Tanaka, S., et al, J Clin Invest, 203:34-345 [1999] (非特許文献31) ; Yoshida, Y., et al, International Journal of Oncology, 25:1221-1225 [1999] (非特許文献32) ; Yuan, K., et al, Journal of Periodontal Research, 35:165-171 [2000] (非特許文献33) ; Zagzag, D., et al, [1999] 前記 (非特許文献22) )。有効な抗Ang-2療法は、癌、網膜症、関節炎、および乾癬など血管新生に関連している疾患を患っている膨大な患者集団のためになると考えられる。

## 【0006】

したがって、Ang-2を特異的に認識し結合する新たな化合物を同定することが、大いに必要とされている。このような化合物は、Ang-2活性に関連している疾患状態の診断的スクリーニングおよび治療的介入に有用であると思われる。したがって、Ang-2活性を調整するための、Ang-2に特異的に結合する化合物を提供することが、本開示の目的である。本明細書において開示するそのような化合物は、ヒトリボカリン2(好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン、「hNGAL」としても公知)に由来するムテインという形をとる。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0007】

- 【非特許文献 1】 Folkman, J., Nat. Med., 1:27-31 (1995) 10
- 【非特許文献 2】 Yancopoulos, G. D., et al., Nature 407 [2000] 242-48 20
- 【非特許文献 3】 Gale, N. W. and Yancopoulos, G. D., Genes Dev. 13:1055-1066 [1999]
- 【非特許文献 4】 Davis, S., et al., Cell, §7:1161-1169 [1996]
- 【非特許文献 5】 Grosios, K., et al, Cytogenet Cell Genet, §4:118-120 [1999]
- 【非特許文献 6】 Holash, J., et al, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1611-1625 [1999]
- 【非特許文献 7】 Koblizek, T. I., et al, Current Biology, S:529-532 [1998]
- 【非特許文献 8】 Lin, P., et al, Proc Natl Acad Sci USA, 95:8829-8834 [1998]
- 【非特許文献 9】 Maisonpierre, P. C, et al, Science, 277:55-60 [1997]
- 【非特許文献 10】 Papapetropoulos, A., et al, Lab Invest, 79:213-223 [1999] 30
- 【非特許文献 11】 Sato, T. N., et al, Nature, 375:70-74 [1998]
- 【非特許文献 12】 Shyu, K. G., et al, Circulation, 95:2081-2087 [1998]
- 【非特許文献 13】 Suri, C, et al, Cell, <37:1171-1180 [1996]
- 【非特許文献 14】 Suri, C, et al, Science, 252:468-471 [1998]
- 【非特許文献 15】 Valenzuela, D. M., et al, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96:1904-1909 [1999]
- 【非特許文献 16】 Witzenbichler, B., et al, J Biol Chem, 273:18514-18521 [1998]
- 【非特許文献 17】 Kim, I, J.H. Kim, et al, Oncogene 19(39): 4549-4552 (2000)
- 【非特許文献 18】 Teichert-Kuliszewska, K., P.C. Maisonpierre, et al, Cardiovascular Research 49(3): 659-70 (2001) 40
- 【非特許文献 19】 Dumont, D. J., et al, Genes & Development, 8:1897-1909 [1994]
- 【非特許文献 20】 Sato, T. N., et al, Nature, 376:10-14 [1995]
- 【非特許文献 21】 Hanahan, D., Science, 277:48-50 [1997]
- 【非特許文献 22】 Zagzag, D., et al, Experimental Neurology, 59:391-400 [1999]
- 【非特許文献 23】 Holash, J., et al, Science, 284:1994-1998 [1999]
- 【非特許文献 24】 Cheung, A. H., et al, Genomics 48 (1998) 389-91
- 【非特許文献 25】 Bunone, G., et al, American Journal of Pathology, 155:1961-1916 [1999]
- 【非特許文献 26】 Etoh, T., et al, Cancer Research, 67:2145-2153 [2001]
- 【非特許文献 27】 Hangai, M., et al, Investigative Ophthalmology & Visual Sciences 50

e, 42:1611-1625 [2001]

【非特許文献 28】Kuroda, K., et al, Journal of Investigative Dermatology, 116:13-120 [2001]

【非特許文献 29】Otani, A., et al, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40:1912-1920 [1999]

【非特許文献 30】Stratmann, A., et al, American Journal of Pathology, 153: 1459-1466 [1998]

【非特許文献 31】Tanaka, S., et al, J Clin Invest, 203:34-345 [1999]

【非特許文献 32】Yoshida, Y., et al, International Journal of Oncology, 25:1221-1225 [1999]

【非特許文献 33】Yuan, K., et al, Journal of Periodontal Research, 35:165-171 [2000]

### 【発明の概要】

#### 【0008】

#### II. 定義

下記のリストは、本明細書の全体を通して使用される用語、語句、および略語を定義するものである。本明細書において列挙され定義される用語はすべて、あらゆる文法的語形を包含することを意図する。

#### 【0009】

本明細書において使用される場合、「Ang-1」とは、非ヒト種に由来する(例えば、「マウスAng-1」、「サルAng-1」など)と指定されない限り、ヒトAng-1、すなわち、Swiss Prot Q15389によって定義される完全長タンパク質またはその生物学的に活性な断片(例えば、インビトロもしくはインビボで血管新生を誘導することができる、Ang-1タンパク質の断片)を意味する。

#### 【0010】

本明細書において使用される場合、「Ang-2」とは、非ヒト種に由来する(例えば、「マウスAng-2」、「サルAng-2」など)と指定されない限り、ヒトAng-2、すなわち、Swiss Prot Q15123によって定義される完全長タンパク質(その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,166,185号の図6も参照されたい)またはその生物学的に活性な断片(例えば、インビトロもしくはインビボで血管新生を誘導することができる、Ang-2タンパク質の断片)を意味する。

#### 【0011】

「Tie-2」(当技術分野では「tek」とも呼ばれる)という用語は、非ヒト種に由来する(例えば、「マウスTie-2」、「サルTie-2」など)と指定されない限り、ヒトTie-2またはその生物学的に活性な断片を意味する。ヒトTie-2は、NCBIタンパク質配列データベースにおいてアクセション番号AAA61130として発表されているアミノ酸配列を有する。

#### 【0012】

本明細書において使用される場合、「検出可能な親和性」は、通常は少なくとも約 $10^{-5}$ Mまたはそれ未満の親和性定数で、選択された標的に結合する能力を意味する。これより小さい親和性は、通常、ELISAのような一般的な方法で測定するがもはや不可能であり、したがって、それほど重要ではない。

#### 【0013】

本明細書において使用される場合、選択された標的(本発明の場合、Ang-1またはAng-2)に対する本開示のタンパク質(例えば、ヒトリポカリソ2のムテイン)の「結合親和性」は、当業者に公知である多数の方法によって測定することができる(それによって、ムテイン-リガンド複合体のKD値を決定することができる)。このような方法には、蛍光滴定、直接ELISA、競合ELISA、等温滴定熱量測定(ITC)のような熱量測定法、および表面プラズモン共鳴(BIAcore)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。このような方法は当技術分野において十分に確立されており、その例もまた、下記に詳述する。

#### 【0014】

10

20

30

40

50

各結合体とそのリガンドとの複合体形成が、各結合パートナーの濃度、競合パートナーの存在、使用される緩衝液系のpHおよびイオン強度、ならびに解離定数 $K_D$ を測定するために使用される実験方法(例えば、ほんのいくつかの例を挙げると、蛍光滴定、直接ELISA、競合ELISA、もしくは表面プラズモン共鳴)などの多くの異なる因子、またはさらに、実験データを評価するのに使用される数学アルゴリズムの影響を受けることも、留意されたい。

#### 【0015】

したがって、 $K_D$ 値(各結合体とその標的/リガンドとの間で形成された複合体の解離定数)は、所与のリガンドに対する特定のムテインの親和性を測定するのに使用される方法および実験設定によって、一定の実験範囲内で変動し得ることもまた、当業者には明らかである。これは、例えば、 $K_D$ 値が表面プラズモン共鳴(Biacore)により測定されたか、競合ELISAにより測定されたか、または「直接ELISA」より測定されたかによって、 $K_D$ 測定値のわずかなずれまたは許容誤差範囲が存在し得ることを意味する。

#### 【0016】

本明細書において使用される場合、結合特異性は絶対的ではなく相対的な特性であるため、本開示のムテインのような化合物は、その標的と1種または複数種の参照標的とを見分けることができる場合、標的(例えば、Ang-1もしくはAng-2)に「特異的に結合する」か、または標的に対する「結合特異性」を有する。「特異的結合」は、例えば、ウェスタンプロット、ELISA試験、RIA試験、ECL試験、IRMA試験、IHC、およびペプチドスキャンに基づいて判定することができる。

#### 【0017】

「ヒトリポカリン2」もしくは「ヒトLcn2」または「ヒトNGAL」もしくは「hNGAL」という用語は、本明細書において使用される場合、SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセション番号P80188の成熟したヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)を意味する。本開示のヒトリポカリン2ムテインは、本明細書において「hNGALムテイン」と呼ばれてもよい。SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセション番号P80188に示されているアミノ酸配列は、好ましい「参照配列」として使用されてよく、より好ましくは、SEQ ID NO: 16に示すアミノ酸配列が、参照配列として使用される。

#### 【0018】

本明細書において使用される場合、「ムテイン」、「変異した」実体(タンパク質であろうと核酸であろうと)、または「変異体」とは、天然に存在する(野生型)核酸またはタンパク質の「参照」骨格と比べた、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸の交換、欠失、または挿入を意味する。本明細書において使用される場合、「ムテイン」という用語はまた、その機能的な断片または変種も含む。本開示において説明する特定のムテインの断片または変種は、好ましくは、例えば、検出可能な親和性またはさらに高い親和性でAng-1またはAng-2に結合する機能を保持しており、そのような断片または変種は、本明細書において開示する参照ムテイン(mutain)の「機能的な断片または変種」である。

#### 【0019】

「断片」という用語は、本開示のムテインに関連して本明細書において使用される場合、N末端および/またはC末端が短くなっている、すなわち、N末端および/またはC末端のアミノ酸の少なくとも1つを欠いている、完全長成熟ヒトリポカリン2由来のタンパク質またはペプチドに関する。このような断片は、成熟ヒトリポカリン2の一次配列の少なくとも10個より多く、例えば、20個もしくは30個、またはそれ以上の連続したアミノ酸を含んでもよく、通常、成熟ヒトリポカリン2を対象とするイムノアッセイ法において検出可能である。

#### 【0020】

通常、「断片」という用語は、本開示のムテインまたは本開示による組み合わせの対応するタンパク質リガンドに関して本明細書において使用される場合、本開示によるムテインによって認識および/または結合される完全長リガンドの能力を保持している、N末端および/またはC末端が短くなっているタンパク質リガンドまたはペプチドリガンドに関する

10

20

30

40

50

。

## 【0021】

「変異誘発」という用語は、本明細書において使用される場合、実験条件を選択して、成熟ヒトリポカリン2の所与の配列位置に天然に存在するアミノ酸を、各天然ポリペプチド配列においてこの特定の位置に存在しない少なくとも1つのアミノ酸で置換できるようにすることを意味する。「変異誘発」という用語はまた、1つまたは複数のアミノ酸の欠失または挿入による、配列セグメントの長さの(さらなる)改変も含む。したがって、例えば、選択された配列位置の1つのアミノ酸が一続きの3つのランダムな変異によって置換されて、野生型タンパク質の各セグメントの長さと比べてアミノ酸残基が2つ挿入されることは、本開示の範囲内である。このような挿入または欠失は、本開示の変異誘発に供され得るペプチドセグメントのいずれかに、互いに無関係に導入されてよい。

10

## 【0022】

「ランダム変異誘発」という用語は、前もって決定された単一アミノ酸(変異)が、ある特定の配列位置に1つも存在しないことを意味するが、少なくとも2つのアミノ酸が、変異誘発の間に規定の配列位置にある程度の確率で組み入れられ得ることを意味する。

## 【0023】

「同一性」とは、類似性または関係の程度を示す、配列の性質である。「配列同一性」または「同一性」という用語は、本開示で使用される場合、本開示のポリペプチド配列を問題の配列と(相同性)アライメントした後の、これら2つの配列の長い方の残基数に対する、ペアをなす同一の残基のパーセンテージを意味する。配列同一性は、同一アミノ酸残基の数を残基の総数で割り、その結果に100を掛けることによって計算される。

20

## 【0024】

「相同性」という用語は、本明細書において、その通常の意味で使用され、同一のアミノ酸、ならびに本開示のポリペプチド(例えば、本開示の任意のムテイン)の直鎖アミノ酸配列中の等価な位置における保存的置換(例えば、グルタミン酸残基をアスパラギン酸残基で交換)であるとみなされるアミノ酸を含む。

## 【0025】

配列相同性または配列同一性の比率は、例えば、BLASTPプログラム、バージョンblastp 2.2.5(November 16, 2002; cf. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402)を用いて、本明細書において測定され得る。この態様において、相同性の比率は、好ましくは、ペアワイズ比較において参照として野生型タンパク質骨格を用いた、プロペプチド配列を含むポリペプチド配列全体のアライメントに基づいている(マトリックス:BLOSUM62;ギャップコスト:11.1;カットオフ値 $10^{-3}$ に設定)。これは、BLASTPプログラム出力で結果として示される「陽性」(相同的なアミノ酸)の数を、アライメントのためにプログラムによって選択したアミノ酸の総数で割った比率として算出される。

30

## 【0026】

具体的には、野生型ヒトリポカリン2と異なるムテインのアミノ酸配列のアミノ酸残基が、野生型ヒトリポカリン2のアミノ酸配列の特定の位置に対応するかどうかを判定するために、当業者は、当技術分野において周知の手段および方法、例えば、手作業による、またはBLAST2.0(Basic Local Alignment Search Toolを意味する)もしくはClustalWまたは配列アライメントを作成するのに適している他の任意の適切なプログラムなどのコンピュータープログラムを使用することによる、アライメントを用いることができる。したがって、野生型ヒトリポカリン2は、「対象配列」または「参照配列」の役割を果たすことができ、一方、本明細書において説明する野生型ヒトリポカリン2と異なるムテインのアミノ酸配列は、「問い合わせ配列」の役割を果たす。「参照配列」および「野生型配列」という用語は、本明細書において同義的に使用される。

40

## 【0027】

「ギャップ」とは、アミノ酸の付加または欠失の結果である、アライメント中の隙間である。したがって、まさに同じ配列の2つのコピーは100%の同一性を有するが、それほど高度に保存されておらず、欠失、付加、または置換を有する配列は、配列同一性の程度が

50

劣る場合がある。当業者は、いくつかのコンピュータープログラム、例えば、Blast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410)、およびSmith-Waterman (Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197)が、標準的なパラメーターを用いて配列同一性を測定するために利用可能であることを認識するであろう。

【0028】

「変種」という用語は、本開示で使用される場合、例えば、置換、欠失、挿入、または化学的改変によるアミノ酸配列の改変を含む、タンパク質またはペプチドの派生物に関する。いくつかの態様において、このような改変によって、タンパク質またはペプチドの機能性が低下することはない。このような変種には、1つまたは複数のアミノ酸を、それらの各々のD立体異性体によって、または天然に存在する20種のアミノ酸以外のアミノ酸、例えば、オルニチン、ヒドロキシプロリン、シトルリン、ホモセリン、ヒドロキシリジン、ノルバリンによって置換したタンパク質が含まれる。しかしながら、このような置換もまた、保存的であることができ、すなわち、あるアミノ酸残基が、化学的に類似しているアミノ酸残基で置換される。保存的置換の例は、次のグループのメンバー間の置換である:1)アラニン、セリン、およびトレオニン;2)アスパラギン酸およびグルタミン酸;3)アスパラギンおよびグルタミン;4)アルギニンおよびリジン;5)イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン;ならびに6)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。

【0029】

「ネイティブ配列」ヒトリポカリン2とは、自然界に由来する対応するポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するヒトリポカリン2を意味する。したがって、ネイティブ配列ヒトリポカリン2は、天然に存在する各ヒトリポカリン2のアミノ酸配列を有することができる。このようなネイティブ配列ポリペプチドは、自然界から単離することができるか、または組換え手段もしくは合成手段を用いて作製することができる。具体的には、「ネイティブ配列」ポリペプチドという用語は、ヒトリポカリン2の天然に存在する短縮型または分泌型、選択的にスプライシングされた型のような天然に存在する変種型、およびヒトリポカリン2の天然に存在する対立遺伝子変種を包含する。ポリペプチド「変種」とは、ネイティブ配列ポリペプチドとの少なくとも約50%、60%、70%、80%、または少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する、生物学的に活性なポリペプチドを意味する。このような変種には、例えば、ポリペプチドのN末端またはC末端において、1つまたは複数のアミノ酸残基が付加されているか、または欠失している、ポリペプチドが含まれる。通常、変種は、ネイティブ配列ポリペプチドとの少なくとも約70%(少なくとも約80%を含む)、例えば少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性(少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性または少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を含む)を有する。

【0030】

「位置」という用語は、本開示に従って使用される場合、本明細書において示すアミノ酸配列内のアミノ酸の位置または本明細書において示すヌクレオチド配列内のヌクレオチドの位置のいずれかを意味する。1種または複数種のムテインのアミノ酸配列位置との関連で本明細書において使用される「対応する(correspond)」または「対応する(corresponding)」という用語を理解するために、対応する位置は、先行するヌクレオチド/アミノ酸の数に基づいて決められるだけではない。したがって、置換され得る本開示に従う所とのアミノ酸の位置は、(変異体または野生型)ヒトリポカリン2中の別の場所でのアミノ酸の欠失または付加が原因で、変わり得る。同様に、置換され得る本開示に従う所とのヌクレオチドの位置は、ムテインまたは野生型ヒトリポカリン2の、プロモーターおよび/もしくは他の任意の調節配列を含む5'-非翻訳領域(UTR)または遺伝子(エキソンおよびイントロンを含む)中の別の場所での欠失または付加的ヌクレオチドが原因で、変わり得る。

【0031】

したがって、本開示に従う対応する位置に関して、ヌクレオチド/アミノ酸の位置は、示される数が、類似する隣接ヌクレオチド/アミノ酸と異なる場合があるが、交換、欠失

10

20

30

40

50

、または付加されてよい該隣接ヌクレオチド/アミノ酸もまた、1つまたは複数の対応する位置に含まれることを、好ましくは理解すべきである。

【0032】

さらに、本開示に従う参照骨格に基づくムテイン中の対応する位置について、ヌクレオチド/アミノ酸の位置は、示される数が異なり得る場合でも、ムテインまたは野生型ヒトリポカリン2中の別の場所の位置に構造的に対応することを、好ましくは理解すべきである。

【0033】

「有機分子」または「有機低分子」という用語は、非天然標的に關して本明細書において使用される場合、少なくとも2個の炭素原子を含み、ただし好ましくは7個または12個以下の回転可能な炭素結合を含み、100～2000ダルトンの間、好ましくは100～1000ダルトンの間の範囲の分子量を有しており、かつ任意で、1つまたは2つの金属原子を含む、有機分子を意味する。

10

【0034】

「検出する」、「検出」、「検出可能」、または「検出すること」という言葉は、本明細書において使用される場合、定量レベルおよび定性レベルの両方、ならびにそれらの組み合わせに基づいて理解される。したがって、関心対象の分子の定量的測定、半定量的測定、および定性的測定を含む。

