

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-503704
(P2025-503704A)

(43)公表日 令和7年2月4日(2025.2.4)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/71 (2006.01)	C 0 7 K	14/71		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全63頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-542028(P2024-542028)				(71)出願人 524263743
(86)(22)出願日	令和5年1月12日(2023.1.12)				インゲニア・セラピューティクス・イン
(85)翻訳文提出日	令和6年9月6日(2024.9.6)				コーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2023/060582				アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0
(87)国際公開番号	WO2023/137395				2 1 4 2, ケンブリッジ、イースト・ケ
(87)国際公開日	令和5年7月20日(2023.7.20)				ンドール・ストリート・6 5 0、イノベ
(31)優先権主張番号	63/299,177				ーション・センター・バイオラプス、セ
(32)優先日	令和4年1月13日(2022.1.13)				カンド・フロア
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				(74)代理人 100114188
(31)優先権主張番号	63/310,359				弁理士 小野 誠
(32)優先日	令和4年2月15日(2022.2.15)				(74)代理人 100119253
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 金山 賢教
(31)優先権主張番号	63/335,805				(74)代理人 100124855
最終頁に続く				(74)代理人 100129713	弁理士 坪倉 道明
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 V E G F 及び T I E 2 を結合する融合タンパク質並びにその使用

(57)【要約】

本開示は、T i e - 2 に対する抗体又はその抗原結合断片と血管内皮増殖因子 (V E G F) 結合ドメインとを有する融合タンパク質、該融合タンパク質を作製するための方法、並びに該融合タンパク質を含む、血管新生疾患を予防若しくは処置するための、又は血管新生、内皮シグナル伝達、炎症及び／若しくは血管漏出を調節するための薬学的組成物及び方法に言及する。

【選択図】 図 1 3

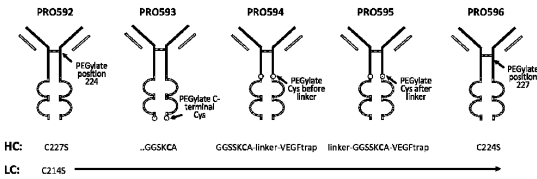


Fig. 13

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗 T i e 2 抗体又はその抗原結合断片と血管内皮増殖因子 (V E G F) 結合ドメインとを含む融合タンパク質であって、ここで、前記融合タンパク質は、配列番号 2、3 又は 4 を含む T i e 2 I g 3 - F N I I I (1 - 3) ドメイン及び V E G F に結合する、融合タンパク質。

【請求項 2】

前記 V E G F 結合ドメインが V E G F 受容体細胞外ドメインを含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

血管内皮増殖因子 (V E G F) 結合ドメインであって、配列番号 13 の V E G F 受容体 1 (V E G F R 1) の血管内皮増殖因子 (V E G F) - A 結合領域及び配列番号 14 の V E G F 受容体 2 (V E G F R 2) の血管内皮増殖因子 (V E G F) - A 結合領域を含む、血管内皮増殖因子 (V E G F) 結合ドメインと、
抗 T i e 2 抗体又はその抗体結合断片と、
を含む融合タンパク質であって、
ここで、前記融合タンパク質は、配列番号 2、3 又は 4 を含む T i e 2 I g 3 - F N I I I (1 - 3) ドメイン及び V E G F に結合する、
融合タンパク質。

【請求項 4】

前記 V E G F 結合ドメインが、前記抗 T i e 2 抗体又はその抗原結合断片の重鎖 (H C) の C 末端に連結されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記融合タンパク質が、T i e 2 の配列番号 20 のアミノ酸配列及び／又は T i e 2 の配列番号 21 のアミノ酸配列を結合する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記抗 T i e 2 抗体が I g G 1 アイソタイプを有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

前記抗 T i e 2 抗体又はその抗原結合断片が、配列番号 5 ~ 7 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R を含む重鎖可変領域と、配列番号 8 ~ 10 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R を含む軽鎖可変領域とを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

前記 V E G F 結合ドメインが、配列番号 15 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

前記 V E G F 結合ドメインが配列番号 15 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

前記融合タンパク質が、前記 V E G F 結合ドメインと前記抗 T i e 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、ここで、前記リンカーは、5 ~ 50 個のアミノ酸残基、10 ~ 40 個の残基、15 ~ 30 個の残基又は 20 個の残基を有する配列を含んでもよい、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

