

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成31年3月7日(2019.3.7)

【公表番号】特表2018-509887(P2018-509887A)

【公表日】平成30年4月12日(2018.4.12)

【年通号数】公開・登録公報2018-014

【出願番号】特願2017-539548(P2017-539548)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	14/435	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
G 0 1 N	33/566	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	33/543	(2006.01)
A 6 1 K	38/16	(2006.01)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	27/02	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/00	(2006.01)
A 6 1 P	19/02	(2006.01)
A 6 1 P	17/06	(2006.01)
A 6 1 K	47/60	(2017.01)
A 6 1 K	47/61	(2017.01)
A 6 1 K	47/68	(2017.01)
A 6 1 K	47/66	(2017.01)
C 4 0 B	40/08	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	14/435	
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02	C
G 0 1 N	33/566	
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/543	5 4 5 A
G 0 1 N	33/543	5 0 1 A
A 6 1 K	38/16	

A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	39/395	M
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/06	
A 6 1 K	47/60	
A 6 1 K	47/61	
A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	47/66	
C 4 0 B	40/08	

【手続補正書】

【提出日】平成31年1月25日(2019.1.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

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)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つの変異アミノ酸残基を含む、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(hNGAL)ムテイン。

【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。

【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】

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(SEQ ID NO: 16)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、請求項1～3のいずれか一項記載のhNGALムテイン：

Gln 28 His; 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; Asn 65 Asp; 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; Lys 74 Glu; 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; Cys 87 Ser; 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; Asn 116 Asp; Lys 125 His, ThrまたはGly; Val 126

Met; Ser 127 LeuまたはMet; Asn 129 Asp; Tyr 132 Phe, TrpまたはVal; およびLys 134 Ala, GluまたはTrp。

【請求項 5】

成熟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つを含む、請求項1~4のいずれか一項記載の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; 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;
- (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 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

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

(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 6】

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1～5のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

【請求項 7】

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1～6のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

【請求項 8】

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1～7のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

【請求項 9】

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1～8のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

【請求項 10】

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、請求項1～9のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

【請求項 11】

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80%の配列同一性を有する、請求項1～10のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

【請求項 12】

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1～11のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

【請求項 13】

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1～12のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

【請求項 14】

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1～13のいずれか一項記載のhNGALムテイン。

【請求項 15】

請求項1～14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 16】

請求項15記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 17】

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、遺伝子操作方法により産生される、請求項1～14のいずれか一項記載のhNGALムテインを産生する方法。

【請求項 18】

請求項1～14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 19】

少なくとも(a)請求項1～14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 20】

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19記載の組成物。

【請求項 21】

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1～14のいずれか一項記載のhNGALムテインまたは請求項19もしくは20記載の組成物の使用。

【請求項 22】

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1～14のいずれか一項記載のhNGALムテインまたは請求項19もしくは20記載の組成物の使用。

【請求項 23】

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1～14のいずれか一項記載のhNGALムテインまたは請求項19もしくは20記載の組成物の使用。

【請求項 24】

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21記載の使用。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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/または例えば商業的供給源であるDNAライブラリー(例え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')₂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、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に対して位置してよい。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ポカリン(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、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

[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。

[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;
- (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;
- (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;

(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

(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。

[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。

[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。

[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。

[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]

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、ヒドロエチルデンプン、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。

[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ヌ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。

[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产生される、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產生され、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。

[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。

[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。

[本発明1041]

单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。

[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。

[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。

[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。

[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

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。

[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。