【0035】

「対象」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。「哺乳動物」という用語は、哺乳動物として分類される任意の動物を意味するために本明細書において使用され、ごく少数の例示的な例を挙げれば、ヒト、家畜および農場動物、ならびに動物園、競技用、またはペット用の動物、例えば、ヒツジ、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ラット、ブタ、カニクイザル(cynomolgous monkey)のような類人猿などが非限定的に含まれる。好ましくは、本明細書における哺乳動物はヒトである。

20

【0036】

「有効量」とは、有益または望ましい結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1回または複数回の投与で投与することができる。

【0037】

「試料」は、任意の対象から採取された生物試料と定義される。生物試料には、血液、血清、尿、大便、精液、または組織が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0038】

本開示による「転移」という用語は、原発腫瘍から患者のどこか他の1つまたは複数の部位に癌細胞が伝達されて、そこで二次腫瘍が発生することを意味する。癌が転移したかを判定するための手段は当技術分野において公知であり、骨スキャン、胸部X線、CATスキャン、MRIスキャン、および腫瘍マーカー試験が含まれる。「転移の予防」という用語は、原発性の腫瘍または癌の転移が予防、遅延、または低減され、したがって、二次腫瘍の発生が予防、遅延、または低減されることを意味する。好ましくは、肺の転移、すなわち二次腫瘍は予防または低減され、これは、原発腫瘍から肺への癌細胞の転移性の伝達が予防または低減されることを意味する。

40

【0039】

本明細書において使用される「癌」という用語は、増殖性疾患、例えば、リンパ腫、リンパ性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細気管支肺胞(bronchioloalveolar)細胞肺癌、骨癌、膵癌、皮膚癌、頭部または頸部の癌、皮膚黒色腫または眼内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、胃の癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、腫瘍、外陰癌、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌または尿管癌、腎細胞癌、腎う癌、中皮腫、肝細胞癌、胆道癌、中枢神経系(CNS)の新生物、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、多形性神経膠芽腫、星状細胞腫、シュワン腫(schwanoma)、上衣腫(ependymoma)、髄芽細胞腫、髓膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫、およびユーリング肉腫

50

を意味し、上記の癌のいずれかの難治性のタイプ(version)または上記の癌の1種もしくは複数種の組み合わせを含む。

【0040】

「血管疾患」という用語には、癌、炎症性疾患、アテローム性動脈硬化症、虚血、外傷、敗血症、COPD、喘息、糖尿病、AMD、網膜症、脳卒中、脂肪過多症、急性肺傷害、出血、血管漏出、例えば、サイトカインに誘発されたもの、アレルギー、グレーブス病、橋本自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、巨細胞性動脈炎、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、クローン病、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、特に固形腫瘍に対して(to)、眼内新血管新生症候群(増殖網膜症または加齢黄斑変性症(AMD))、関節リウマチ、および乾癬が含まれる(Folkman, J., et al., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10931- 10934; Klagsbrun, M., et al., *Annu. Rev. Physiol.* 53 (1991) 217-23 10 9; およびGarner, A., *Vascular diseases*, In: *Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach*, Garner, A., and Klintworth, G. K. (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625-1710)。

【0041】

「抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、4本のポリペプチド鎖、すなわち、ジスルフィド結合によって相互に連結した2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖を含む免疫グロブリン分子、ならびにそれらの多量体(例えばIgM)を意味するものとする。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書においてHCVRまたはV<sub>H</sub>と略される)および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3種のドメイン、すなわちC<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、およびC<sub>H</sub>3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書においてLCVRまたはV<sub>L</sub>と略される)および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメイン(C<sub>L</sub>1)を含む。V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる保存の程度が高い領域が間に割り込んでいる、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分することができる。各V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は、3つのCDRおよび4つのFRから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって次の順序で配列されている:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本開示の様々な態様において、抗Ang-2抗体(またはその抗原結合部分)のFRは、ヒト生殖系列配列と同一であってもよく、または天然にもしくは人工的に改変されていてもよい。アミノ酸コンセンサス配列は、2つまたはそれ以上のCDRの並行解析に基づいて明らかにすることができる。

【0042】

「抗体」という用語はまた、本明細書において使用される場合、完全な抗体分子の抗原結合断片も含む。抗体の「抗原結合部分」および抗体の「抗原結合断片」などの用語は、本明細書において使用される場合、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、天然に存在するか、酵素的に得ることができるか、合成であるか、または遺伝的に操作された、任意のポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の抗原結合断片は、任意の適切な標準的技術、例えば、タンパク質消化、または抗体の可変ドメインおよび任意で定常ドメインをコードするDNAの操作および発現を伴う組換え遺伝子工学技術を用いて、例えば、完全な抗体分子から誘導してもよい。このようなDNAは公知であり、かつ/または例えれば商業的供給源であるDNAライブラリー(例えればファージ抗体ライブラリーを含む)から容易に入手可能であるか、もしくは合成することもできる。DNAを、化学的にまたは分子生物学的技術を用いることによって配列決定および操作して、例えば、1つもしくは複数の可変ドメインおよび/もしくは定常ドメインを適切な立体配置に配列させるか、またはコドンを導入するか、システイン残基を作り出すか、アミノ酸を改変、付加、もしくは欠失させるなど、することができる。抗原結合断片の非限定的な例には、(i)Fab断片、(ii)F(ab')<sub>2</sub>断片、(iii)Fd断片、(iv)Fv断片、(v)単鎖Fv(scFv)分子、(vi)dAb断片、および(vii)抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位(例えれば、単離された相補性決定領域(CDR))が含まれる。ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、およびミニボディなどの他の操作された分子もまた、本明細書において使用される場合、「抗原結合断片」という表現に包含される。典型的には、抗体の抗原結合断片は、少なくとも1つの可変ドメインを含む。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成のものであってよく

10

20

30

40

50

、通常、1つまたは複数のフレームワーク配列に隣接しているか、またはそれとインフレームである(in frame with)、少なくとも1つのCDRを含む。 $V_L$ ドメインと結合している $V_H$ ドメインを有する抗原結合断片において、 $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインは、任意の適切な配置で互いに対し位置してよい。例えば、可変領域は二量体であってよく、 $V_H$ - $V_H$ 、 $V_H$ - $V_L$ 、または $V_L$ - $V_L$ 二量体を含んでよい。あるいは、抗体の抗原結合断片は、単量体の $V_H$ ドメインまたは $V_L$ ドメインを含んでもよい。

[本発明1001]

検出可能な親和性でAng-2に結合することができる、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リボカリン(hNGAL)ムテイン。

[本発明1002]

Biacore T200装置によって、実施例6に本質的に説明される表面プラズモン共鳴(SPR)に基づくアッセイ法において測定される場合、約5nM以下のKDでAng-2に結合することができる、本発明1001のhNGALムテイン。

[本発明1003]

実施例4に本質的に説明されるELISAアッセイ法において測定される場合、約5nM以下のIC50値によって示される親和性でAng-2に結合することができる、本発明1001のhNGALムテイン。

[本発明1004]

実施例5に本質的に説明される競合ELISA様式のアッセイ法において測定される場合、約5nM以下のIC50値によって示される親和性でAng-2に結合することができる、本発明1001のhNGALムテイン。

[本発明1005]

実施例9に本質的に説明される細胞に基づく増殖アッセイ法において、約5nM以下のIC50値で、Ang-2によって媒介されるリンパ微小管内皮細胞増殖を阻害するか、または減少させることができる、本発明1001のhNGALムテイン。

[本発明1006]

成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO: 16)の位置28、36、40、41、49、52、65、68、70、72～74、77、79、81、87、96、100、103、106、116、125、126、127、129、132、および134に対応する1つまたは複数の位置に、変異アミノ酸残基を含む、本発明1001～1005のいずれかのhNGALムテイン。

[本発明1007]

成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列の位置36、40、41、49、52、68、70、72～73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132、および134に対応する1つまたは複数の位置に、変異アミノ酸残基をさらに含む、本発明1001～1006のいずれかのhNGALムテイン。

[本発明1008]

hNGALムテインのアミノ酸配列が、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列と比較して、以下の変異アミノ酸残基の少なくとも1つを含む、本発明1001～1007のいずれかのhNGALムテイン：

Leu 36 →

Gln, Glu, His, Val, MetまたはPhe; Ala 40 → Val, Tyr, HisまたはTrp; Ile 41 → His, Tyr, TrpまたはVal; Gln 49 → Gly, Ile, Val, GluまたはVal; Tyr 52 → Trp, His, ThrまたはSer; Ser 68 → Gly, Asp, Gln, GluまたはIle; Leu 70 → Ser, Thr, Gly, Arg, TyrまたはAla; Arg 72 → Gly, Ala, Trp, ThrまたはGlu; Lys 73 → Pro, Phe, Leu, Arg, AlaまたはGln; Asp 77 → Asn, Lys, SerまたはVal; Trp 79 → Thr, Arg, SerまたはAsn; Arg 81 → Trp, HisまたはTyr; Asn 96 → Gly, Ala, Pro, GlnまたはAsp; Tyr 100 → Pro, Trp, Gly, Ser, LeuまたはAsp; Leu 103 → Gly, Glu, Asn, MetまたはGln; Tyr 106 → Thr, LeuまたはPhe; Lys 125 → His, ThrまたはGly; Ser 127 → LeuまたはMet; Tyr 132 → Phe, TrpまたはVal; およびLys 134 → Ala, GluまたはTrp

。

10

20

30

40

50

## [本発明1009]

hNGALムテインのアミノ酸配列が、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列と比較して、以下の置換:Gln28 His; Asn65 Asp; Lys74 Glu; Cys87 Ser; Asn116 Asp; Val126 Met、およびAsn129 Aspを含む、本発明1001～1008のいずれかのhNGALムテイン。

## [本発明1010]

成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO: 16)の配列位置28、36、40、41、49、52、65、68、70、72～74、77、79、81、87、96、100、103、106、116、125、126、127、129、132、および134に、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、または21個の変異アミノ酸残基を含む、本発明1001～1008のいずれかのhNGALムテイン。

10

## [本発明1011]

成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列と比較して、以下のアミノ酸置換のセットの1つを含む、本発明1001～1010のいずれかのhNGALムテイン：

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Thr; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → His; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → His; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Phe; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Trp;

20

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Leu; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu, Ala 40 → Val; Ile 41 → Glu; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Thr; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asn; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Trp;

30

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Ile; Leu 70 → Tyr; Arg 72 → Thr; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Tyr; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Glu;

40

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Glu; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu

103 → Gln; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Glu; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(j) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Val; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(k) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Leu; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(l) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Asn 116 → Asp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala;

(m) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Val 126 → Met; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala; または

10

20

30

40

(n) Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Asp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala

。

[本発明1012]

SEQ ID NO: 1～14およびそれらの機能的な断片または変種からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1001～1010のいずれかのhNGALムテイン。

10

[本発明1013]

高い親和性でAng-1に結合することができる、本発明1001のhNGALムテイン。

[本発明1014]

実施例7に本質的に説明されるELISAアッセイ法において測定される場合、約150nM以下のIC50値によって示される親和性でAng-1に結合することができる、本発明1013のhNGALムテイン。

[本発明1015]

ヒトAng-2とマウスAng-2の両方と交差反応性である、本発明1001または本発明1013のhNGALムテイン。

20

[本発明1016]

実施例7に本質的に説明されるELISAアッセイ法において測定される場合、約5nM以下のIC50値によって示される親和性でマウスAng-2に結合することができる、本発明1015のhNGALムテイン。

[本発明1017]

実施例8に本質的に説明される競合細胞ECL様式において、ヒトAng-2のhTie-2に対する結合およびマウスAng-2のmTie-2mに対する結合をそれぞれ約25nM以下のIC50値で妨害することができる、本発明1001のhNGALムテイン。

[本発明1018]

成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO: 16)の位置28、36、40、41、49、52、65、68、70、72～74、77、79、81、87、96、100、103、106、116、125、126、127、129、132、および134に対応する1つまたは複数の位置に、変異アミノ酸残基を含む、本発明1013～1017のいずれかのhNGALムテイン。

30

[本発明1019]

SEQ ID NO: 1～14およびそれらの機能的な断片または変種からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1013～1018のいずれかのhNGALムテイン。

[本発明1020]

野生型hNGALの1つまたは複数のアミノ酸を置換する1つまたは複数の非ネイティブシスティン残基を含む、本発明1001～1019のいずれかのhNGALムテイン。

40

[本発明1021]

別のアミノ酸によるネイティブシスティン残基のアミノ酸置換を少なくとも1つ含む、本発明1001～1020のいずれかのhNGALムテイン。

[本発明1022]

別のアミノ酸がセリン残基である、本発明1021のhNGALムテイン。

[本発明1023]

有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、細胞分裂阻害剤、毒素、金属複合体、金属、およびコロイド金からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている、本発明1001～1022のいずれかのhNGALムテイン。

[本発明1024]

50

hNGALムテインが、そのN末端および/またはそのC末端において、タンパク質、またはタンパク質ドメインもしくはペプチドである融合パートナーに融合している、本発明1001～1022のいずれかのhNGALムテイン。

[本発明1025]

ポリペプチドの血清半減期を延長する化合物にコンジュゲートされている、本発明1001～1022のいずれかのhNGALムテイン。

[本発明1026]

血清半減期を延長する化合物が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンブン、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、本発明1025のhNGALムテイン。

10

[本発明1027]

ポリアルキレングリコールが、ポリエチレン(PEG)またはその活性化誘導体である、本発明1026のhNGALムテイン。

[本発明1028]

本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテインをコードするスクレオチド配列を含む核酸分子。

[本発明1029]

前記核酸分子の発現を可能にするために調節配列に機能的に連結されている、本発明1028の核酸分子。

20

[本発明1030]

ベクターまたはファージミドベクター中に含まれている、本発明1028または1029の核酸分子。

[本発明1031]

本発明1028～1030のいずれかの核酸分子を含む宿主細胞。

[本発明1032]

ポリペプチドが、該ポリペプチドをコードする核酸から出発して、遺伝子操作方法により産生される、本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテインを产生する方法。

[本発明1033]

ポリペプチドが、細菌宿主生物または真核宿主生物において産生され、かつこの宿主生物またはその培養物から単離される、本発明1032の方法。

30

[本発明1034]

本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテインを含む薬学的組成物。

[本発明1035]

少なくとも1種の薬学的に許容されるアジュバント、希釈剤、または担体をさらに含む、本発明1026の組成物。

[本発明1036]

本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテインを含む、診断用または分析用のキット。

[本発明1037]

試料中のAng-2の検出および/または測定のための、本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテインの使用。

40

[本発明1038]

少なくとも(a)本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテインおよび(b)抗血管新生剤の組み合わせ。

[本発明1039]

hNGALムテインおよび抗血管新生剤が、並行投与、同時投与、または順次投与を含めて、組み合わせで投与される、本発明1038の組み合わせ。

[本発明1040]

hNGALムテインおよび抗血管新生剤が、個別に間隔をあけた独立した時点における投与を含めて、相互に独立して投与される、本発明1038の組み合わせ。

50

[本発明1041]

単一の組成物中に含まれている、本発明1038の組み合わせ。

[本発明1042]

抗血管新生剤が、(i)Ang-1、Ang-2、Ang-3、Ang-4、および/またはTie-2のアンタゴニスト；(ii)Flt1、KDR、Flt4、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PIGF、および/またはEG-VEGFのアンタゴニスト；(iii)デルタ様リガンド4(DLL4、血管特異的ノッチリガンド)アンタゴニスト、(iv)上皮増殖因子受容体(EGFR)アンタゴニスト、ならびに(v)サイトカイン阻害剤からなる群より選択される、本発明1038～1041のいずれかの組み合わせ。

[本発明1043]

抗血管新生剤がVEGF阻害剤である、本発明1038～1042の組み合わせ。

10

[本発明1044]

VEGF阻害剤が、VEGF-Trap、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、ソラフェニブ(ネクサバール(登録商標))、スニチニブ(ステント(登録商標))、およびパゾパニブ(ボトリエント(登録商標))からなる群より選択される、本発明1033の組み合わせ。

[本発明1045]

VEGF阻害剤が、VEGF-Aのアンタゴニストおよび/またはVEGF-Cのアンタゴニストである、本発明1044の組み合わせ。

[本発明1046]

付加的な抗血管新生剤をさらに含む、本発明1038～1045の組み合わせ。

[本発明1047]

第1の抗血管新生剤が、本明細書において言及されるVEGF-Aアンタゴニストであり、第2の抗血管新生剤がVEGF-Cアンタゴニストである、本発明1046の組み合わせ。

20

[本発明1048]

VEGF-Aのアンタゴニストが、抗VEGF-A抗体、またはVEGF-Aに対する結合特異性を有するリポカリンムテインである、本発明1045～1047のいずれかの組み合わせ。

[本発明1049]

VEGF-Cのアンタゴニストが、抗VEGF-C抗体、またはVEGF-Cに対する結合特異性を有するリポカリンムテインである、本発明1045～1048のいずれかの組み合わせ。

[本発明1050]

無秩序な血管新生に関連している疾患または障害の治療、予防、および/または改善に適した薬学的組成物を製造するための、本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテインまたは本発明1038～1049の組み合わせの使用。

30

[本発明1051]

本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテイン、または本発明1034もしくは1035の組成物、または本発明1038～1049の組み合わせを対象に投与する段階を含む、対象におけるAng-2を結合させる方法。

[本発明1052]

本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテイン、または本発明1034もしくは1035の組成物、または本発明1038～1049の組み合わせの有効量を対象に投与する段階を含む、対象における血管新生を阻害するための方法。

40

[本発明1053]

本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテイン、または本発明1034もしくは1035の組成物、または本発明1038～1049の組み合わせの有効量を対象に投与する段階を含む、対象における無秩序な血管新生に関連している疾患または障害を治療、予防、または改善する方法。

[本発明1054]

対象におけるAng-2の結合のための、本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテイン、または本発明1034もしくは1035の組成物、または本発明1038～1048の組み合わせの使用。

[本発明1055]

対象における血管新生を阻害するための、本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテイ

50

ン、または本発明1034もしくは1035の組成物、または本発明1038～1049の組み合わせの使用。

[本発明1056]

無秩序な血管新生に関連している疾患または障害の治療、予防、および/または改善のための、本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテイン、または本発明1034もしくは1035の組成物、または本発明1038～1049の組み合わせの使用。

[本発明1057]

疾患または障害が、腫瘍増殖、眼障害、血管疾患、炎症性疾患または感染症、癌、眼の新血管新生疾患、関節炎、および乾癬からなる群より選択される、本発明1053の方法または本発明1056の使用。

10

[本発明1058]

本発明1001～1027のいずれかのhNGALムテイン、または本発明1034もしくは1035の組成物、または本発明1038～1049の組み合わせの有効量を対象に投与する段階を含む、対象における血管新生を阻害するか、または減少させる方法。

**【図面の簡単な説明】**

**【0043】**

【図1】リポカリンムテイン(SEQ ID NO: 1、3、7、8、9、および11)が、ナノモル濃度以下の範囲のIC50で、ヒトAng-2とその受容体Tie-2との相互作用を妨害できることを実証する。ヒトAng-2を様々な濃度のリポカリンムテインと共にプレインキュベートし、効力を消されていないヒトAng-2を、可溶性ヒトTie-2Fcが固定されたELISAプレートを用いて定量した。ベンチマーク抗体(SEQ ID NO: 19/20)を陽性対照として使用した。陰性対照(SEQ ID NO: 16)は、競合的効果を有さない。このデータに単一部位結合モデルを当てはめた。