前記融合タンパク質が、前記 V E G F 結合ドメインと前記抗 T i e 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、そしてここで、前記リンカーは、配列番号 16 の前記アミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質。

【請求項 12】

前記融合タンパク質が、前記 VEGF 結合ドメインと前記抗 Tie 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、そしてここで、前記リンカーは、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

前記融合タンパク質が、前記 VEGF 結合ドメインと前記抗 Tie 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、そしてここで、前記リンカーは、配列番号 25 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % の同一性を有する配列を含み、ここで、前記 VEGF 結合ドメインは VEGF 受容体であってもよい、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 14】

前記融合タンパク質が、前記 VEGF 結合ドメインと前記抗 Tie 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、そしてここで、前記リンカーは、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

前記融合タンパク質が、配列番号 17 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % の同一性を有する配列を含む CHドメインを含む、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

前記融合タンパク質が、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む CHドメインを含む、請求項 15 に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 17】

前記融合タンパク質が、Fc 受容体との相互作用を低下させるか又は排除する 1 以上の変異を重鎖定常領域中に含む、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

前記 1 以上の変異が、L234、L235、G236 及び G237 (EU ナンバリング) を、LAGA 変異、FEGG 変異、AAGG 変異、AAGA 変異、LALA 変異又はそれらの組み合わせに変化させることを含む、請求項 17 に記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

前記 1 以上の変異が、LALA 変異、並びに、K322A 及び P331S (EU ナンバリング) であってもよい K322 及び P331 (EU ナンバリング) における変異を含む、請求項 18 に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 20】

前記融合タンパク質が、L234、L235、H310、M252、I253、S254、T256、H433、N434 及び／又は H435 (EU ナンバリング) に 1 以上の変異を含み、ここで、前記変異は、a) L234A、L235A 及び H310A；又は b) M252Y；I253A、I253M 若しくは I253V；S254T；T256D；H433K；N434F；及び／若しくは H435A、H435Q 若しくは H435R であってもよい M252、I253、S254、T256、H433、N434 及び／若しくは H435 であってもよい、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 21】

前記融合タンパク質が、前記抗 Tie 2 抗体又はその抗原結合断片の 1 以上の重鎖定常ドメインの C 末端側に及び N 末端から C 末端への順序で、前記 VEGF 結合ドメインと前記抗 Tie 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含む、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 22】

前記リンカーが、配列番号 16 又は 25 のアミノ酸配列を含み、そして、前記 VEGF 結合ドメインが、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～21 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

50

【請求項 23】

前記融合タンパク質が、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む C H ドメインと、前記 V E G F 結合ドメインと前記抗 T i e 2 抗体又はその抗体断片との間に配列番号 16 又は 25 のアミノ酸配列を含むリンカーと、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V E G F 結合ドメインとを含む、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 24】

前記融合タンパク質が、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 25】

前記融合タンパク質が、配列番号 11 又は 26 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % の同一性を含む重鎖を含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 26】

前記融合タンパク質が、配列番号 11 又は 26 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項 25 に記載の融合タンパク質。

【請求項 27】

前記融合タンパク質が、配列番号 12 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % の同一性を含む軽鎖を含む、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 28】

前記融合タンパク質が、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 27 に記載の融合タンパク質。

【請求項 29】

前記融合タンパク質が、配列番号 11 又は 26 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 30】

前記融合タンパク質が、 3×10^{-9} M 未満の親和性 K_D (M) で、配列番号 2、3 又は 4 を含む T i e 2 I g 3 - F N I I I (1-3) ドメインに結合する、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 31】

前記融合タンパク質がペグ化されている、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 32】

前記融合タンパク質が、部位特異的にペグ化されている、請求項 31 に記載の融合タンパク質。

【請求項 33】

前記融合タンパク質が、システイン残基上で部位特異的にペグ化されている、請求項 32 に記載の融合タンパク質。

【請求項 34】

前記融合タンパク質が、配列番号 22 の配列をさらに含み、そして、配列番号 22 の配列のシステイン残基上で部位特異的にペグ化されている、請求項 31 に記載の融合タンパク質。

【請求項 35】

配列番号 22 の配列が重鎖の C 末端に存在する、請求項 34 に記載の融合タンパク質。

【請求項 36】

前記重鎖が配列番号 23 の配列を含む、請求項 34 に記載の融合タンパク質。

【請求項 37】

前記重鎖が配列番号 24 の配列を含む、請求項 34 に記載の融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 38】