20

【図2】競合ELISA様式で測定した際の、リポカリンムテイン(SEQ ID NO: 7および8)の交差反応性プロファイルおよび特異性を示す。リポカリンムテインは、ヒトAng-1、ヒトAng-2、およびマウスAng-2と交差反応する。データに単一部位結合モデルを当てはめた。

【図3】リポカリンムテイン(SEQ ID NO: 1、3、6～14)が、ヒトAng-2とHEK細胞表面で過剰発現されたその受容体ヒトTie-2との相互作用を妨害できることを実証する。ヒトAng-2を様々な濃度のSEQ ID NO: 1、3、6～14と共にプレインキュベートし、抗HISタグ抗体を介して、効力を消されていないang-2を検出した。ベンチマーク抗体(SEQ ID NO: 19/20)を陽性対照として使用した。このデータに単一部位結合モデルを当てはめた。

30

【図4】リポカリンムテイン(SEQ ID NO: 1、3、6～14)が、マウスAng-2とHEK細胞表面で過剰発現されたヒト受容体Tie-2との相互作用を妨害できることを実証する。マウスAng-2を様々な濃度の SEQ ID NO: 1、3、6～14と共にプレインキュベートし、抗HISタグ抗体を介して、効力を消されていないマウスAng-2を検出した。ベンチマーク抗体(SEQ ID NO: 19/20)を陽性対照として使用した。このデータに単一部位結合モデルを当てはめた。

【図5】細胞に基づく増殖アッセイ法において、リポカリンムテインSEQ ID NO: 7、8、9、および11がhAng-2の生物活性を妨害できることを実証する。このアッセイ法において、SEQ ID NO: 7、8、9、11、および16、IgGアイソタイプ陰性対照、ならびに2つのベンチマーク抗体を、飢餓状態にしたHLECに添加した。この実験から、LEC増殖がSEQ ID NO: 7、8、9、11、ならびにベンチマーク抗体1および2(ベンチマーク抗体1:SEQ ID NO: 17/18;ベンチマーク抗体2:SEQ ID NO: 19/20)によって、同様のIC50値の範囲で妨害されることが示される。IgGアイソタイプ陰性対照およびSEQ ID NO: 16陰性対照は、細胞増殖に対する効果はまったくなかった。データにS字形用量反応モデルを当てはめた。

40

**【発明を実施するための形態】**

**【0044】**

**IV. 開示の詳細な説明**

本開示は、検出可能な親和性でAng-2に結合するhNGALムテインを含む、Ang-2に対する結合特異性を有するポリペプチドを提供する。

**【0045】**

50

いくつかの態様において、検出可能な親和性でAng-2に結合するhNGALムテインは、別のアミノ酸、例えばセリン残基による、ネイティブシスティン残基のアミノ酸置換を少なくとも1つ含んでよい。いくつかの他の態様において、検出可能な親和性でAng-2に結合するムテインは、野生型hNGALの1つまたは複数のアミノ酸を置換する1つまたは複数の非ネイティブシスティン残基を含んでよい。別の具体的な態様において、本開示によるhNGALムテインは、システィン残基によるネイティブアミノ酸のアミノ酸置換を少なくとも2つ含み、これによって、1つまたは複数のシスティン架橋を形成する。いくつかの態様において、該システィン架橋は、少なくとも2つのループ領域を連結してよい。これらの領域の定義は、Flower(Flower, 1996、前記、Flower, et al., 2000、前記)およびBreustedt et al.(2005、前記)に従って本明細書において使用される。

10

#### 【0046】

本明細書において開示する、Ang-2に対する特異性を有するムテインまたはその組成物は、Ang-2の少なくとも1つの生物活性に対して、アンタゴニスト活性、または効力を消す活性、もしくは妨害活性を有し得る。

#### 【0047】

1つの局面において、本開示は、少なくとも検出可能な親和性でAng-2に結合する様々なhNGALムテインを含む。この意味で、Ang-2は、参照用の野生型hNGALの非天然リガンドとみなされ、ここで、「非天然リガンド」とは、生理的条件下では野生型ヒトリポカリン2に結合しない化合物を意味する。特定の配列位置における1つまたは複数の変異を用いて野生型hNGALを操作することによって、本発明者らは、非天然リガンドであるAng-2に対する高い親和性および高い特異性が実現可能であることを実証した。いくつかの態様において、野生型ヒトリポカリン2上の特定の配列位置をコードする1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、またはさらにそれ以上のヌクレオチドトリプレットにおいて、ヌクレオチドトリプレットの部分集合によってこれらの位置を置換することにより、ランダム変異誘発を実施してもよい。

20

#### 【0048】

さらに、本開示のムテインは、hNGALの直鎖ポリペプチド配列の特定の配列位置に対応する配列位置の、少なくとも任意の1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、または12個を含む、任意の1つまたは複数において、例えば、ヒトNGALの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO: 16)の配列位置28、36、40、41、49、52、65、68、70、72～74、77、79、81、87、96、100、103、106、116、125、126、127、129、132、および134に、変異アミノ酸残基を有してもよい。

30

#### 【0049】

本開示のムテインは、変異アミノ酸配列位置以外に、「親」タンパク質骨格(例えばhNGAL)の野生型(天然)アミノ酸配列を含んでよい。また、いくつかの態様において、本開示によるhNGALムテインは、1つの配列位置/複数の配列位置に1つまたは複数のアミノ酸変異を、そのような変異がムテインの結合活性およびフォールディングを少なくとも本質的に妨げもせず、邪魔もしない限りにおいて、保有してよい。このような変異は、確立されている標準的方法(Sambrook, J. et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)を用いて、DNAレベルで非常に容易に遂行することができる。アミノ酸配列の変更の例示的な例は、挿入または欠失、ならびにアミノ酸置換である。このような置換は保存的であることができ、すなわち、あるアミノ酸残基が、特に大きさだけでなく極性に関しても化学的に特性が類似しているアミノ酸残基で置換される。保存的置換の例は、次のグループのメンバー間の置換である:1)アラニン、セリン、およびトレオニン;2)アスパラギン酸およびグルタミン酸;3)アスパラギンおよびグルタミン;4)アルギニンおよびリジン;5)イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン;ならびに6)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。その一方で、アミノ酸配列に非保存的変更を導入することも可能である。さらに、単一のアミノ酸残基を置換する代わりに、ヒトリポカリン2の一次構造の1つまたは複数の連続的アミノ酸を挿入するかまたは欠失させることもまた、これらの欠失ま

40

50

たは挿入の結果、安定なフォールディングされた/機能的ムテイン(例えば、N末端およびC末端が短縮されたhNGALムテイン)が得られる限りにおいて、可能である。このようなムテインでは、例えば、ポリペプチドのN末端またはC末端において、1つまたは複数のアミノ酸残基が付加されているか、または欠失している。通常、このようなムテインは、成熟hNGALのアミノ酸配列との少なくとも約70%(少なくとも約80%を含む)、例えば少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有し得る。

#### 【0050】

本明細書において開示するhNGALムテインのアミノ酸配列は、他のリポカリンとの配列同一性と比べた場合、成熟hNGAL(SEQ ID NO: 16)に対して高い配列同一性を有する。この一般的な文脈において、本開示のムテインのアミノ酸配列は、天然の野生型hNGALのアミノ酸配列と少なくとも実質的に同様であり、ただし、アミノ酸の付加または欠失の結果であるギャップ(以下に定義する)がアライメント中に存在する可能性があることを条件とする。本開示のムテインの各配列は、成熟hNGALの配列と実質的に同様であり、いくつかの態様において、成熟hNGALの配列に対して、少なくとも70%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも75%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも80%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも82%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも85%の同一性もしくは配列相同性、少なくとも87%の同一性もしくは配列相同性、または少なくとも90%の同一性もしくは配列相同性(少なくとも95%の同一性もしくは配列相同性を含む)を有しており、ただし、変更された位置または配列が保持されていること、および1つまたは複数のギャップが存在し得ることを条件とする。

10

#### 【0051】

本明細書において使用される場合、結合特異性は絶対的ではなく相対的な特性であるため、本開示のムテインは、その標的と1種または複数種の参照標的とを見分けることができる場合、標的(例えばAng-2)に「特異的に結合する」。「特異的結合」は、例えば、ウェスタンプロット、ELISA試験、RIA試験、ECL試験、IRMA試験、FACS、IHC、およびペプチドスキャンに基づいて判定することができる。

20

#### 【0052】

1つの態様において、本開示のムテインは、そのN末端および/またはそのC末端において融合パートナーに融合しており、融合パートナーは、いくつかの具体的な態様において、タンパク質、またはタンパク質ドメインもしくはペプチドである。いくつかの態様において、タンパク質ドメインは、ムテインの血清半減期を延長し得る。別の具体的な態様において、タンパク質ドメインは、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、またはアルブミン結合タンパク質である。

30

#### 【0053】

別の態様において、本開示のムテインは、ムテインの血清半減期を延長する化合物にコンジュゲートされている。より好ましくは、ムテインは、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンプン(hydroethylstarch)、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている。

40

#### 【0054】

さらに別の態様において、本開示は、本明細書において開示するムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子に関する。本開示は、該核酸分子を含む宿主細胞を包含する。

#### 【0055】

##### A. Ang-2に特異的な例示的ムテイン

1つの局面において、本開示は、Ang-2に特異的な新規の特異的結合ヒトリポカリン2(ヒトLcn2またはhNGAL)ムテインに関する。

#### 【0056】

本開示の1つの態様は、検出可能な親和性で、例えば、約200nM以下、例えば約150nM以

50

下のKDによって示される親和性で、Ang-2に結合することができるムテインに関する。

【0057】

1つの局面において、本開示は、Biacore T200装置によって、実施例6に本質的に説明される表面プラズモン共鳴(SPR)に基づくアッセイ法において測定される場合、約5nM以下のKDでAng-2に結合することができるhNGALムテインを提供する。

【0058】

いくつかの別の態様において、本開示の1種または複数種のhNGALムテインは、実施例4に本質的に説明されるELISAアッセイ法において測定される場合、約5nM以下のEC50値によって示される親和性で、Ang-2に結合することができる。

【0059】

いくつかの他の態様において、本開示の1種または複数種のhNGALムテインは、実施例5に本質的に説明される競合ELISA様式のアッセイ法で測定される場合、約5nM以下のIC50値によって示される親和性で、Ang-2に結合することができる。

【0060】

いくつかの他の態様において、本開示の1種または複数種のhNGALムテインは、実施例9に本質的に説明される細胞に基づく増殖アッセイ法において、約5nM以下のIC50値で、Ang-2によって媒介されるリンパ微小管内皮細胞増殖を阻害するか、または減少させることができる。

【0061】

いくつかの具体的な態様において、本開示のAng-2結合hNGALムテインは、検出可能な親和性で、例えば、約200nM以下、例えば約150nM以下のKDによって示される親和性で、Ang-2とAng-1の両方に結合することができる。いくつかの態様において、本開示の1種または複数種のhNGALムテインは、ヒトAng-1とヒトAng-2の両方と交差反応性である。

【0062】

さらに別のいくつかの態様において、ムテインは、実施例7に本質的に説明されるELISAアッセイ法において測定される場合、約150nM以下のIC50値によって示される親和性で、Ang-1に結合することができる。

【0063】

いくつかの他の態様において、本開示の1種または複数種のhNGALムテインは、ヒトAng-2とマウスAng-2の両方と交差反応性である。いくつかの態様において、1種または複数種のそのようなムテインは、検出可能な親和性で、例えば、約200nM以下、例えば約150nM以下のKDによって示される親和性で、ヒトAng-2とマウスAng-2の両方に結合することができる。

【0064】

さらに別のいくつかの態様において、1種または複数種のそのようなムテインは、実施例7に本質的に説明されるELISAアッセイ法において測定される場合、約5nM以下のIC50値によって示される親和性で、マウスAng-2に結合することができる。

【0065】

さらに別のいくつかの態様において、1種または複数種のそのようなムテインは、実施例8に本質的に説明される競合細胞ECL様式において、ヒトAng-2のhTie-2に対する結合およびマウスAng-2のhTie-2に対する結合をそれぞれ約25nM以下のIC50値で妨害することができる。

【0066】

いくつかの態様において、本開示の1種または複数種のhNGALムテインは、ヒトAng-4と交差反応性ではない。いくつかの態様において、本開示の1種または複数種のhNGALムテインは、マウスAng-3と交差反応性ではない。いくつかの態様において、本開示の1種または複数種のhNGALムテインは、ヒトVEGF-Aと交差反応性ではない。

【0067】

これに関して、本開示は、ポリペプチドに関し、該ポリペプチドは、hNGALムテインを含み、該hNGALは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列と比較して、配列位置28、36、40、

10

20

30

40

50

41、49、52、65、68、70、72～74、77、79、81、87、96、100、103、106、116、125、126、127、129、132、および134に、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、またはさらにそれ以上の変異アミノ酸残基を含み、かつ該ポリペプチドは、検出可能な親和性でAng-2に結合する。

【0068】

いくつかの態様において、本開示のAng-2結合hNGALムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO: 16)の配列位置36、40、41、49、52、68、70、72～73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132、および134の任意の1つまたは複数に、以下の変異アミノ酸残基の1つまたは複数を含む：

Leu 36 → Gln, Glu, His, Val, Met または Phe; Ala 40 → Val, Tyr, His または Trp; Ile 41 → His, Tyr, Trp または Val; Gln 49 → Gly, Ile, Val, Glu または Val; Tyr 52 → Trp, His, Thr または Ser; Ser 68 → Gly, Asp, Gln, Glu または Ile; Leu 70 → Ser, Thr, Gly, Arg, Tyr または Ala; Arg 72 → Gly, Ala, Trp, Thr または Glu; Lys 73 → Pro, Phe, Leu, Arg, Ala または Gln; Asp 77 → Asn, Lys, Ser または Val; Trp 79 → Thr, Arg, Ser または Asn; Arg 81 → Trp, His または Tyr; Asn 96 → Gly, Ala, Pro, Gln または Asp; Tyr 100 → Pro, Trp, Gly, Ser, Leu または Asp; Leu 103 → Gly, Glu, Asp, Met または Gln; Tyr 106 → Thr, Leu または Phe; Lys 125 → His, Thr または Gly; Ser 127 → Leu または Met; Tyr 132 → Phe, Trp または Val; および Lys 134 → Ala, Glu または Trp

。いくつかの態様において、本開示のhNGALムテインは、成熟hNGALのこれらの配列位置に、2個またはそれ以上、例えば、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、もしくはさらにそれ以上、またはすべての変異アミノ酸残基を含む。

【0069】

さらに、本開示によるAng-2結合hNGALムテインはまた、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列と比較して、以下の置換:Gln28 His; Asn65 Asp; Lys74 Glu; Cys87 Ser; Asn116 Asp; Val126 Met、およびAsn129 Aspを含んでもよい。

【0070】

いくつかの追加の態様において、Ang-2に結合する本開示のhNGALムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列と比較して、以下のアミノ酸置換を含む：

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Thr; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → His; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → His; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Phe; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Trp;

10

20

30

40

- (c) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Leu; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala;
- (d) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Val; Ile 41 → Glu; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Thr; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asn; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Trp; 10
- (e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Ile; Leu 70 → Tyr; Arg 72 → Thr; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Tyr; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Glu;
- (f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Glu; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu; 20
- (g) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Glu; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;
- (h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu; 30
- (i) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;
- (j) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Val; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu; 40
- (k) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Leu; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

- (l) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Asn 116 → Asp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala;
- (m) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Val 126 → Met; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala; または 10
- (n) Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Asp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala
- 。

20

## 【0071】

残存領域、すなわち、配列位置28、36、40、41、49、52、65、68、70、72～74、77、79、81、87、96、100、103、106、116、125、126、127、129、132、および134とは異なる領域において、本開示のhNGALムテインは、変異アミノ酸配列位置以外に、野生型(天然)アミノ酸配列を含んでよい。

## 【0072】

別の具体的な態様において、本開示によるムテインは、SEQ ID NO: 1～14からなる群より選択されるアミノ酸配列またはそれらの機能的な断片もしくは変種を含む。いくつかの態様において、このような断片または変種は、SEQ ID NO: 1～14のいずれか1つにおいて定義されるムテインの構造的相同物である。 30

## 【0073】

本開示のAng-2結合hNGALムテインのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 1～14からなる群より選択される配列に対して、高い配列同一性、例えば、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%の同一性(少なくとも95%の同一性を含む)を有し得る。

## 【0074】

いくつかの別の態様において、ヒトAng-1、ヒトAng-2、および/またはマウスAng-2と交差反応するか、または結合する、本開示によるhNGALムテインは、SEQ ID NO: 1～14およびそれらの機能的な断片または変種からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【0075】

本開示はまた、SEQ ID NO: 1～14からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するhNGALムテインの構造的相同物を含み、この構造的相同物は、該hNGALムテインに対して、約60%より高い、好ましくは65%より高い、70%より高い、75%より高い、80%より高い、85%より高い、90%より高い、92%より高い、および最も好ましくは95%より高い、アミノ酸配列相同性または配列同一性を有する。

## 【0076】

本開示によるAng-2結合hNGALムテインは、天然型のヒトリポカリン2の変異誘発によって得ることができる。変異誘発のいくつかの態様において、置換(substitution)(または置換(replacement))は、保存的置換である。それでもなお、非保存的置換または以下の例示的置換からの1つもしくは複数を含む、任意の置換が、次のことを条件として想定され 50

る:ムテインがAng-2に結合する能力を保持していること、および/またはムテインが、成熟ヒトリポカリン2のアミノ酸配列(SWISS-PROTデータバンクアクセッション番号P80188)のアミノ酸配列に対して、少なくとも60%、例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、もしくはより高い同一性であるという点で、その時に置換された配列に対して同一性を有すること。

## 【0077】

本開示はまた、本明細書において開示する少なくとも1つのAng-2結合hNGALムテイン、または本明細書において説明するそのコンジュゲートもしくは融合タンパク質、および任意で薬学的に許容される賦形剤を含む、薬学的組成物にも関する。

## 【0078】

したがって、本開示のAng-2結合hNGALムテインは、薬学的に許容される成分ならびに確立された調製方法を用いて、組成物に配合することができる(Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。薬学的組成物を調製するために、薬学的に不活性な無機または有機の賦形剤を使用することができる。

## 【0079】

## B. Ang-2に特異的なムテインの用途

最近、ANG-2ノックアウトマウスモデルを用いて、出生後の血管新生にANG-2が必要とされることをYancopoulosのグループが報告した(Gale, N. W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23)。彼らは、眼における硝子体血管系の発生的にプログラムされた退縮が、ANG-2ノックアウトマウスで起こらず、網膜血管が中心の網膜動脈から成長しないことを示した(Gale, N. W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23)。彼らはまた、ANG-2を欠失させると、リンパ管の脈管構造の形状(patterning)および機能に大きな欠陥が生じることも発見した(Gale, N. W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23)。さらに、有効な抗Ang-2療法は、異常な血管新生に進行が左右され、その過程を妨害することによって疾患の発達を予防することができる、癌のような疾患を治療するにあたって有益であると考えられている(Folkman, J., Nature Medicine. 1, (1995) 27-31)。さらに、Ang-2発現は、様々な炎症性疾患および/または感染症の重症度と相関があることも示されている(例えば、Siner et al., 2009, Shock 31 :348-353; Yeo et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA): 105: 17097-17102を参照されたい)。

## 【0080】

したがって、Ang-2に対する結合親和性を有する本開示のムテインの多数の実現可能な用途が、医学、例えば、眼科学および腫瘍学に存在する。1つの別の態様において、本開示は、試料中のAng-2を検出するための、ならびに各診断方法のための、本明細書において開示するこのようなムテインの使用に関する。

## 【0081】

本開示はまた、Ang-2との複合体形成に関して説明するような、Ang-2に対する結合親和性を有する1種または複数種のムテインの使用も含む。

## 【0082】

したがって、本開示の別の局面において、開示されるムテインは、Ang-2の検出のために使用される。このような使用は、1種または複数種の該ムテインを、Ang-2を含むと推測される試料と適切な条件下で接触させ、それによって、ムテインとAng-2との複合体を形成させる段階、および適切なシグナルに基づいてその複合体を検出する段階を含んでよい。

## 【0083】

検出可能なシグナルは、上記に説明したように標識によって、または結合に起因する物理的特性の変化、すなわち複合体形成それ自体によって、生じ得る。1つの例は表面プラズモン共鳴であり、その値は、結合パートナー同士(その内の一方が金箔のような表面に固定されている)が結合する間、変化する。

## 【0084】

10

20

30

40

50

本明細書において開示するムテインはまた、Ang-2の分離のためにも使用され得る。このような使用は、1種または複数種の該ムテインを、Ang-2を含むと予想される試料と適切な条件下で接触させ、それによって、ムテインとAng-2との複合体を形成させる段階、および試料から複合体を分離する段階を含んでよい。

#### 【0085】

開示されるムテインをAng-2検出ならびにAng-2分離のために使用する際、ムテインおよび/もしくはAng-2またはそのドメインもしくは断片は、適切な固相に固定されてよい。

#### 【0086】

したがって、例えば試料中のAng-2のような分子の存在または非存在、ならびにその濃度またはレベルを測定することができる。

10

#### 【0087】

したがって、本開示のムテインは、例えば、診断目的で試料中のAng-2を検出および/または測定するのに使用され得る。例えば、ムテインは、Ang-2の異常発現(例えば、過剰発現、過小発現、発現不足など)を特徴とする病態または疾患を診断するのに使用され得る。Ang-2の例示的な診断アッセイ法は、例えば、患者から得られた試料を、検出可能な標識またはレポーター分子で標識されたムテインと接触させることを含んでよい。あるいは、未標識のムテインを、それ自体が検出可能に標識されている二次的分子と組み合わせて、診断用途で使用することもできる。検出可能な標識またはレポーター分子は、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、もしくは<sup>125</sup>Iのような放射性同位体;フルオレセインイソチオシアナートもしくはローダミンなどの蛍光性もしくは化学発光性の部分;またはアルカリホスファターゼ、ガラクトシターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、もしくはルシフェラーゼなどの酵素であることができる。試料中のAng-2を検出または測定するのに使用できる具体的な例示的アッセイ法には、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ法(RIA)、および蛍光活性化細胞選別(FACS)が含まれる。

20

#### 【0088】

さらに別の局面において、本開示は、Ang-2に対する結合親和性を有する本開示によるムテインを含む、診断用または分析用のキットを特徴とする。

#### 【0089】

さらなる局面において、本開示はまた、薬学的組成物を製造するための、開示されるAng-2結合hNGALムテインまたは本明細書において説明するこのようなムテインを含む組み合わせの使用も包含する。このようにして得られる薬学的組成物は、無秩序な血管新生に関連している疾患または障害、例えば、癌、眼の新血管新生疾患(例えば網膜症)、関節炎、および乾癬の治療、予防、および/または改善に適し得る。薬学的組成物は、単独療法または併用療法として使用され得る。したがって、本開示はまた、無秩序な血管新生に関連している疾患または障害、例えば、癌、眼の新血管新生疾患(例えば網膜症)、関節炎、および乾癬の治療のためのAng-2結合hNGALムテインも提供する。

30

#### 【0090】

診断法でのそれらの使用に加えて、さらに別の局面において、本開示は、対象におけるAng-2の結合のための、および/または対象における血管新生を阻害するか、もしくは減少させるための、本開示のこのようなムテインまたはこのようなムテインを含む組成物もしくは組み合わせの使用も包含する。いくつかの態様において、このような対象は、無秩序な血管新生に関連している疾患または障害、例えば、癌、眼の新血管新生疾患(例えば網膜症)、関節炎、および乾癬に罹患している場合がある。

40

#### 【0091】

さらに別の局面において、本開示は、対象におけるAng-2を結合させる方法であって、Ang-2に対する結合親和性を有する本開示の1種もしくは複数種のムテインまたはこのようなムテインを含む1種もしくは複数種の組成物もしくは組み合わせの有効量を該対象に投与する段階を含む方法を特徴とする。

#### 【0092】

さらに別の局面において、本開示は、対象における血管新生を阻害するか、または減少

50

させるための方法であって、Ang-2に対する結合親和性を有する本開示の1種もしくは複数種のムテインまたはそのようなムテインを含む1種もしくは複数種の組成物もしくは組み合わせの有効量を該対象に投与する段階を含む方法を含む。いくつかの態様において、このような対象は、無秩序な血管新生に関連している疾患または障害、例えば、癌、眼の新血管新生疾患(例えば網膜症)、関節炎、および乾癬に罹患している場合がある。

【0093】

本開示のムテインまたはそのようなムテインを含む組成物もしくは組み合わせは、とりわけ、無秩序な血管新生に関連している疾患または障害を含む、Ang-2活性に関連している任意の疾患または障害の治療、予防、および/または改善のために有用である。

【0094】

例えば、本開示のムテインまたはそのようなムテインを含む組成物もしくは組み合わせは、例えば、脳および髄膜、口腔咽頭、肺および気管支樹、胃腸管、雄性生殖管および雌性生殖管、筋肉、骨、皮膚および付属器、結合組織、脾臓、免疫系、造血細胞および骨髄、肝臓および尿路、ならびに眼のような特殊な感覚器官で発生する原発性および/または転移性の腫瘍に関する、対象における望まれない血管新生を特徴とする腫瘍増殖を阻害するか、または減少させるのに使用され得る。特定の態様において、本開示の抗体および抗原結合断片は、次の癌の1つまたは複数を治療するのに使用される:腎細胞癌、膵癌、乳癌、前立腺癌、悪性神経膠腫、骨肉腫、結腸直腸癌、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、滑膜肉腫、甲状腺癌、または黒色腫。

【0095】

いくつかの他の態様において、本開示のムテインまたはそのようなムテインを含む組成物もしくは組み合わせはまた、網膜症のような1種または複数種の眼障害を治療、予防、および/または改善するのにも有用であり得る。ムテインまたはそのようなムテインを含む組成物を用いて、またはそれらによって、治療、予防、および/または改善することができる例示的な眼障害には、例えば、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症、ならびに脈絡膜新生血管新生、血管漏出、網膜浮腫、および炎症を伴う他の眼障害が含まれる。さらに、緑内障手術に対するアジュvantとしてムテインを投与して、緑内障手術後の早期の血管形成およびリンパ脈管新生ならびに濾過胞へのマクロファージ遊走を防止し、臨床転帰を良くすることもできる。

【0096】

いくつかの追加の態様において、ムテインまたはそのようなムテインを含む組成物もしくは組み合わせは、高血圧、糖尿病(インスリン非依存性糖尿病を含む)、乾癬、関節炎(関節リウマチを含む)、喘息、敗血症、腎臓疾患、および浮腫などの血管疾患を治療、予防、または改善するのに使用される。いくつかの別の態様において、これらの疾患または障害は、傷害、脳卒中、または腫瘍に関連している。

【0097】

さらに、本明細書において開示するムテインまたはそのようなムテインを含む組成物もしくは組み合わせを用いて、1種または複数種の炎症性疾患または感染症を治療、予防、または改善することもできる。本開示の抗Ang-2ムテインまたはそのようなムテインを含む組成物の投与によって治療、予防、または改善することができる例示的な感染症には、マラリア(熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)感染症)、ウイルス性出血熱(例えばデング熱)、リケッチャ感染症、トキシックショック症候群、敗血症、C型肝炎、バルトネラ・バシリホルミス(*Bartonella bacilliformis*)感染症、リーシュマニア症、マイコバクテリア感染症、およびエプスタイン・バー(*Epstein-Barr*)ウイルス感染症が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0098】

本開示はまた、癌または血管疾患の転移を予防するため、または治療するための医薬を調製するための、本明細書において開示するムテインまたはそのようなムテインを含む組成物もしくは組み合わせの使用も企図する。

【0099】

10

20

30

40

50

本開示によるAng-2結合hNGALムテインまたはそのようなムテインを含む組成物もしくは組み合わせは、治療的に有効である任意の非経口的経路または非経口ではない(例えば腸内)経路を介して投与することができる。治療的に有効な経路は、所望の区画、系、または位置への作用物質の送達を実現する。例えば治療的に有効な経路は、それを介して、有益または所望の臨床結果をもたらすのに十分な量の作用物質を所望の作用部位で提供するように作用物質を投与することができる経路である。

【0100】

C. Ang-2結合ムテインと1種または複数種の抗血管新生剤との組み合わせ

血管新生には、正常内皮細胞の表面の受容体に血管内皮増殖因子(VEGF)のようなシグナル伝達分子が結合することが必要である。VEGFおよび他の内皮増殖因子が内皮細胞上のそれらの受容体に結合すると、新しい血管の成長および存続を促進する、これらの細胞内のシグナルが働き出す(initiated)。有効な抗血管新生治療様式の開発への1つのアプローチは、血管新生に関与している様々な標的、好ましくは、十分に離れたシグナル伝達経路に影響を与える標的に作用する作用物質を組み合わせることであった。

10

【0101】

したがって、本開示は、1種または複数種の抗血管新生剤と組み合わせた、Ang-2に特異的な本開示のhNGALムテインの使用を包含する。本明細書において使用される場合、「抗血管新生剤」とは、そのようなシグナル伝達分子の1つがその受容体に結合するのを阻害または邪魔することができる、任意の物質を意味する。いくつかの態様において、抗血管新生剤は、新しい血管の成長および存続を促進するシグナルの1つを妨害することができるか、または妨害するのに寄与する。

20

【0102】

いくつかの具体的な態様において、抗血管新生剤は、(i)Ang-1、Ang-2、Ang-3、Ang-4、および/またはTie-2のアンタゴニスト;(ii)Flt1、KDR、Flt4、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PIGF、および/またはEG-VEGFのアンタゴニスト;(iii)デルタ様リガンド4(DLL4、血管特異的ノッチ(Notch)リガンド)アンタゴニスト;(iv)上皮増殖因子受容体(EGFR)アンタゴニスト、ならびに(v)サイトカイン阻害剤を含む。

【0103】

さらに別のいくつかの態様において、Ang-2アンタゴニストは、本開示のhNGALムテイン、抗Ang-2抗体(その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8,133,979号を参照されたい)、ペプチボディ(その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8,129,331号を参照されたい)、またはCovXボディ(例えばCVX-060、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,521,425号を参照されたい)であってよい。いくつかの別の態様において、DLL4アンタゴニストは、抗DLL4抗体(例えば、米国特許出願第2009/0142354号で開示されているREGN421などの抗DLL4抗体)であってよい。いくつかの別の態様において、EGFRアンタゴニストは、抗EGFR抗体またはEGFR活性の低分子阻害剤であってよい。本開示の抗Ang-2 hNGALムテインと組み合わせて有益に投与され得る他の抗血管新生剤には、低分子サイトカイン阻害剤を含むサイトカイン阻害剤、ならびにIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18などのサイトカインおよび/またはそれらの各受容体に結合する抗体が含まれる。

30

【0104】

これに関して、本開示はまた、本明細書において言及する抗Ang-2 hNGALムテインのいずれか、およびVEGF、DLL4、EGFR、または前述のサイトカインのいずれかの1種または複数種に対するアンタゴニストのような抗血管新生剤を含む、治療的組み合わせも含み、その際、アンタゴニストは、アプタマー、アンチセンス分子、リボザイム、siRNA、ペプチボディ、ナノボディ、抗体、抗体断片(例えば、Fab断片;F(ab')<sub>2</sub>断片;Fd断片;Fv断片;scFv;dAb断片;人工的に設計した(engineered)分子(ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、および最小認識単位など);抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛薬、コルチコステロイド、および/または非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)であってよい。

40

【0105】

50

いくつかの態様において、前記人工的に設計した分子は、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、PANドメイン、G1aドメイン、SRCRドメイン、クニッツ/ウシ臍臓トリプシンインヒビタードメイン、テンダミstatt、カザル型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル(P型)ドメイン、フォン・ウィルブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、チログロブリンI型リピート、LDL受容体クラスAドメイン、スシ(Sushi)ドメイン、リンク(Link)ドメイン、トロンボスponジンI型ドメイン、免疫グロブリンドメインもしくは免疫グロブリン様ドメイン(例えば、ドメイン抗体もしくはラクダ重鎖抗体)、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、フォン・ウィルブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、F5/8 C型ドメイン、ヘモベキシンドドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、「カッパボディ」(III. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" Protein Eng 10:949-57 (1997))、「ミニボディ」(Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" EMBO J 13:5303-9 (1994))、「ダイアボディ」(Holliger et al. "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments" PNAS USA 90:6444-6448 (1993))、「ジャヌシン(janusin)」(Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10:3655-3659 (1991)およびTraunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992)、ナノボディ、アドネクチン、テトラネクチン、マイクロボディ、アフィリン、アフィボディ、アンキリン、クリスタリン、ノックティン、ユビキチン、亜鉛フィンガータンパク質、自家蛍光タンパク質、アンキリンもしくはアンキリンリピートタンパク質もしくはロイシンリッチリピートタンパク質、またはアビマー (Silverman, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlooth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, Nat Biotech, Dec;23(12):1556-61, E-Publication in Nat Biotech. 2005 Nov 20 edition) であってよい。  
10  
20

#### 【0106】

本開示の1種または複数種の付加的な作用物質と組み合わせる場合、抗Ang-2 hNGALムテインは、他の作用物質の投与の前に、同時に(例えば、同じ製剤中もしくは別々の製剤中)、または後に、投与されてよい。hNGALムテインおよび抗血管新生剤は、並行投与、同時投与、または順次投与を含めて、組み合わせて投与されてよい。いくつかの態様において、本開示の組み合わせ、hNGALムテイン、および抗血管新生剤は、投与され得る単一の組成物中に含まれてよい。組成物は、少なくとも1種の薬学的に許容されるアジュバント、希釈剤、または担体と一緒に、有効成分としての有効量のhNGALムテインおよび抗血管新生剤を含んでよい。これに関して、本開示の組み合わせは、薬学的に許容される成分ならびに確立された調製方法を用いて、組成物に配合することができる(Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。薬学的組成物を調製するために、薬学的に不活性な無機または有機の賦形剤を使用することができる。  
30  
40

#### 【0107】

hNGALムテインおよび抗血管新生剤はまた、個別に間隔をあけた独立した時点における投与を含めて、相互に独立して投与されてもよい。hNGALムテインと抗血管新生剤の組み合わせは、様々な形態および任意の方針(orientation)で提供されてよい。

#### 【0108】

本開示の抗Ang-2 hNGALムテインおよびその組み合わせはまた、放射線治療および/または従来の化学療法も含む治療計画の一環として投与されてもよい。

#### 【0109】

いくつかの具体的な態様において、抗血管新生剤は、VEGF/VEGF受容体系およびアンギ

50

オポエチン/Tie-2受容体系の任意の構成要素;すなわち、Flt1、KDR、Flt4、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PIGF、EG-VEGF、Ang-1、Ang-2、Ang-3、Ang-4、またはTie-2のいずれか1つに対するアンタゴニストである。VEGF-VEGFR経路およびTie-2経路は、インビボの血管新生の過程に不可欠な2つの独立した媒体とみなされるべきである(Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91; Jendreyko, N., et al., Journal of Biological Chemistry, 278:47812-47819 (2003); Jendreyko, N., et al., PNAS, 102:8293-8298 (2005))。

【0110】

さらに別のいくつかの態様において、抗血管新生剤はVEGF阻害剤である。VEGFファミリーは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、胎盤増殖因子(PIGF)、および内分泌腺由来VEGF(EG-VEGF)を含む。VEGFファミリーのメンバーは、3種の近縁の受容体型チロシンキナーゼ;VEGFR1(fms様チロシンキナーゼ受容体、Flt1)、VEGFR2(キナーゼ挿入ドメインを含む受容体、KDR)、およびVEGFR3(別のfms様チロシンキナーゼ受容体、Flt4)に、異なる親和性で結合することが公知である。

【0111】

本明細書において使用される場合、「VEGF阻害剤」とは、VEGF-VEGFR経路によるシグナル伝達を減少させる任意の物質を意味する。したがって、VEGF阻害剤は、VEGFファミリーの任意のメンバーおよび/または受容体型チロシンキナーゼのいずれか1つを阻害または邪魔し得る。ほんの数例を挙げれば、VEGF阻害剤は、低分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質であってよく、より具体的には抗体が含まれ、抗VEGF抗体、抗VEGFR抗体、細胞内抗体、マキシボディ、ミニボディ、ダイアボディ、Fc融合タンパク質、例えばペプチボディ、レセプチボディ(receptibodies)、可溶性VEGF受容体タンパク質および断片、ならびに様々なその他のものが含まれる。多くのVEGF阻害剤は、VEGFまたはVEGF受容体に結合することによって作用する。他のものは、VEGFもしくはVEGF受容体に結合する因子に、またはVEGFシグナル伝達経路の他の構成要素に結合することによって、より間接的に作用する。さらに他のVEGF阻害剤は、VEGF-VEGFR経路シグナル伝達を調整する調節的な翻訳後修飾を変更することによって作用する。本開示に従うVEGF阻害剤はまた、より間接的なメカニズムを通して作用し得る。どんなメカニズムが関与しているとも、本明細書において使用される場合、VEGF阻害剤は、所与の環境におけるVEGF-VEGFRシグナル伝達経路の有効な活性を、阻害剤の非存在下の同じ環境で存在すると思われる活性と比べて、減少させる。

【0112】

いくつかの具体的な態様において、VEGF阻害剤は、VEGF-Trap(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,087,411号を参照されたい)、抗VEGF抗体(例えばベバシズマブ)、VEGF受容体の低分子キナーゼ阻害剤(例えば、スニチニブ、ソラフェニブ、もしくはパゾパニブ)、抗VEGF涙液リポカリンムテイン(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるPCT出願PCT/EP2007/057971を参照されたい)、または抗VEGFR涙液リポカリンムテイン(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるPCT出願PCT/EP2007/057971を参照されたい)であってよい。

【0113】

いくつかの態様において、抗血管新生剤としてのVEGF阻害剤は、VEGF-Trap(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,087,411号を参照されたい)、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、ソラフェニブ(ネクサバール(登録商標))、スニチニブ(ステント(登録商標))、およびパゾパニブ(ボトリエント(登録商標))からなる群より選択される。