前記 PEG が約 40 kDa の分子量を有する、請求項 31～37 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 39】

前記融合タンパク質が、1 以上の半減期延長モジュレータをさらに含む、請求項 1～38 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 40】

前記 1 以上の半減期延長モジュレータが、前記融合タンパク質の半減期を増加させる化学物質、バイオポリマー又はペプチドを含む、請求項 39 に記載の融合タンパク質。

【請求項 41】

前記 1 以上の半減期延長モジュレータが、PEG（ポリエチレングリコール）、ヒアルロン酸（HA）又はホスホリルコリンを含有するバイオポリマー；アルブミン；アルブミン結合ペプチド及び／又は HA 結合タンパク質断片を含む、請求項 39 又は請求項 40 に記載の融合タンパク質。

【請求項 42】

請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項 43】

請求項 42 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 44】

ヒトサイトメガロウイルス IE1（CMV-IE1）プロモーター／エンハンサーをさらに含む、請求項 43 に記載の発現ベクター。

【請求項 45】

請求項 43 又は請求項 44 に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

【請求項 46】

Tie2 及び VEGF を結合する融合タンパク質を製造する方法であって、請求項 45 に記載の細胞を培養する工程と、培養された細胞から融合タンパク質を回収する工程とを含む、方法。

【請求項 47】

血管新生疾患又は血管疾患を予防又は処置するための方法であって、血管新生疾患又は血管疾患を予防又は処置することを必要とする対象に有効量の請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を投与することを含む、方法。

【請求項 48】

血管新生疾患又は血管疾患を処置することを必要とする対象における血管新生疾患又は血管疾患を処置するための医薬の製造のための、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質の使用。

【請求項 49】

血管新生疾患又は血管疾患を処置することを必要とする対象における血管新生疾患又は血管疾患の処置において使用するための、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 50】

前記血管新生疾患又は血管疾患が、癌、転移、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、角膜移植片拒絶反応、黄斑変性、血管新生緑内障であってもよい緑内障、全身性紅皮症、増殖性網膜症、乾癬、血友病性関節症、類縁硬化症、アテローム性プラークの毛細血管形成、ケロイド、創傷肉芽形成、血管接着、関節リウマチ、骨関節炎、自己免疫疾患、クローン病、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、腸管癒着、ネコ引っ掻き病、潰瘍、肝硬変、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病、炎症性疾患又は神経変性疾患である、請求項 47～49 のいずれか一項に記載の使用のための方法、使用又は融合タンパク質。

【請求項 51】

前記癌が、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、肺癌、結腸癌、

10

20

30

40

50

乳癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、膵臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳癌、甲状腺癌、白血病、ホジキンリンパ腫、リンパ腫又は多発性骨髄性血液癌である、請求項 50 に記載の使用のための方法、使用又は融合タンパク質。

【請求項 52】

血管新生、内皮シグナル伝達、炎症、無酸素症及び／又は血管漏出を調節するための方法であって、血管新生、内皮シグナル伝達、炎症、無酸素症及び／又は血管漏出を調節することを必要とする対象に有効量の請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を投与することを含む、方法。

【請求項 53】

前記炎症が敗血症、急性呼吸促迫症候群及び／又はウイルス感染性疾患に由来する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記対象がヒトである、請求項 47～53 のいずれか一項に記載の使用のための方法、使用又は融合タンパク質。

【請求項 55】

前記対象が愛玩動物であり、哺乳動物の愛玩動物であってもよい、請求項 47～53 のいずれか一項に記載の使用のための方法、使用又は融合タンパク質。

【請求項 56】

前記愛玩動物が、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレット、ウマ、ラバ、ロバ又はハムスターである、請求項 55 に記載の使用のための方法、使用又は融合タンパク質。

【請求項 57】

請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を含む薬学的組成物。

【請求項 58】

請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質の鎖状単量体を含むポリペプチド。

【請求項 59】

前記ポリペプチドが、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質の重鎖単量体を含む、請求項 58 に記載のポリペプチド。

【請求項 60】

前記ポリペプチドが、配列番号 11 又は 26 の配列に対して少なくとも 70 % の同一性、少なくとも 75 % の同一性、少なくとも 80 % の同一性、少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 91 % の同一性、少なくとも 92 % の同一性、少なくとも 93 % の同一性、少なくとも 94 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の同一性、少なくとも 97 % の同一性、少なくとも 98 % の同一性、少なくとも 99 % の同一性又は 100 % の同一性を有する配列を含む、請求項 59 に記載のポリペプチド。