【0114】

いくつかの追加の態様において、VEGF阻害剤は、抗VEGF-A抗体(例えばベバシズマブ)のような、VEGF-Aのアンタゴニストであってよい。いくつかの他の態様において、VEGF-Aアンタゴニストは、VEGF-Aに対する結合特異性を有するリポカリンムテインであってよい(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるPCT出願PCT/EP2007/057971を参

10

20

30

40

50

照されたい)。

【0115】

いくつかの追加の態様において、VEGF阻害剤は、抗VEGF-C抗体のような、VEGF-Cのアンタゴニストであってよい(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,403,088号および同第8,486,397号を参照されたい)。いくつかの他の態様において、VEGF-Cアンタゴニストは、VEGF-Cに対する結合特異性を有するリポカリンムテインであってよい。

【0116】

いくつかの態様において、Ang-2に特異的な本開示のhNGALムテインは、複数種の抗血管新生剤と組み合わされ、例えば2種の場合、1つの作用物質は、本明細書において言及するVEGF-Aアンタゴニストであり、2つ目の作用物質は、本明細書において言及するVEGF-Cアンタゴニストである。

10

【0117】

いくつかの態様において、本開示は、対象における無秩序な血管新生を阻害するための、(i)Ang-2に特異的な本開示のhNGALムテインおよび(ii)1種または複数種の抗血管新生剤の使用を包含する。このような使用は、有効量の(i)Ang-2に特異的な本開示のhNGALムテインおよび(ii)1種または複数種の抗血管新生剤を対象に投与する段階を含む。

【0118】

同様に、本開示は、対象における無秩序な血管新生に関連している疾患または障害の治療、予防、または改善のための、(i)Ang-2に特異的な本開示のhNGALムテインおよび(ii)1種または複数種の抗血管新生剤の使用も開示する。いくつかの別の態様において、無秩序な血管新生に関連している疾患または障害には、癌、眼の新血管新生疾患(例えば網膜症)、関節炎、および乾癬が含まれる。いくつかの態様において、1つの抗血管新生剤は、本明細書において言及するVEGF-Aアンタゴニストであり、2つ目の抗血管新生剤は、本明細書において言及するVEGF-Cアンタゴニストである。

20

【0119】

Ang-2に対して検出可能な親和性を有するhNGALムテインに関するさらなる詳細は、本開示のセクションAで確認することができる。

【0120】

特に好ましい態様において、Ang-2に特異的であるhNGALムテインは、SEQ ID NO: 1~14およびそれらの機能的な断片または変種からなる群より選択される。いくつかの態様において、このような断片または変種は、SEQ ID NO: 1~14のいずれか1つにおいて定義されるムテインの構造的相同物である。

30

【0121】

本開示はまた、次のもの、すなわち(i)Ang-2に特異的な本開示のhNGALムテインおよび(ii)1種または複数種の抗血管新生剤の少なくとも1つを含む薬学的組成物にも関し、この組成物は、無秩序な血管新生を阻害する際に使用することができる。いくつかの態様において、1つの抗血管新生剤は、本明細書において言及するVEGF-Aアンタゴニストであり、2つ目の抗血管新生剤は、本明細書において言及するVEGF-Cアンタゴニストである。

【0122】

40

これに関して、本開示の組み合わせは、薬学的に許容される成分ならびに確立された調製方法を用いて、組成物に配合することができる(Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。薬学的組成物を調製するために、薬学的に不活性な無機または有機の賦形剤を使用することができる。

【0123】

さらに別の局面において、本開示は、対象における無秩序な血管新生に関連している疾患または障害を治療、予防、または改善する方法であって、少なくとも次のもの、すなわち(i)Ang-2に対して検出可能な親和性を有するhNGALのムテインおよび(ii)1種または複数種の抗血管新生剤を含む組成物の有効量を該対象に投与する段階を含む方法を特徴とする

50

。いくつかの別の態様において、無秩序な血管新生に関連している疾患または障害には、癌、眼の新血管新生疾患(例えば網膜症)、関節炎、および乾癬が含まれる。いくつかの態様において、1つの抗血管新生剤は、本明細書において言及するVEGF-Aアンタゴニストであり、2つ目の抗血管新生剤は、本明細書において言及するVEGF-Cアンタゴニストである。

【0124】

さらに別の局面において、本開示は、対象における無秩序な血管新生を阻害するか、または減少させる方法であって、少なくとも次のもの、すなわち(i)Ang-2に対して検出可能な親和性を有するhNGALのムテインおよび(ii)1種または複数種の抗血管新生剤を含む組成物の有効量を該対象に投与する段階を含む方法を含む。いくつかの態様において、1つの抗血管新生剤は、本明細書において言及するVEGF-Aアンタゴニストであり、2つ目の抗血管新生剤は、本明細書において言及するVEGF-Cアンタゴニストである。

10

【0125】

D. 本開示のムテイン

Ang-2に結合する本開示のムテインとの関連で本明細書において使用される場合、「に特異的な」という用語は、そのムテインがAng-2を標的とするか、Ang-2に結合するか、またはAng-2と反応することを含む。したがって、標的とすること、結合すること、または反応することは、ムテインがAng-2に特異的に結合することを含む。この文脈において「特異的に」という用語は、ムテインが本明細書において説明するようにAng-2と反応するが、別の標的とは本質的に反応しないことを意味する。ムテインが本明細書において上記に定義したように特異的に反応するかどうかは、特に、本開示のhNGALムテインとAng-2の反応を該ムテインと別の標的の反応と比較することによって、容易に試験することができる。「特異的結合」はまた、例えば、ウェスタンプロット、ELISA試験、RIA試験、ECL試験、IRMA試験、FACS、IHC、およびペプチドスキャンに基づいて判定することもできる。

20

【0126】

本開示によるムテインのアミノ酸配列は、別のリポカリンとの配列同一性と比べた場合、ヒトリポカリン2に対して高い配列同一性を有する(上記も参照されたい)。この一般的文脈において、本開示による組み合わせのムテインのアミノ酸配列は、対応するリポカリン(野生型hNGAL)のアミノ酸配列と少なくとも実質的に類似している。本開示による組み合わせのムテインの各配列は、成熟hNGALの配列と実質的に類似しており、例えば、成熟hNGALの配列に対して、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%の同一性(少なくとも95%の同一性を含む)である。これに関して、本開示のムテインは当然、他と比べて、ムテインをAng-2に結合できるようにする本明細書において説明する置換を含んでよい。典型的に、hNGALのムテインは、hNGALのネイティブ配列と比較して、hNGALのリガンド結合部位の開放端にある4つのループ中のアミノ酸の1つまたは複数の変異を含む。上記に説明したように、これらの領域は、Ang-2に対するムテインの結合特異性を定めるにあたってきわめて重要である。hNGALに由来するムテインまたはその相同物は、N末端領域中の、ならびに/または天然の結合ポケットと向かい合って位置している バレル構造の末端に並んでいる3つのペプチドループBC、DE、およびFG中の、任意の配列位置に、1個、2個、3個、4個、またはそれ以上の変異アミノ酸残基を有していてよい。

30

【0127】

本開示によるムテインは、対応するネイティブhNGALアライン(alin)と比較して、1つまたは複数の、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、またはさらに20個の置換を、そのようなムテインが当然Ang-2に結合できることを条件として、含む。例えば、ムテインは、hNGALの独特な位置に対応する位置に(すなわち、対応する位置に)、置換を有することができる。いくつかの態様において、本開示による組み合わせのムテインは、アルギニン残基によるネイティブアミノ酸の2個、3個、4個、5個、またはさらに多くのアミノ酸置換を含む、少なくとも2個のアミノ酸置換を含む。したがって、本明細書において説明するタンパク質「

40

50

参照」骨格の核酸は、Ang-2に結合することができるムテインを作製することを目指した変異誘発を受ける。

【0128】

また、本開示のムテインは、ムテインの(その標的、例えばAng-2に結合する)生物活性に影響を及ぼさずに、そのN末端またはC末端、好ましくはC末端に、Strepタグ、例えばStrep IIタグのような異種アミノ酸配列を含むこともできる。

【0129】

具体的には、野生型hNGALと異なるムテインのアミノ酸配列のアミノ酸残基が、野生型hNGALのアミノ酸配列の特定の位置に対応するかどうかを判定するために、当業者は、当技術分野において周知の手段および方法、例えば、手作業による、またはBLAST2.0(Basic Local Alignment Search Toolを意味する)もしくはClustalWまたは配列アライメントを作成するのに適している他の任意の適切なプログラムなどのコンピュータープログラムを使用することによる、アライメントを用いることができる。したがって、野生型hNGALは、「対象配列」または「参照配列」の役割を果たすことができ、一方、本明細書において説明する野生型hNGALと異なるムテインのアミノ酸配列は、「問い合わせ配列」の役割を果たす。「参照配列」および「野生型配列」という用語は、本明細書において同義的に使用される。

【0130】

いくつかの態様において、置換(substitution)(または置換(replacement))は、保存的置換である。それでもなお、非保存的置換または以下に列挙する例示的置換からの1つもしくは複数を含む、任意の置換が、次のことを条件として想定される:ムテインがAng-2に結合する能力を保持していること、および/またはムテインが、「元の」配列に対して、少なくとも60%、例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、もしくはより高い同一性であるという点で、その時に置換された配列に対して同一性を有すること。

【0131】

一般に、保存的置換は、以下の置換であり、変異させられるアミノ酸に応じて、保存的になるようを行うことができる1つまたは複数の置換をそれぞれ続けて記載している:  
Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp →

Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu

。他の置換もまた許容され、経験に基づいて、または他の公知の保存的置換もしくは非保存的置換を踏まえて、決定することができる。さらなる方針として、以下の8個のグループはそれぞれ、互いにとての保存的置換を定めるように典型的に選ぶことができるアミノ酸を含む:

- a. アラニン(Ala)、グリシン(Gly);
- b. アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu);
- c. アスパラギン(Asn)、グルタミン(Gln);
- d. アルギニン(Arg)、リジン(Lys);
- e. イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、メチオニン(Met)、バリン(Val);
- f. フェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)、トリプトファン(Trp);
- g. セリン(Ser)、トレオニン(Thr);および
- h. システイン(Cys)、メチオニン(Met)。

【0132】

このような置換によって生物活性が変化する場合は、以下のような、またはアミノ酸クラスについてさらに後述するような、より大幅な(substantial)変更を導入し、それらの産物を所望の特徴を求めてスクリーニングしてもよい。このようなより大幅な変更の例は

10

20

30

40

50

、  
Ala → Leu, Ile; Arg → Gln;

Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, ノルロイシン; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala  
である。

【 0 1 3 3 】

hNGALの生物学的特性の実質的な改変は、(a)例えば、シート状もしくはらせん状の立体構造としての、置換領域のポリペプチド骨格の構造、(b)分子の標的部位における電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさ、を維持することに対する影響が顕著に異なる置換を選択することによって、達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、次のグループに分けられる:(1)疎水性:ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン;(2)中性で親水性:システイン、セリン、トレオニン;(3)酸性:アスパラギン(aspartic)酸、グルタミン酸;(4)塩基性:アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン;(5)鎖の向きに影響する残基:グリシン、プロリン;および(6)芳香族:トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン。

【 0 1 3 4 】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。hNGALの適切な立体構造を維持するのに関与していない任意のシステイン残基を、通常はセリンで置換して、分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を防止することもできる。逆に、システイン結合を追加して安定性を向上させてもよい。

【 0 1 3 5 】

上記の挿入を含む任意の変異は、確立されている標準的方法を用いて、核酸、例えばDNAレベルで、非常に容易に達成することができる。アミノ酸配列の変更の例示的な例は、挿入または欠失、ならびにアミノ酸置換である。このような置換は保存的であることができ、すなわち、あるアミノ酸残基が、特に大きさだけでなく極性に関しても化学的に特性が類似しているアミノ酸残基で置換される。保存的置換の例は、次のグループのメンバー間の置換である:1)アラニン、セリン、およびトレオニン;2)アスパラギン酸およびグルタミン酸;3)アスパラギンおよびグルタミン;4)アルギニンおよびリジン;5)イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン;ならびに6)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。その一方で、アミノ酸配列に非保存的変更を導入することも可能である。さらに、単一のアミノ酸残基を置換する代わりに、hNGALの一次構造の1つまたは複数の連続的アミノ酸を挿入するかまたは欠失させることもまた、これらの欠失または挿入の結果、安定なフォールディングされた/機能的ムテインが得られる限りにおいて、可能である。

【 0 1 3 6 】

アミノ酸配列の改変には、特定の制限酵素のための切断部位を組み入れることにより、変異したhNGAL遺伝子またはその一部分のサブクローニングを容易にするための、単一のアミノ酸位置を指定した(directed)変異誘発が含まれる。さらに、これらの変異は、Ang-2のような所与の標的に対するムテインの親和性をさらに向上させるために組み入れることもできる。さらに、変異は、必要に応じて、ムテインのいくつかの特徴を変えるため、例えば、フォールディング安定性、血清安定性、タンパク質耐性、もしくは水溶性を向上させるため、または凝集傾向を小さくするために、導入することもできる。例えば、天然に存在するシステイン残基を他のアミノ酸に変異させて、ジスルフィド架橋の形成を防ぐことができる。また、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、ビオチン、ペプチド、もしくはタンパク質などの他の化合物に結合させるため、または天然に存在しないジスルフィド結合を形成させるために、新しい反応性基を導入することを目的として、他のアミノ酸配列位置をシステインに故意に変異させることも可能である。生成されたチオール部分は、例えば、各ムテインの血清半減期を長くするため

10

20

30

40

50

に、ムテインをPEG化またはHES化するのに使用され得る。

#### 【0137】

また、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、ビオチン、ペプチド、もしくはタンパク質などの他の化合物にコンジュゲートさせるため、または天然に存在しないジスルフィド結合を形成させるために、新しい反応性基を導入することを目的として、他のアミノ酸配列位置をシステインに変異させることも可能である。

#### 【0138】

いくつかの態様において、上記の部分の1つが本開示のムテインにコンジュゲートされる場合、アミノ酸側鎖へのコンジュゲーションが有利であり得る。適切なアミノ酸側鎖は、hNGALのアミノ酸配列中に天然に存在する場合があり、または変異誘発によって導入されてもよい。適切な結合部位を変異誘発によって導入する場合、1つの実行可能な手段は、適切な位置のアミノ酸をシステイン残基によって置換することである。

10

#### 【0139】

ヒトリポカリン2のムテインに関して、ヒトリポカリン2ムテインを含むリポカリンのアミノ酸配列にシステイン残基を導入するためのこのような変異の例示的な実行可能な手段(possibilities)には、ヒトNGALの野生型配列の配列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146、または158に対応する配列位置の少なくとも1つにおける、システイン(Cys)残基の導入が含まれる。SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセッション番号P80188の配列と比較して、システインが別のアミノ酸残基によって置換された配列を、本開示のヒトリポカリン2ムテインが有するいくつかの態様において、対応するそのシステインは、その配列に再導入されてもよい。例示的な例として、アミノ酸位置87のシステイン残基は、SWISS-PROTアクセッション番号P80188の配列中に当初存在していたようにシステインに戻すことによって、そのような場合に導入され得る。アミノ酸位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146、および/または158のいずれかの側面に生成されたチオール部分は、例えば、各ヒトリポカリン2ムテインの血清半減期を長くするために、ムテインをPEG化またはHES化するのに使用され得る。

20

#### 【0140】

別の態様において、本開示によるムテインに上記の化合物の1つをコンジュゲートさせるのに適切なアミノ酸側鎖を提供するために、人工アミノ酸が変異誘発によって導入されてもよい。一般に、このような人工アミノ酸は、反応性がより高くなるように、したがって、所望の化合物へのコンジュゲーションを促進するように、設計されている。人工tRNAを介して導入され得るそのような人工アミノ酸の1つの例は、パラ-アセチル-フェニルアラニンである。

30

#### 【0141】

いくつかの態様において、本開示のムテインは、そのN末端またはそのC末端において、タンパク質、タンパク質ドメイン、またはペプチド、例えば、シグナル配列および/またはアフィニティータグに融合されてよい。

#### 【0142】

Strepタグ(登録商標)もしくはStrepタグ(登録商標)II(Schmidt, T.G.M. et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766)、mycタグ、FLAGタグ、His6タグ、もしくはHAタグなどのアフィニティータグ、または組換えタンパク質の容易な検出および/もしくは精製を同じく可能にするグルタチオン-S-トランスフェラーゼのようなタンパク質は、適切な融合パートナーのさらなる例である。最後に、緑色蛍光タンパク質(GFP)または黄色蛍光タンパク質(YFP)などの発色特性または蛍光特性を有するタンパク質も、同様に本開示のムテインにとって適切な融合パートナーである。

40

#### 【0143】

一般に、化学反応、物理反応、光学的反応、または酵素反応において検出可能な化合物またはシグナルを直接的にまたは間接的に生じる任意の適切な化学物質または酵素で本開示のムテインを標識することが可能である。物理的反応および同時に光学的反応/マーカーの例は、放射性標識を用いる場合にX線を照射または放射された際の蛍光発光である。

50

アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、および -ガラクトシターゼは、発色性反応生成物の形成を触媒する酵素標識(同時に光学的標識)の例である。一般に、抗体に対して通常使用される標識すべて(免疫グロブリンのFc部分の糖部分と共にもっぱら使用されるものを除く)もまた、本開示のムテインにコンジュゲートさせるために使用され得る。本開示のムテインはまた、例えば、任意の適切な治療活性を有する作用物質を所与の細胞、組織、もしくは器官に狙いを定めて送達するため、または周囲の正常細胞に影響を及ぼさずに細胞、例えば腫瘍細胞を選択的に標的とするために、そのような作用物質とコンジュゲートさせることもできる。このような治療活性を有する作用物質の例には、放射性核種、毒素、有機低分子、および治療用ペプチド(例えば、細胞表面受容体のアゴニスト/アンタゴニストとして作用するペプチドまたは所与の細胞標的上のタンパク質結合部位を得るために競合するペプチド)が含まれる。しかしながら、本開示のムテインはまた、アンチセンス核酸分子、低分子干渉RNA、マイクロRNA、またはリボザイムなどの治療活性を有する核酸とコンジュゲートさせることもできる。このようなコンジュゲートは、当技術分野において周知の方法によって作製することができる。

#### 【0144】

先に示したように、いくつかの態様において、本開示のムテインは、ムテインの血清半減期を延長する部分にコンジュゲートされ得る(この点に関して、このようなコンジュゲーション戦略が、CTLA-4に対する結合親和性を有するヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンのムテインに関して説明されているPCT公報WO 2006/56464も参照されたい)。血清半減期を延長する部分は、ほんの少し挙げると、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンプン、パルミチン酸のような脂肪酸分子(Vajo & Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* 52, 1-9)、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、またはアルブミン結合タンパク質、トランスフェリンであってよい。アルブミン結合タンパク質は、細菌アルブミン結合タンパク質、抗体、ドメイン抗体を含む抗体断片(例えば、米国特許第6,696,245号を参照されたい)、またはアルブミンに対する結合活性を有するムテインであってよい。したがって、本開示のムテインの半減期を延長するための適切なコンジュゲーションパートナーには、アルブミン結合タンパク質、例えば、連鎖球菌プロテインGの1種のような細菌アルブミン結合ドメイン(Konig, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83)が含まれる。コンジュゲーションパートナーとして使用され得るアルブミン結合ペプチドの他の例は、例えば、米国特許出願第2003/0069395号(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)またはDennis et al. (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 35035-35043)において説明されているように、Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cysコンセンサス配列[式中、Xaa<sub>1</sub>はAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり;Xaa<sub>2</sub>はAsn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり;Xaa<sub>3</sub>はAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり;かつXaa<sub>4</sub>はAsp、Gly、Leu、Phe、Ser、またはThrである]を有するものである。

#### 【0145】

他の態様において、アルブミンそれ自体(Osborn, B.L. et al., 2002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 540-548)またはアルブミンの生物活性断片は、本開示のムテインのコンジュゲーションパートナーとして使用され得る。「アルブミン」という用語は、ヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンもしくはラットアルブミンなどの哺乳動物アルブミンすべてを含む。アルブミンまたはその断片は、米国特許第5,728,553号または欧州特許出願EP0330451およびEP0361991(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)において説明されているように組換えによって作製することができる。組換えヒトアルブミン(リコンブミン(Recombumin)(登録商標))Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK)が、本開示のムテインの半減期を延長するために、このムテインにコンジュゲートまたは融合され得る。

#### 【0146】

アルブミン結合タンパク質が抗体断片である場合、それはドメイン抗体であってよい。

10

20

30

40

50

ドメイン抗体(dAb)を操作して、生物物理学的特性およびインビボ半減期の正確な制御を可能にして、最適な安全性および有効性の生成物プロファイルを作り出す。例えば、ドメイン抗体は、Domantis Ltd.(Cambridge, UKおよびMA, USA)から市販されている。

#### 【 0 1 4 7 】

本開示のムテインの血清半減期を延長するための部分としてトランスフェリンを用いて、非グリコシル化トランスフェリンのN末端もしくはC末端または両方にムテインを遺伝学的に融合させることができる。非グリコシル化トランスフェリンの半減期は14～17日であり、トランスフェリン融合タンパク質は、延長された半減期を同様に有すると考えられる。また、トランスフェリン担体は、高度な生物学的利用能、体内分布、および循環血中安定性も与える。この技術は、BioRexis(BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA)から市販されている。タンパク質安定化物質/半減期延長パートナーとして使用するための組換えヒトトランスフェリン(デルタフェリン(DeltaFerrin)(商標))もまた、Novozymes Delta Ltd.(Nottingham, UK)から市販されている。

#### 【 0 1 4 8 】

免疫グロブリンのFc部分が、本開示のムテインの血清半減期を延長する目的で使用される場合、Syntonix Pharmaceuticals, Inc(MA, USA)から市販されているSynFusion(商標)技術が使用され得る。このFc融合技術の使用により、より長い時間作用する生物薬剤を作ることが可能になり、例えば、薬物動態、溶解度、および製造効率を向上させるために抗体のFc領域に連結されたムテインの2つのコピーからなり得る。

#### 【 0 1 4 9 】

本開示のムテインの半減期を延長するためのさらに別の代替方法は、ムテインのN末端またはC末端に、長くて明確な構造を持たず柔軟なグリシンリッチ配列(例えば、約20～80個の連続したグリシン残基を有するポリグリシン)を融合することである。例えばWO2007/038619において開示されているこのアプローチは、「rPEG」(recombinant PEG)とも呼ばれている。

#### 【 0 1 5 0 】

ポリアルキレングリコールがコンジュゲーションパートナーとして使用される場合、このポリアルキレングリコールは、置換型、非置換型、直鎖状、または分枝状であることができる。また、これは、活性化ポリアルキレン誘導体であってもよい。適切な化合物の例は、インターフェロンに関してWO 99/64016、米国特許第6,177,074号、もしくは米国特許第6,403,564号において説明されているか、またはPEG修飾アスパラギナーゼ、PEG-アデノシンデアミナーゼ(PEG-ADA)、もしくはPEG-スーパーオキシドジスムターーゼなどの他のタンパク質に関して説明されている(例えば、Fuertges et al. (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148を参照されたい)、ポリエチレングリコール(PEG)分子である。ポリエチレングリコールのようなこのようなポリマーの分子量は、約300～約70,000ダルトンに及んでよく、例えば、分子量が約10,000ダルトン、約20,000ダルトン、約30,000ダルトン、または約40,000ダルトンのポリエチレングリコールが含まれる。さらに、例えば米国特許第6,500,930号または同第6,620,413号で説明されているように、デンプンまたはヒドロキシエチルデンプン(HES)などの炭水化物オリゴマーおよび炭水化物ポリマーを、血清半減期を延長する目的で本開示のムテインにコンジュゲートさせることができる。

#### 【 0 1 5 1 】

さらに、本明細書において開示するムテインは、酵素活性または他の分子に対する結合親和性などの新しい特徴を本開示のムテインに与え得る部分に融合されてもよい。適切な融合パートナーの例は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、プロテインGのアルブミン結合ドメイン、プロテインA、抗体断片、オリゴマー形成ドメイン、または毒素である。

#### 【 0 1 5 2 】

特に、本明細書において開示するムテインを別々の酵素活性部位と融合し、その結果、得られた融合タンパク質の両方の「構成要素」が、所与の治療標的に対して一緒に作用す

10

20

30

40

50

るようになることがある場合がある。ムテインの結合ドメインが、疾患の原因となる標的に結合して、酵素ドメインが標的の生物学的機能を無効にすることを可能にする。

#### 【0153】

本開示はまた、本開示のムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子(DNAおよびRNA)にも関する。遺伝コードの縮重により、いくつかのコドンが、同じアミノ酸を指定する他のコドンによって置換されることが可能であるため、本開示は、本明細書において説明するムテインをコードするある特定の核酸分子に限定されず、機能的ムテインをコードするヌクレオチド配列を含むあらゆる核酸分子を包含する。これに関して、本開示は、本開示のいくつかのムテインをコードする、SEQ ID NO: 21～34に示すヌクレオチド配列を提供する。

10

#### 【0154】

本開示の1つの態様において、方法は、ヒトNGALの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO: 16)の配列位置28、36、40、41、49、52、65、68、70、72～74、77、79、81、87、96、100、103、106、116、125、126、127、129、132、および134に対応する配列位置の少なくとも1個、まではさらにそれ以上をコードするヌクレオチドトリプレットにおける変異誘発に、核酸分子を供する段階を含む。

#### 【0155】

本開示はまた、実験による変異誘発で指定された配列位置以外にその他の変異を含む本開示のムテインをコードする核酸分子も含む。このような変異は、許容されることが多い、または有利であることが判明する場合さえあり、例えば、それらの変異がムテインのフォールディング効率、血清安定性、熱安定性、またはリガンド結合親和性の向上に寄与する場合がそうである。

20

#### 【0156】

本出願において開示する核酸分子は、この核酸分子の発現を可能にするために1つの調節配列(または複数の調節配列)に「機能的に連結され」てよい。

#### 【0157】

DNAのような核酸分子は、転写調節および/または翻訳調節に関する情報を含む配列エレメントを含み、そのような配列が、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「機能的に連結され」ている場合、「核酸分子を発現させることができる」または「ヌクレオチド配列の発現を可能にする」ことができると呼ばれる。機能的な連結とは、調節配列エレメントおよび発現されるべき配列が、遺伝子発現を可能にするように結合されている連結である。遺伝子発現に必要な調節領域の厳密な性質は、種によって様々であり得るが、一般に、これらの領域はプロモーターを含み、プロモーターは、原核生物では、両方のプロモーター、すなわち、転写開始を指示するDNAエレメント、ならびにRNAに転写されると翻訳開始の合図を出すと考えられるDNAエレメントをそれ自体が含む。通常、このようなプロモーター領域は、原核生物の-35/-10ボックスおよびシャイン・ダルガノエレメント、または真核生物のTATAボックス、CAAT配列、および5'キャッピングエレメントなどの、転写および翻訳の開始に関する5'非コード配列を含む。また、これらの領域は、エンハンサーエレメントまたはリプレッサーエレメント、ならびにネイティブなポリペプチドを宿主細胞の特定の区画にターゲティングするための翻訳されたシグナル配列およびリーダー配列も含み得る。

30

#### 【0158】

さらに、3'非コード配列は、転写終結またはポリアデニル化などに関与している調節エレメントを含み得る。しかしながら、これらの終結配列が、特定の宿主細胞において充分に機能的ではない場合、それは、その細胞において機能的なシグナルで置換されてよい。

40

#### 【0159】

したがって、本開示の核酸分子は、プロモーター配列のような調節配列を含むことができる。いくつかの態様において、本開示の核酸分子は、プロモーター配列および転写終結配列を含む。例えば、適切な原核生物プロモーターは、tetプロモーター、lacUV5プロモ

50

ーター、またはT7プロモーターである。真核細胞における発現に有用なプロモーターの例は、SV40プロモーターまたはCMVプロモーターである。

#### 【0160】

本開示の核酸分子はまた、ベクターまたは他の任意の種類のクローニングベクター、例えば、プラスミド、ファージミド、ファージ、バキュロウイルス、コスミド、もしくは人工染色体の一部分であることもできる。

#### 【0161】

1つの態様において、核酸分子はファスミドに含まれている。ファスミドベクターとは、関心対象のcDNAに融合されたM13またはf1などの溶原性(temperate)ファージの遺伝子間領域またはその機能的部分をコードするベクターを意味する。細菌宿主細胞にそのようなファージミドベクターおよび適切なヘルパーファージ(例えば、M13K07、VCS-M13、またはR408)を重感染させた後に、無傷のファージ粒子が生産され、それによって、コードされた異種cDNAを、ファージ表面に提示された対応するポリペプチドに物理的に結び付けることが可能になる(例えば、Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401-424、またはRodríguez, D.J., and Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-93を参照されたい)。

10

#### 【0162】

このようなクローニングベクターは、前述の調節配列および本明細書において説明するムテインをコードする核酸配列とは別に、発現に使用される宿主細胞と適合性のある種に由来する複製配列および制御配列、ならびに形質転換された細胞または形質移入された細胞に選択可能な表現型を与える選択マーカーを含むことができる。多数の適切なクローニングベクターが当技術分野において公知であり、市販されている。

20

#### 【0163】

本明細書において説明するムテインをコードするDNA分子、特に、そのようなムテインのコード配列を含むクローニングベクターを、その遺伝子を発現することができる宿主細胞に形質転換させることができる。形質転換は、標準的技術を用いて実施することができる。したがって、本開示は、本明細書において開示する核酸分子を含む宿主細胞も対象としている。

#### 【0164】

形質転換された宿主細胞は、本開示の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を発現するのに適した条件下で培養される。適切な宿主細胞は、大腸菌(*Escherichia coli* (*E. coli*))もしくは枯草菌(*Bacillus subtilis*)などの原核性であるか、またはサッカロミセス・セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、SF9昆虫細胞もしくはHigh5昆虫細胞、不死化哺乳動物細胞株(例えば、HeLa細胞もしくはCHO細胞)、もしくは初代哺乳動物細胞などの真核性であることができる。

30

#### 【0165】

また、本開示は、本明細書において説明するムテインを産生するための方法であって、ムテインもしくはポリペプチド、ムテインの断片、またはムテインの融合タンパク質が、そのムテインまたはポリペプチドをコードする核酸から出発して、遺伝子操作方法により产生される、方法にも関する。この方法は、インビポで実施することができ、例えば、ムテインまたはポリペプチドを、細菌宿主生物または真核性宿主生物において产生し、次いで、この宿主生物またはその培養物から単離することができる。また、例えば、インビトロの翻訳系を用いて、タンパク質をインビトロで产生することも可能である。

40

#### 【0166】

インビポでムテインを産生する場合、そのようなムテインまたはポリペプチドをコードする核酸は、(前の部分で既に概説したように)組換えDNA技術を用いて適切な細菌宿主生物または真核性宿主生物中に導入される。この目的のために、宿主細胞は最初に、確立された標準的方法を用いて、本明細書において説明するムテインをコードする核酸分子を含むクローニングベクターで形質転換される。次いで、宿主細胞は、異種DNAの発現、したがって対応するポリペプチドの合成の発現を可能にする条件下で培養される。続いて、そ

50

のポリペプチドが、細胞または培養培地のいずれかから回収される。

【0167】

いくつかの態様において、本出願において開示するDNAのような核酸分子は、本開示の融合タンパク質の発現を可能にするように、本開示の別の核酸分子に「機能的に連結され」てよい。これに関して、機能的な連結とは、第1の核酸分子の配列エレメントおよび第2の核酸分子の配列エレメントが、単一のポリペプチドとして融合タンパク質を発現することを可能にするように結合されている連結である。

【0168】

さらに、いくつかの態様において、Cys76とCys175の間に天然に存在するジスルフィド結合が、本開示のhNGALムテインにおいて除かれてもよい。したがって、そのようなムテインは、還元性の酸化還元環境を有する細胞区間、例えば、グラム陰性細菌の細胞質において作製され得る。

10

【0169】

本開示のムテインが分子内ジスルフィドを含む場合、適切なシグナル配列を用いて、酸化性の酸化還元環境を有する細胞区間に新生ポリペプチドを向かわせることが好ましい場合がある。このような酸化性環境は、大腸菌のようなグラム陰性細菌の周辺質によって、グラム陽性細菌の細胞外環境において、または真核細胞の小胞体の内腔において提供され得、通常、構造的なジスルフィド結合の形成を促進する。

【0170】

しかしながら、宿主細胞、好ましくは大腸菌のサイトゾルにおいて本開示のムテインを作製することもまた可能である。この場合、ムテインまたはポリペプチドは、可溶性の折り畳まれた状態で直接的に獲得され得るか、または封入体の形態で回収され、続いてインビトロで復元され得る。別の選択肢は、酸化性の細胞内環境を有しており、したがって、サイトゾルでのジスルフィド結合形成を可能にし得る特定の宿主株を使用することである(Venturi et al. (2002) *J. Mol. Biol.* 315, 1-8.)。

20

【0171】

しかしながら、本明細書において説明するムテインまたはポリペプチドは、必ずしも、遺伝子工学だけを用いて生成または作製しなくてもよい。もっと正確に言えば、このようなムテインまたはポリペプチドは、メリフィールド固相ポリペプチド合成のような化学合成によって、またはインビトロの転写および翻訳によって得ることもできる。例えば、分子モデリングを用いて有望な変異を特定し、次いで、求められている(設計された)ポリペプチドをインビトロで合成し、Ang-2に対する結合活性を調査することが可能である。タンパク質を固相合成および/または溶相合成するための方法は、当技術分野において周知である(例えば、Bruckdorfer, T. et al. (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 29-43を参照されたい)。

30

【0172】

別の態様において、本開示のムテインまたはポリペプチドは、当業者に公知の十分に確立した方法を用いるインビトロの転写/翻訳によって作製され得る。

【0173】

熟練した研究者は、本開示によって企図されるが、そのタンパク質配列または核酸配列が本明細書において明確に開示されないムテインまたはそのポリペプチドを調製するのに有用な方法を認識するであろう。概要として、アミノ酸配列のこのような改変には、例えば、特定の制限酵素のための切断部位を組み入れることにより、変異したhNGAL遺伝子またはその一部分のサブクローニングを容易にするための、単一のアミノ酸位置を指定した(directed)変異誘発が含まれる。さらに、これらの変異は、その標的(例えば、それぞれAng-2またはAng-1)に対するムテインの親和性をさらに向上させるために組み入れることもできる。さらに、変異は、必要に応じて、ムテインのいくつかの特徴を変えるため、例えば、フォールディング安定性、血清安定性、タンパク質耐性、もしくは水溶性を向上させるため、または凝集傾向を小さくするために、導入することもできる。例えば、天然に存在するシステイン残基を他のアミノ酸に変異させて、ジスルフィド架橋の形成を防ぐこと

40

50

ができる。

【0174】

本明細書において開示するムテインまたはそのポリペプチドおよびそれらの誘導体は、抗体またはその断片と同様の多くの分野で使用され得る。例えば、ムテインは、酵素、抗体、放射性物質、または生化学的活性もしくは所定の結合特徴を有する他の任意の基で標識するために使用することができる。そうすることによって、それらの各標的またはそのコンジュゲートもしくは融合タンパク質を検出するか、またはそれらと接触させることができる。さらに、本開示のムテインまたはそのポリペプチドは、確立された分析方法(例えば、ELISAもしくはウェスタンプロット)を用いて、または顕微鏡検査もしくは免役検知法(immunosensorics)によって、化学構造を検出するのに役立つことができる。これに関して、検出シグナルは、適切なムテインコンジュゲートもしくは融合タンパク質を用いて直接的に、または抗体を介して、結合したムテインを免疫化学的に検出することによって間接的に、生成させることができる。

【0175】

本開示のその他の目的、利点、および特徴は、限定することを意図しない以下の実施例およびその添付図面を考察すると、当業者に明らかになるであろう。したがって、本開示は例示的な態様および任意の特徴によって具体的に開示されるが、本明細書において開示されその中で具体化される開示内容の修正および変更を当業者は行ってもよいこと、ならびにそのような修正および変更が本開示の範囲内であるとみなされることを理解すべきである。

10

【実施例】

【0176】

実施例1:Ang-2に特異的に結合するムテインの選択

成熟hNGALのランダム変異誘発によって作製したライブラリーを、ヒトAng-2に特異的に結合するムテインの選択のために使用した。

【0177】

これらのライブラリーから得た $2 \times 10^{12}$ 個のファージミドを、200nMのビオチン標識ヒトAng-2(R & D System)と共にインキュベートした。ニュートラアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズを用いて、標的/ファージミド複合体を捕捉し、続いて磁石を用いてそれらを単離した。PBSTまたはPBSでビーズを洗浄することにより、結合されなかったファージミドを除去した。結合したファージミドを、70mMトリエチルアミン300μlを用いて最初に溶出させ、続いて、100μlの1M Tris-Cl pH6.0を用いて上清を直ちに中和した。1回の中間洗浄サイクルの後に、100mMグリシンpH2.2を10分間用いて、残存するファージミドを溶出させ、続いて、0.5M Tris塩基50μlを用いて直ちに中和した。両方の溶出画分を集め、再増幅させるために大腸菌XL1ブルー培養物4mlを感染させるのに使用した。

20

【0178】

選択を4回連続して実施した。4回目の選択から得られた結果物に感染させた大腸菌細胞からファージミドDNAを調製し、消化によってhNGALムテインカセットを単離した。このhNGALムテインカセットを、テトラサイクリンプロモーターの制御下でhNGALムテインを細菌に産生させることを可能にする同様に切断したベクターに挿入した。ライゲーション混合物を用いて、CaCl<sub>2</sub>によってコンピテントにしたTG1-F'細胞を形質転換し、LB/Ampプレート上に播種した。

30

【0179】

Ang-2特異的ムテインを最適化するために、ムテインSEQ ID NO: 1およびSEQ ID NO: 3に基づいて、追加のライブラリーを作製した。選択された位置のバイアスをかけたランダム化またはエラープローンポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく方法のいずれかを用いて、ライブラリーを作製した。前述したようにして、ただしストリンジンジャーを高くして、最適化されたムテインの選択を実施した。