【請求項 61】

前記ポリペプチドが配列番号 11 又は 26 を含む、請求項 60 に記載のポリペプチド。

【請求項 62】

前記ポリペプチドが配列番号 11 又は 26 からなる、請求項 61 に記載のポリペプチド。

【請求項 63】

前記ポリペプチドが、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質の軽鎖単量体を含む、請求項 58 に記載のポリペプチド。

【請求項 64】

前記ポリペプチドが、配列番号 12 に対して少なくとも 70 % の同一性、少なくとも 75 % の同一性、少なくとも 80 % の同一性、少なくとも 85 % の同一性、少なくとも 90 % の同一性、少なくとも 91 % の同一性、少なくとも 92 % の同一性、少なくとも 93 % の同一性、少なくとも 94 % の同一性、少なくとも 95 % の同一性、少なくとも 96 % の

10

20

30

40

50

同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、少なくとも 99% の同一性又は 100% の同一性を有する配列を含む、請求項 63 に記載のポリペプチド。

【請求項 65】

前記ポリペプチドが配列番号 12 を含む、請求項 64 に記載のポリペプチド。

【請求項 66】

前記ポリペプチドが配列番号 12 からなる、請求項 65 に記載のポリペプチド。

【請求項 67】

請求項 58 ～ 66 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 68】

前記核酸分子が、請求項 59 ～ 62 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、請求項 67 に記載の核酸分子。 10

【請求項 69】

前記核酸分子が、配列番号 27 又は 29 に対して少なくとも 70% の同一性、少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性又は少なくとも 99% の同一性を有する配列を含む、請求項 68 に記載の核酸分子。

【請求項 70】

前記核酸分子が配列番号 27 又は 29 を含む、請求項 69 に記載の核酸分子。 20

【請求項 71】

前記核酸分子が配列番号 27 又は 29 からなる、請求項 70 に記載の核酸分子。

【請求項 72】

前記核酸分子が、請求項 63 ～ 66 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする、請求項 67 に記載の核酸分子。

【請求項 73】

前記核酸分子が、配列番号 28 に対して少なくとも 70% の同一性、少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性又は少なくとも 99% の同一性を有する配列を含む、請求項 72 に記載の核酸分子。 30

【請求項 74】

前記核酸分子が配列番号 28 を含む、請求項 73 に記載の核酸分子。

【請求項 75】

前記核酸分子が配列番号 28 からなる、請求項 74 に記載の核酸分子。

【請求項 76】

請求項 1 ～ 41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質の両方の鎖（すなわち、軽鎖及び重鎖）がコードされるように、各ポリヌクレオチドが前記融合タンパク質の単量体鎖の少なくとも 1 つをコードする、1 以上のポリヌクレオチドのセット。 40

【請求項 77】

請求項 67 ～ 75 のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 78】

前記ベクターが、前記融合タンパク質の 1 つの重鎖配列及び 1 つの軽鎖配列をコードする核酸を含む、請求項 77 に記載のベクター。

【請求項 79】

前記融合タンパク質の両方の鎖（すなわち、軽鎖及び重鎖）がベクターの前記セットにおいてコードされるように、請求項 76 に記載の 1 以上のポリヌクレオチドのセットを集団的に含む 1 以上のベクターのセット。

【請求項 80】

前記ベクターが、動物ウイルス、例えば逆転写酵素ウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、水痘ウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、アネロウイルス及びパポバウイルスから選択されるウイルスである、請求項 77～79 のいずれか一項に記載のベクター又はベクターのセット。

【請求項 81】

請求項 77～80 のいずれか一項に記載のベクターを発現する宿主細胞。

【請求項 82】

請求項 67～75 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 76 に記載の 1 以上のポリヌクレオチドのセット、又は請求項 77～79 のいずれか一項に記載のベクター若しくはベクターのセットと、薬学的に許容され得る担体、希釈剤又は賦形剤とを含む薬学的組成物。

10

【請求項 83】

ベクター又はベクターのセットからの発現による、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の融合タンパク質の生産のための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 1 月 13 日に提出された米国仮特許出願第 63/299,177 号、2022 年 2 月 15 日に提出された米国仮特許出願第 63/310,359 号及び 2022 年 4 月 28 日に提出された米国仮特許出願第 63/335,805 号の米国特許法第 119 条(e)に基づく利益を主張する。これらの先の出願の全開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