【0180】

40

50

実施例2: ハイスループットなELISAスクリーニングを用いる、Ang-2に特異的に結合するムテインの同定

個々のコロニーを用いて、2×YT/Amp培地に植え付け、定常期になるまで一晩(14~18時間)増殖させた。続いて、定常期の培養物から50 μlの2×YT/Ampを植え付け(inoculated)、37℃で3時間、次いで22℃に変えて、OD<sub>595</sub>が0.6~0.8に達するまでインキュベートした。1.2 μg/mlアンヒドロテトラサイクリンを添加した2×YT/Amp 10 μlを添加することによって、ムテインの産生を誘導した。翌日まで22℃で培養物をインキュベートした。PBS/T中5% (w/v) BSA 40 μlを添加し25℃で1時間インキュベーションした後、培養物は、スクリーニングアッセイ法で使用する準備が整った状態となった。

【0181】

ニュートラアビジンおよびストレプトアビジンの1:1混合物(PBS中5 μg/ml)を4℃で一晩、マイクロタイタープレートにコーティングすることによって、ヒトAng-2に対する単離されたムテインの特異的結合を試験した。PBST中2%BSAでプレートを1時間ブロックした後、選択のために使用されるビオチン標識標的を、PBS/T中1 μg/mlの濃度で、コーティングされたマイクロタイタープレート上に捕捉した。ビオチン標識標的を用いずに同じ様式でコーティングしたプレートを、スクリーニングにおいて陰性対照標的として使用した。続いて、BSAでブロックした培養物20 μlを、捕捉された標的またはアルドステロンのいずれかを含むコーティングされたマイクロタイタープレートに添加し、25℃で1時間インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ(IBA, Boettingen)がコンジュゲートされた抗Streptag抗体と共に1時間インキュベーションした後、結合されたムテインを検出した。定量のために、QuantaBlu蛍光原性ペルオキシダーゼ基質20 μlを添加し、励起波長320nmおよび発光波長430nmで蛍光を測定した。次いで、Ang-2に特異的に結合するムテインの配列を決定した。

【0182】

親和性および安定性が高まっているムテインを選択するために、i)低い抗原濃度、および/またはii) Tie-2 Fc(Reliatech)との競合、および/またはiii)標的プレートに添加する前の65℃もしくは70℃でのスクリーニング上清のインキュベーションを用いて、および/またはiv)逆のスクリーニング形式(抗Streptag抗体(Qiagen)でコーティングしたマイクロタイタープレート上でStreptagを介してムテインを捕捉し、様々な濃度の標的を添加し、HRP標識した抗Hisタグ抗体(Abcam)を用いて検出する)を用いて、スクリーニングを実施した。

【0183】

実施例3: ムテインの発現

2YT-Amp培地中で、Strep-tag(登録商標)IIを含むC末端配列(SEQ ID NO: 15)を有する独特なムテインを発現させて、Strep-Tactinアフィニティークロマトグラフィーを用いて、発現後のムテインを精製した。分離用サイズ排除クロマトグラフィーが応用できた。

【0184】

実施例4: ELISAに基づく設定における、Ang-2へのムテインの親和性

ムテインの結合をサンドイッチELISAアッセイ法によって試験した。詳細には、蛍光測定に適した384ウェルプレート(Greiner FLUOTRAC(商標)600、黒色平底、高結合能)を、4℃で一晩、PBS中濃度5 μg/mlの20 μlのAng-2でコーティングした。洗浄後、Ang-2でコーティングしたウェルを、0.1%Tween20および2%BSAを含むブロッキング緩衝液(PBS-T/BSA)100 μlを用いて、室温で1時間ブロックした。

【0185】

段階的に希釈したムテイン20 μlをPBS-T/BSA中、室温(RT)で1時間、インキュベートした。

【0186】

残留している上清を廃棄し、PBS-T/BSAに溶かした所定の最適濃度のHRP標識抗Streptag抗体20 μlを添加し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、蛍光原性HRP基質(Quanta Blu, Thermo)20 μlを各ウェルに添加し、15~60分間、反応を進行させた。プレートのす

10

20

30

40

50

べてのウェルの蛍光強度を、蛍光マイクロプレートリーダー(TecanまたはMolecular Devices)を用いて読み取った。曲線の当てはめは、GraphPad Prism 4ソフトウェアを用いて実施した。得られたEC50値を下記の表1にまとめて示す。

【 0 1 8 7 】

(表1)

ムテインSEQ ID	EC50 平均値 [nM]	
SEQ ID NO: 1	3.7	10
SEQ ID NO: 2	3	
SEQ ID NO: 3	2.8	
SEQ ID NO: 5	3.5	
SEQ ID NO: 7	2.1	
SEQ ID NO: 8	2.4	
SEQ ID NO: 9	2.1	
SEQ ID NO: 11	2.3	20

【 0 1 8 8 】

実施例5: Ang-2に結合するリポカリンムテインの競合的な作用様式

選択されたムテインが競合的な様式でヒトAng-2に結合するかどうかを、競合ELISA様式のアッセイ法を用いてインビトロで試験した(図1の例示的なリポカリンムテインを参照されたい)。この実験において、一定の濃度のヒトAng-2を、様々な濃度のリポカリンムテインと共に1時間インキュベートした。溶液中でのこのプレインキュベーションの後、一定量のリポカリンムテイン/Ang-2混合物を、ヒトTie-2受容体でコーティングしたELISAプレートに移して、hTie-2に結合するのを妨害されなかったhAng-2の濃度を測定した。

【 0 1 8 9 】

インキュベーション段階はすべて、300rpmで振盪しながら実施し、各インキュベーション段階の後に、Bioteck EL405 select CW洗浄機(Bioteck)を用いてPBS-T緩衝液(PBS、0.05%Tween20)80 μlでプレートを5回洗浄した。第1段階において、PBSに溶かした濃度2 μg/mlの可溶性ヒトhTie-2Fc(Reliatech)20 μlで、4 ℃で一晩、384ウェルプレートを直接的にコーティングした。洗浄後、PBS-T/BSA(0.1%Tween20を含むPBSに溶かした2%BSA)60 μlを用いて、室温で1時間、hTie-2Fcでコーティングしたウェルをブロックした。

【 0 1 9 0 】

PBS-T/BSA緩衝液中でピコモル範囲に薄まるまで1:3の比率で段階的に希釈した適切な開始濃度を用いて、様々な濃度のSEQ ID NO: 1~14と共に、または陰性対照としてのSEQ ID NO: 16と共に、かつ陽性対照としてのベンチマーク抗体1および2(それぞれ、SEQ ID NO: 17/18および19/20)と共に、一定濃度の0.5nMヒトAng-2を溶液中でインキュベートした。室温で1時間インキュベーションした後、hTie-2 Fcでコーティングしたプレートに反応混合物20 μlを移して、結合していない(遊離の)または非競合的に結合しているhAng-2を室温で20分間捕捉した。ELISAの読み取り結果を遊離Ang-2の絶対濃度に変換することを可能にするために(下記を参照されたい)、様々な濃度のhAng-2を含む検量線を、PBS-T/BSAにおいて作成し、同じプレート上で同様に20分間インキュベートした。

【 0 1 9 1 】

結合したhAng-2の検出および定量を可能にするために、残存している上清を廃棄し、抗HISタグHRP標識抗体20 μlをPBS-T/BSAに溶かし、ある濃度で添加し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、20 μlのクアンタブルー(quanta blue)を各ウェルに添加し、蛍光

10

20

30

40

50

マイクロプレートリーダー(TecanまたはMolecular Devices)を用いて、すべてのウェルの蛍光強度を読み取った。

【0192】

評価は次のようにして実施した:遊離hAng-2濃度 $c(\text{Ang-2})_{\text{free}}$ を、(並行して測定した検量線から)算出し、SEQ ID NO: 1~14、16、ならびにベンチマーク抗体1および2(それぞれ、SEQ ID NO: 17/18および19/20)の濃度、すなわち $c(\text{SEQ ID NO: 1~14, 16, 17/18, および19/20})$ に対してプロットした。hAng-2/hTie-2 Fc複合体の形成が50%妨害されるSEQ ID NO: 1~14、16、17/18、および19/20の濃度(IC50)を得るために、トレーサー合計濃度 $c(\text{Ang-2})_{\text{tot}}$ およびIC50値を自由パラメーターとして $c(\text{Ang-2})_{\text{free}}=c(\text{Ang-2})_{\text{tot}}/(1+c(\text{SEQ ID NO: 1~14, 16, 17/18, および19/20})/\text{IC50})$ に基づく単一部位結合モデルを、非線形回帰によって曲線に当てはめた(図1に示す)。曲線の当てはめは、GraphPad Prism 4ソフトウェアを用いて実施した。得られたIC 50値を下記の表2にまとめて示す。

【0193】

(表2)

ムテインSEQ ID	IC50 平均値 [nM]
SEQ ID NO: 1	0.5581
SEQ ID NO: 2	1.711
SEQ ID NO: 3	0.3194
SEQ ID NO: 4	0.4123
SEQ ID NO: 5	0.8613
SEQ ID NO: 6	0.06273
SEQ ID NO: 7	0.06193
SEQ ID NO: 8	0.07083
SEQ ID NO: 9	0.09287
SEQ ID NO: 10	0.07940
SEQ ID NO: 11	0.09877
SEQ ID NO: 12	0.1312
SEQ ID NO: 13	0.1842
SEQ ID NO: 14	0.1054
SEQ ID NO: 19/20	0.03067
SEQ ID NO: 17/18	0.01580

【0194】

実施例6:Biacoreで測定した、Ang-2に結合するムテインの親和性

表面プラズモン共鳴(SPR)に基づくアッセイ法において、Biacore T200装置(GE Healthcare)を用いて、hAng-2に対するムテインの結合親和性を測定した。適切な過剰のEZ-Link NHS-PEG4-ビオチン(Thermo)を添加して、Ang-2に対する結合に関して選択されたムテインおよび陰性対照(SEQ ID NO: 16)を室温で2時間ビオチン標識した。製品の取扱い説明書に従ってZebaスピン脱塩プレート(Thermo)を用いて、ビオチン標識試料を未反応のビオチン

10

20

30

40

50

から精製した。

【0195】

SPR親和性アッセイ法において、ビオチン標識ムテインおよび陰性対照は、ビオチンCAPtureキット(GE Healthcare)(センサーチップCAPがssDNAオリゴを用いて予め固定されている)を用いて、センサーチップCAP上に捕捉した。無希釈のビオチンCAPture試薬(相補的ss-DNAオリゴとコンジュゲートさせたストレプトアビシン)を流速2  $\mu$  L/分で300秒間、添加した。続いて、0.02  $\mu$  g/mLのビオチン標識ムテインまたは陰性対照を、流速5  $\mu$  L/分で300秒間、添加した。分析物Ang-2は多量体分子であるため、チップ表面での二価相互作用を最小限に減らすために、リガンド密度が最小限である表面を作り出すことを目指した。参考チャネルには、ビオチンCAPture試薬のみを添加した。

10

【0196】

結合親和性を測定するために、1~27nMの範囲の濃度の4つのヒトAng-2希釈物をHBS-EP+緩衝液(GE Healthcare)中で調製し、準備しておいたチップ表面に添加した。流速30  $\mu$  L/分を適用して、マルチサイクルカイネティクスアプローチを、180秒の試料接触時間および4600秒の解離時間と共に使用した。測定はいずれも25℃で実施した。0.25M NaOHを含む6M Gua-HClを注入し、続いて泳動用緩衝液または水で追加洗浄し、120秒の安定化期間を与えることによって、センサーチップCAP表面の再生を実現した。Biacore T200評価ソフトウェア(V1.0)を用いてデータを評価した。二重の参照(double referencing)を使用した。分析物は多量体であることが公知であったが、1:1結合モデルを用いて、生データを当てはめた。

20

【0197】

選定した(a selection of)リポカリンムテインについて得られた速度定数を以下の表3にまとめて示す。このような例示的リポカリンムテイン(SEQ ID NO: 7、8、9、および11)は、0.2~1.4nMの範囲の親和性でヒトAng-2に結合するが、陰性対照(SEQ ID NO: 16)の場合、結合は検出できない。当てはめられた値は、Rmax値が10未満である非常に低いリガンド密度を用いることにより、多価相互作用が無視できるレベルまで減るという仮定に基づいて導かれたことに留意しなければならない。

【0198】

(表3)

ムテイン SEQ ID	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [s <sup>-1</sup> ]	KD [nM]	Rmax [RU]
SEQ ID NO: 9	3.2E+05	9.4E-05	0.29	5.4
SEQ ID NO: 7	1.8E+05	2.6E-04	1.43	8.1
SEQ ID NO: 8	3.5E+05	1.3E-04	0.37	6.5
SEQ ID NO: 11	4.0E+06	8.7E-04	0.21	2.6

30

【0199】

実施例7: リポカリンムテインのAng-1およびAng-2に対する特異性および種交差反応性

40

リポカリンムテイン(SEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11)およびベンチマーク抗体(SEQ ID NO: 17/18)の特異性および種交差反応性を「溶液競合ELISA」アッセイ法によって試験した(例示的なリポカリンムテインについては図2を参照されたい)。このアッセイ法の原理は次のとおりであった:一定濃度のSEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11、およびベンチマーク抗体(SEQ ID NO: 17/18)を、様々な濃度のリガンド(ヒトAng-2、ヒトAng-1、ヒトAng-4、マウスAng2、およびマウスAng3、ならびに陰性対照としてのhVEGF-A(R&D system))と共に1時間インキュベートした。溶液中のこのプレインキュベーションの後、一定量のムテイン/リガンド混合物を、hAng-2が固定されたELISAプレートに移して、遊離リポカリンムテインSEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11、および遊離ベンチマーク抗体の残存濃度を測定した。遊離(未結合)SEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11、および遊離ベンチマーク抗体の濃度は

50

、定量的ELISA設定を用いて測定した。このアッセイ法は、すべてのリガンドがSEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11、および17/18上の同じ結合部位を標的としていること、すなわち、これらのリガンドが、互いに競合して、SEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11、および17/18に結合することに依拠したことに留意されたい。

#### 【0200】

以下の詳細な実験プロトコールにおいて、競合ELISAプロトコールにおいて前述したようにして、インキュベーション段階および洗浄段階を実施した(実施例5を参照されたい)。蛍光測定に適した384ウェルプレート(Greiner FLUOTRAC(商標)600、黒色平底、高結合能)を、4で一晩、PBS中5μg/mlの20μlのhアンギオポエチン2でコーティングした。洗浄後、Ang-2でコーティングしたウェルを、プロッキング緩衝液(PBS-T/BSA)100μlを用いて、室温で1時間ブロックした。 10

#### 【0201】

PBS-T/BSA中でピコモル範囲に薄まるまで1:3の比率で段階的に希釈した適切な開始濃度を用いて、様々な濃度のリガンド(hAng-2、mAng-2、hAn1、mAng-3、およびhAng-4、ならびにVEGF-A)と共に、一定濃度の0.1nMのSEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11、および17/18を溶液中でインキュベートした。室温で1時間インキュベーションした後、hAng-2を表面に固定した384ウェルプレートに反応混合物20μlを移して、結合していない(遊離の)SEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11、および17/18を室温で20分間捕捉した。ELISAの読み取り結果を遊離SEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11、および17/18の絶対濃度に変換することを可能にするために(下記を参照されたい)、様々な濃度のSEQ ID NO: 1、3、7、8、9、11、および17/18を含む検量線を、PBS-T/BSAにおいて作成し、同じELISAプレート上で同様に20分間インキュベートした。 20

#### 【0202】

残留している上清を廃棄し、PBS-T/BSAに溶かした所定の最適濃度のHRP標識抗リポカリソムテイン抗体20μlを添加し、室温で1時間インキュベートした。抗リポカリソムテイン抗体は、ウサギをリポカリソムテイン混合物で免疫化することによって得られたものであり、その後、製造業者の取扱い説明書に従ってキット(EZ-Link Plus活性化ペルオキシダーゼ、Thermo Scientific)を用いてHRPに結合させて、抗体-HRPコンジュゲートを得た。洗浄後、蛍光原性HRP基質(Quantablu, Pierce)20μlを各ウェルに添加し、60分間、反応を進行させた。プレートのすべてのウェルの蛍光強度を、Genios Plusマイクロプレートリーダー(Tecan)を用いて読み取った。このデータを評価するために、遊離ムテインの濃度 $c(\mu\text{Mtein})_{\text{free}}$ を、検量線の結果に基づいて算出し、リガンド濃度 $c(\text{リガンド})$ に対してプロットした。hAng-2/ムテイン複合体の形成が50%妨害されるリガンド濃度(IC50)を得るために、トレーサー合計濃度 $c(\mu\text{Mtein})_{\text{tot}}$ およびIC50値を自由パラメーターとして $c(\mu\text{Mtein})_{\text{free}}=c(\mu\text{Mtein})_{\text{tot}}/(1+c(\text{リガンド})/\text{IC50})$ に基づく単一部位結合モデルを、非線形回帰によって曲線に当てはめた。曲線の当てはめは、GraphPad Prism 4ソフトウェアを用いて実施した。この曲線当てはめにより、以下の表4にまとめて示す結果が得られた。 30

#### 【0203】

(表4)

40

	溶液結合ELISA					
	IC50 : nM					
	hAng-1	hAng-2	mAng-2	hAng-4	mAng-3	hVEGF-A
<b>SEQ ID NO: 17/18</b>	26	0.6	0.07	N/A	N/A	N/A
<b>SEQ ID NO: 3</b>	N/A	1.4	1.8	N/A	N/A	N/A
<b>SEQ ID NO: 1</b>	>100	2.5	0.65	N/A	N/A	N/A
<b>SEQ ID NO: 11</b>	0.89	0.49	0.05	N/A	N/A	N/A
<b>SEQ ID NO: 8</b>	9.3	0.5	0.08	N/A	N/A	N/A
<b>SEQ ID NO: 7</b>	0.47	0.41	0.05	N/A	N/A	N/A
<b>SEQ ID NO: 9</b>	1.9	0.76	0.11	N/A	N/A	N/A

## 【 0 2 0 4 】

図2に示すように、上記データは、SEQ ID NO: 8がヒトAng-2およびマウスAng-2に対して高い親和性を示し、SEQ ID NO: 7がヒトAng-2およびマウスAng-2だけでなくヒトAng-1に対しても高い親和性を示したことを実証している。

## 【 0 2 0 5 】

実施例8:hTie-2発現細胞へのヒトAng-2およびマウスAng-2の結合を妨害するリポカリンムテイン

リポカリンムテインがヒトAng-2およびマウスAng-2に競合的様式で結合するかどうかを、競合細胞電気化学発光(ECL)アッセイ法様式を用いて、hTie-2過剰発現HEK細胞において試験した(図3および4を参照されたい)。この実験において、一定の濃度のヒトAng-2およびマウスAng-2を、様々な濃度のリポカリンムテイン(SEQ ID NO: 1、3、6~14)およびベンチマーク抗体(SEQ ID NO: 19/20)と共に1時間インキュベートした。溶液中でのこのブレインキュベーションの後、一定量のリポカリンムテイン/Ang-2混合物を、hTie-2過剰発現HEK細胞でコーティングしたMSDプレートに移して、hTie-2に結合するのを妨害されなかつたhAng-2またはmAng-2の濃度をそれぞれ測定した。

## 【 0 2 0 6 】

インキュベーション段階はすべて、室温で実施し、各インキュベーション段階の後に、Bioteck EL405 select CW洗浄機(Bioteck)を用いてPBS緩衝液80 μlでプレートを2回洗浄した。第1段階において、384ウェルプレートをポリDリジンで5分間プレコートし、PBSで2回洗浄した。ウェル1つにつき10<sup>4</sup>個のHEK:hTie-2細胞を播種し、37 °Cで一晩、ウェルの表面に付着させた。洗浄後、60 μlのPBS/カゼイン(PBS中2%カゼイン)を用いて、室温で1時間、細胞でコーティングされたウェルをブロックした。

## 【 0 2 0 7 】

PBS/カゼイン緩衝液中でピコモル範囲に薄まるまで1:3の比率で段階的に希釈した、SEQ ID NO: 1、3、6~14およびベンチマーク抗体(SEQ ID NO: 19/20)の適切な開始濃度を用いて、様々な濃度のSEQ ID NO: 1、3、6~14およびベンチマーク抗体と共に、一定濃度のヒトAng-2またはマウスAng-2を溶液中でインキュベートした。室温で1時間インキュベーションした後、HEK:hTie2でコーティングしたプレートに反応混合物20 μlを移して、競合的に結合していないhAng-2を室温で1時間分(hour min)、捕捉した。様々な濃度のhAng-2またはマウスAng-2を含む検量線を、PBS/カゼインにおいて作成し、同じプレート上で同様に1時間インキュベートした。

10

20

30

40

50

## 【0208】

結合したhAng-2およびマウスAng-2の検出および定量を可能にするために、残存している上清を廃棄し、抗HISタグ抗体(Abcam)およびSulfoTagで標識した抗ヤギ抗体(Mesoscale Discovery)の混合物20  $\mu$ lをPBS/カゼインに溶かして濃度1  $\mu$ g/mlで添加し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、界面活性剤を含まない読み取り緩衝液35  $\mu$ lを各ウェルに添加し、Mesoscale Discoveryリーダーを用いて、すべてのウェルのECLシグナルを読み取った。

## 【0209】

評価および曲線当てはめは、GraphPad Prism 4ソフトウェアを用いて実施した。得られた結果を下記の表5にまとめて示す。

## 【0210】

(表5)

ムテイン SEQ ID	hAng2 IC50 [nM]	mAng-2 IC50 [nM]
SEQ ID NO: 3	10.73	23.17
SEQ ID NO: 1	18.91	3.982
SEQ ID NO: 6	3.464	1.206
SEQ ID NO: 7	3.596	1.228
SEQ ID NO: 8	3.746	1.245
SEQ ID NO: 9	3.817	1.39
SEQ ID NO: 10	4.626	1,046
SEQ ID NO: 11	4.793	1.448
SEQ ID NO: 12	5.287	3.118
SEQ ID NO: 13	5.431	7.343
SEQ ID NO: 14	6.41	2.32
SEQ ID NO: 19/20	1.999	0.8826

## 【0211】

実施例9:細胞に基づく増殖アッセイ法における、リポカリンムテインによるAng-2の妨害

SEQ ID NO: 1、3、7~9、および11のリポカリンムテインがhAng-2の生物活性を無効にする能力を、リンパ微小管内皮細胞(LEC)を使用する短期間の増殖バイオアッセイ法を適用することによって評価した。LEC増殖は、hAng-2の効力を消す効果を有する作用物質によって、阻害することができる。このアッセイ法において、SEQ ID NO: 1、3、7~9、および11を、血清飢餓状態にした培養状態のLEC細胞に添加した。3日間培養した後、生細胞の数を定量することによって、増殖の程度を評価した。CellTiter-Glo発光型細胞生死判別アッセイ法(Luminescent Cell Viability Assay)(Promega)を用いてこれを実施して、代謝的に活性な細胞の数と相関があるATPレベルを測定した。SEQ ID NO: 1、3、7~9、および11がhAng-2の効力を消す能力を、それらのIC50値、すなわち、hAng-2の媒介による増殖を最大値の半分に阻害する、リポカリンムテインの濃度に基づいて評価した。

## 【0212】

このアッセイ法を設定する詳細な手順を、本明細書において以下に説明する。LECは、E BM、5%ウシ胎児血清およびMV2補充キット中で維持した。アッセイ法は、白色の96ウェル透明平底プレート(Greiner)において、ウェル1つにつき25  $\mu$ Lで実施した。

## 【0213】

製造業者の取扱説明書(PAA Laboratories)に従った標準的条件(37 $^{\circ}$ 、5%CO<sub>2</sub>雰囲気)下の細胞培養フラスコ中で、LEC細胞を培養した。

## 【0214】

実験の1日目に、製造業者の取扱い説明書に従ってトリプシン/EDTAを用いて、培養基(substrate)から付着細胞を分離させた。続いて、1000rpmで5分間、細胞を遠心沈殿させ、E

10

20

30

40

50

BM中に再懸濁し、100  $\mu$ mのセルストレイナー(Falcon)に通してろ過して、細胞凝集体を取り除いた。次いで、最終体積100  $\mu$ lを用いて、ウェル1つにつき細胞3200個の密度で、96ウェルの平底組織培養プレート(Greiner)に細胞を播種した。これらを標準的条件下で1時間インキュベートした。

【0215】

1時間後、SEQ ID NO: 1、3、7~9、11、陰性対照(SEQ ID NO: 16およびヒトIgGアイソタイプ抗体(Dianova))、ならびにベンチマーク抗体1および2(それぞれSEQ ID NO: 17/18および19/20)の希釈系列を、これらのウェルに添加した。濃度変化(titration)系列はすべて、アッセイ用培地中での連続的な1:3希釈および適切な開始濃度を用いて実施した。続いて、細胞を37 °Cで72時間、増殖させた。72時間後の細胞増殖を定量するために、Cell Titer-Glo試薬25  $\mu$ Lを各ウェル中の細胞に添加し、オービタルシェーカー上で2分間インキュベートして細胞溶解を誘導し、PheraStar FSリーダーを用いて発光を測定した。

【0216】

IC50値は、GraphPad Prismソフトウェア(GraphPad Software Inc.)を用いて、標準化したシグナルを試料濃度に対してプロットすること、およびS字形用量反応モデルを用いてデータを非線形回帰することによって、決定した。

【0217】

この実験の結果を図5に示す。上記に開示した増殖アッセイ法は、3回の独立した実験を代表している。これらの結果を下記の表6にまとめて示す。

【0218】

(表6)

ムテイン SEQ ID	IC50 平均値 [nM]
SEQ ID NO: 1	2.252
SEQ ID NO: 3	2.806
SEQ ID NO: 7	0.1992
SEQ ID NO: 8	0.0780
SEQ ID NO: 9	0.1423
SEQ ID NO: 11	0.1692
SEQ ID NO: 17/18	0.0668
SEQ ID NO: 19/20	0.0435

【0219】

SEQ ID NO: 8は、0.07nMの平均EC50を示し、ベンチマーク抗体1(SEQ ID NO: 17/18)は、0.06nMのEC50を示し、ベンチマーク抗体2(SEQ ID NO: 19/20)は、0.04nMのEC50を示した。陰性対照は、増殖に対する効果をまったく示さなかった。したがって、このデータから、SEQ ID NO: 8およびベンチマーク抗体がこの機能アッセイ法において同程度の効力を示すことが実証される。

【0220】

実施例10:ムテインの安定性の評価

得られた融解温度( $T_m$ )ならびにリポカリンムテイン(SEQ ID NO:1、3、7~9、11)の融解開始を、ベンチマーク抗体(SEQ ID NO: 17/18)と比較して下記の表7に記載している。選択されたリポカリンムテインが65~77 °Cの範囲の $T_m$ を有していることから、これらの分子の良好な安定性が示唆される。

【0221】

(表7) nanoDSCによって測定した、Ang-2特異的リポカリンムテインおよびベンチマーク抗体の $T_m$ および融解開始

ムテイン SEQ ID	Tm [°C]	融解開始 [°C]
<b>SEQ ID NO: 1</b>	64	59
<b>SEQ ID NO: 3</b>	66	59
<b>SEQ ID NO: 7</b>	76	68
<b>SEQ ID NO: 8</b>	73	63
<b>SEQ ID NO: 9</b>	77	70
<b>SEQ ID NO: 11</b>	75	65
<b>SEQ ID NO:17/18</b>	69.5 / 76.1 / 83.4	64

10

## 【 0 2 2 2 】

保存安定性を評価するために、PBSに溶かした濃度1mg/mlの例示的ムテインを37℃で1週間インキュベートした。定量的ELISA設定で、活性なムテインを測定した。分析的サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、単量体タンパク質を測定した。SEQ ID NO: 1、3、7~9、および11についての結果のデータを下記の表8に示す。

## 【 0 2 2 3 】

タンパク質活性を試験するために、以下のELISAを使用した：蛍光測定に適した384ウェルプレート(Greiner FLUOTRAC(商標)600、黒色平底、高結合能)を、4℃で一晩、PBS中濃度5μg/mlの20μlのAng-2(Thermo Scientific)でコーティングした。洗浄後、Ang-2でコーティングしたウェルを、ブロッキング緩衝液100μl(0.1%v/v Tween20を含むPBSに溶かした2w/v%BSA)を用いて、1時間ブロックした。プレートを洗浄し、20μlの適切に希釈したタンパク質標準物質、ストレス無負荷の参照試料、またはストレス負荷試料をELISAプレートに移し、インキュベートした。プレートに結合したタンパク質を定量するために、ELISAプレートを洗浄し、残留している上清を廃棄し、ブロッキング緩衝液に溶かした所定の最適濃度のHRP標識抗hNGAL抗体20μlを添加し、インキュベートした。洗浄後、蛍光原性HRP基質(QuantaBlu, Pierce) 20μlを各ウェルに添加し、20~30分間、反応を進行させた。プレートのすべてのウェルの蛍光強度を、蛍光マイクロプレートリーダー(Tecan)を用いて読み取った。

20

## 【 0 2 2 4 】

30

別段の定めが無い限り、インキュベーション段階はすべて、室温で1時間実施し、各インキュベーション段階の後に、Bioteck ELx405 select CW洗浄機を用いてPBS-T緩衝液(PBS、0.05%Tween20)100μlでプレートを5回洗浄した。

## 【 0 2 2 5 】

前述のELISAのために、典型的には0.008~500ng/mLの範囲の11種の希釈物を含む検量線を作成し、この検量線の直線範囲内にある3種の異なる独立した希釈物を各試料について調製した。任意で1%のヒト血漿またはマウス血漿を添加したブロッキング緩衝液を、これらの希釈物のために使用した。

## 【 0 2 2 6 】

40

検量線は、4パラメーターのロジスティック(4PL)非線形回帰モデルを用いて当てはめ、これを用いて、試験した各試料の活性タンパク質濃度を算出した。決定された活性タンパク質濃度を、同じ濃度および同じマトリックス中で保存されたストレス無負荷の試料に対して関連付けた(referenced against)。

## 【 0 2 2 7 】

分析的サイズ排除クロマトグラフィーは、1列に並んだ2本のSuperdex 75 5/150GLカラム(GE Healthcare)を備えたAgilent HPLCシステムにおいて、PBS(Gibco)を溶出剤として用い、流速0.3mL/分で実施した。

## 【 0 2 2 8 】

血漿中の保存安定性を評価するために、濃度0.5mg/mlの例示的ムテインを、ヒト血漿およびマウス血漿中で、37℃で1週間、インキュベートした。前述の定量的ELISA設定で、

50

活性なムテインを測定した。

【0229】

試験されたリポカリンムテインはすべて、試験したすべての条件下で安定であることが判明した。この試験結果を以下の表8にまとめて示す。

【0230】

(表8)3回の凍結/解凍サイクル(F/T)後の安定性;37、PBS中で1週間の保存およびヒト(hu)血漿またはマウス(mu)血漿中で1週間の保存を、qELISAにおける活性の回復および分析的SECにおける単量体含有量に基づいて次のように評価した:qELISAにおいて安定=100+/-15%;aSECにおいて安定=100+/-5%(ストレスを負荷されていない参照試料と比べた、単量体ピーク面積の回復);参照を含む全試料について、100面積パーセントの単量体含有量が検出されていた。

ムテイン SEQ ID	凍結/解凍		1週間 PBS37°C		1週間 ヒト血漿	1週間 マウス血漿
	Q ELISA	HPLC	Q ELISA	HPLC		
SEQ ID NO: 2	104	100	94	97	-	-
SEQ ID NO: 3	95	98	100	96	-	-
SEQ ID NO: 1	102	103	99	105	-	-
SEQ ID NO: 7	-	-	-	-	99	85
SEQ ID NO: 8	-	-	-	-	89	93
SEQ ID NO: 9	-	-	-	-	99	100
SEQ ID NO: 11	-	-	-	-	100	89
SEQ ID NO: 17/18	108	109	87	103	-	-

【0231】

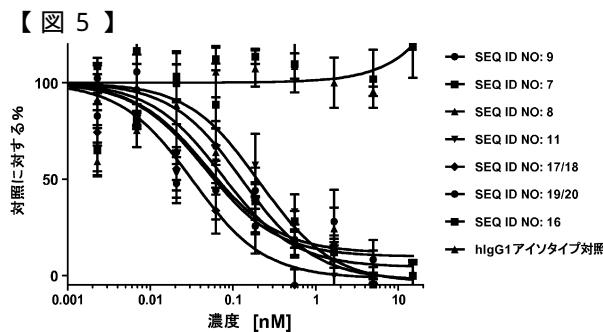
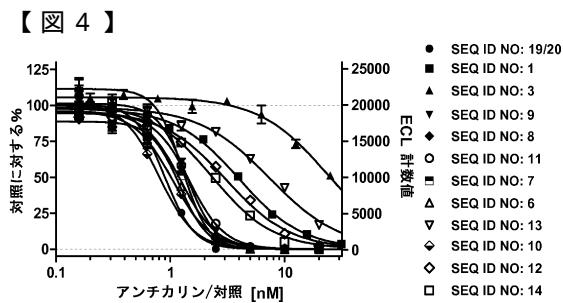
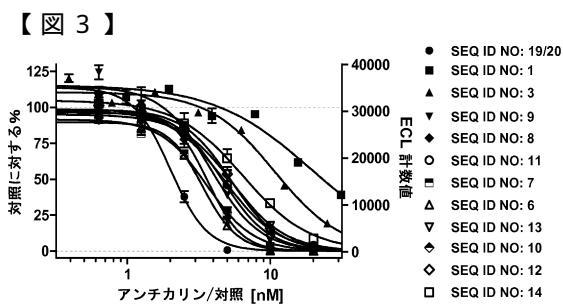
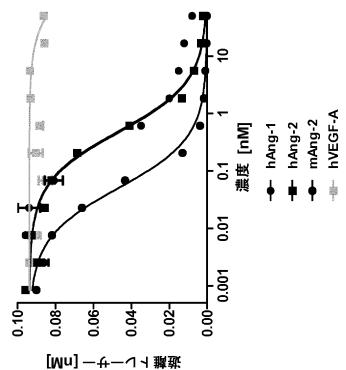
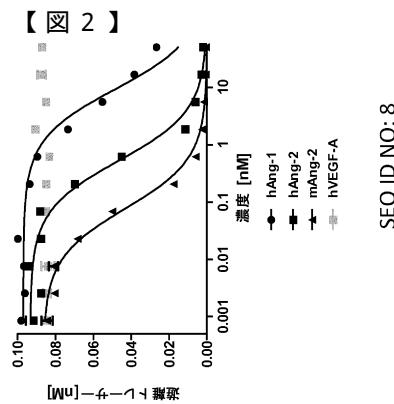
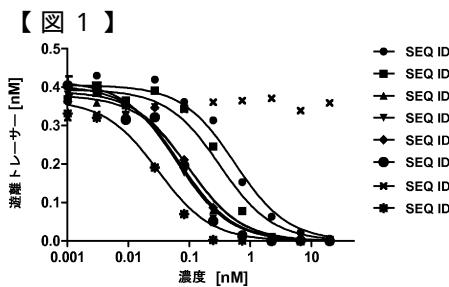
本明細書において例示的に説明する態様は、本明細書において具体的に開示しない任意の1つまたは複数の要素、1つまたは複数の制限の非存在下で、適切に実施することができる。したがって、例えば、「含む(comprising)」、「含む(including)」、「含む(containing)」などの用語は、包括的に、かつ非限定的に読み取られるものとする。さらに、本明細書において使用される用語および表現は、限定するのではなく説明する用語として使用されており、そのような用語および表現を使用する際、示し説明する特徴またはその一部分の任意の等価物を除外する意図はないが、請求される本発明の範囲内で様々な修正が可能であることが認識される。したがって、本発明の態様は好ましい態様および任意の特徴によって具体的に開示されるが、その修正および変更を当業者は行ってもよいこと、ならびにそのような修正および変更が本発明の範囲内であるとみなされることを理解すべきである。本明細書において説明したすべての特許、特許出願、教科書、および同領域の専門家によって審査された刊行物は、全体が参照により本明細書に組み入れられる。さらに、参照により本明細書に組み入れられる参考文献におけるある用語の定義または使用が、本明細書において提供されるその用語の定義と一致しないか、または相いれない場合、本明細書において提供されるその用語の定義が適用され、その参考文献におけるその用語の定義は適用されない。また、包括的開示(generic disclosure)の範囲に入るより狭義の種および下位概念のグループのそれぞれも、本発明の一部分をなす。これには、削除される題材(material)が本明細書において具体的に挙げられるかどうかに関わらず、上位概念から任意の主題を除く条件または否定的限定を伴う、本発明の包括的説明が含まれる。さらに、特徴がマーカッシュ群によって説明される場合、マーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーの下位集団の観点から、開示内容がそれによっても説明されることを、当業者は認識すると考えられる。さらなる態様は、添付の特許請求の範囲から明らかになる。

10

20

30

40



【配列表】

0006839087000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一  
(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦  
(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀  
(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人  
(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥  
(72)発明者 ベル アイバ ラシダ シハム  
ドイツ連邦共和国 8 0 4 6 9 ミュンヘン エアハルトシュトラーセ 15  
(72)発明者 アレアシュドルファー アンドレア  
ドイツ連邦共和国 8 5 2 8 3 ヴォルンツァッハ モザルトシュトラーセ 20 エー  
(72)発明者 ヴィーデンマン アレクサンダー  
ドイツ連邦共和国 8 9 0 7 7 ウルム フュルステネッカーシュトラーセ 5  
(72)発明者 ローテ クリストイース  
ドイツ連邦共和国 8 5 2 2 1 ダッハウ ハインリッヒ - ニコラウス - シュトラーセ 26  
(72)発明者 オルヴィル シーン  
ドイツ連邦共和国 8 4 3 5 4 フライジンク アム ヴァルトラント 23 エー  
(72)発明者 ジル ヘンドリック  
ドイツ連邦共和国 1 4 0 5 7 ベルリン レオナルトシュトラーセ 7  
(72)発明者 オードリー ローラン  
フランス共和国 3 1 5 6 2 トゥールーズ アヴニュー ユベール キュリアン 3 ピエール  
ファーブル リサーチ アンド ディベロップメント センター

審査官 西垣 歩美

(56)参考文献 特表2 0 1 2 - 5 1 1 8 9 7 (JP, A)  
特表2 0 1 1 - 5 2 5 3 5 4 (JP, A)  
国際公開第2 0 1 4 / 0 7 6 3 2 1 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
U n i P r o t / G e n e S e q