配列表

本出願は、XML 形式で電子的に提出された配列表を含む。2023 年 1 月 11 日に作成された前記 XML コピーは、「2023-01-12_01262-0004-00PCT-ST26.xml」という名前であり、48,489 バイトのサイズである。配列表の電子形式中の情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

30

分野

本開示は、抗 Tie-2 抗体又はその抗原結合断片と血管内皮増殖因子 (VEGF) 結合ドメインとを含む融合タンパク質であって、Tie2 及び VEGF に同時に結合する融合タンパク質、該融合タンパク質をコードする核酸、該核酸を含有するベクター、該ベクターで形質転換された細胞、前記融合タンパク質を調製するための方法、血管新生、炎症及び血管漏出を調節する方法及び組成物に関する。いくつかの実施形態では、本開示は、血管新生疾患及び血管疾患を予防又は処置するための方法及び薬学的組成物に関する。

【背景技術】

【0004】

序論及び概要

血管新生は、生物の発生、成長、維持及び恒常性の間に様々な調節因子によって動的に起こる。この過程において新たに形成された血管は、周囲の細胞中の栄養素、酸素及びホルモンなどの様々な生体材料のための輸送チャネルとして機能する。機能的及び構造的に異常な血管は、様々な疾患の開始及び進行の直接的又は間接的な原因である。腫瘍血管は、それらの機能及び構造の欠陥の故に低酸素を悪化させ、腫瘍の進行及び他の組織への転移をもたらす。腫瘍塊の中心部への抗癌剤の送達を不良にする。欠陥を有する血管は、癌の他、他の様々な疾患及び症状においても見られる。その例には、様々な眼疾患（例えば、糖尿病性黄斑浮腫、滲出型加齢黄斑変性、糖尿病性網膜症）、ウイルス感染症及び敗血症などの急性炎症反応などが含まれる。したがって、病的な血管を正常化することができる治療薬が利用可能であれば、血管異常を有する様々な患者／患者の処置に適用すること

40

50

ができる。

【0005】

アンジオポエチンファミリーは、血管の形成及び維持において重要な役割を果たしており、4つのアンジオポエチン（Ang 1、Ang 2、Ang 3、Ang 4）から構成される。アンジオポエチン-1（Ang 1）は、血管内皮細胞の表面に存在するTie 2受容体に結合してTie 2受容体をリン酸化及び活性化し、血管の安定化及び血管漏出の抑制をもたらす。他方、アンジオポエチン-2（Ang 2）は、Tie 2受容体に結合するが、アンタゴニストとして作用してTie 2受容体の不活性化を誘導し、Ang 1による結合を阻害し、血管の不安定化及び血管の漏出をもたらす、それによって新しい血管の成長を促進する傾向がある。Ang 2の発現レベルは、癌患者、眼疾患、ウイルス及び細菌感染症並びに炎症性疾患の血液中で高度に増加することが報告された（Saharinen P et al., 2017, Nature Review Drug Discovery 16: 635-661）。しかしながら、Ang 2は、リンパ管形成及び維持を含むいくつかの過程でTie 2受容体の活性化を誘導するアゴニストとして作用することも知られており、Ang 2は状況に応じて様々な機能を果たすと考えられている。

10

【0006】

これまで、様々な抗Ang 2抗体の開発及び臨床試験に、多くのバイオ医薬品企業の関心が寄せられてきた（例えば、米国特許第7,658,924号及び同第8,987,420号）。これらのAng 2抗体は、Tie 2へのAng 2の結合を阻害することが報告されており、Ang 2中和効果は、新しい血管の形成を妨げることが報告された。これらの抗Ang 2抗体の抗血管新生活性及び抗癌活性は、多くの前臨床モデルで実証されており、多様な抗Ang 2抗体が様々な癌患者で臨床的に試験されている。しかしながら、これらの抗癌効果は不十分であることが実証されている。例えば、Amgenによって実施された第3相臨床試験は、卵巣癌患者におけるAng 2抗体の抗癌効果がわずかであることを示した（Marth C et al., 2017, Eur. J. Cancer, 70: 111-121）。癌モデルに加えて、Ang 2中和抗体であるネスバクマブは眼患者において試験されたが、臨床第2相試験においてアイリーア（EYLEA）（R）（抗VEGF）の有効性を改善することができなかった。例えば、investor.regeneron.com/news-releases/news-release-details/regeneron-provides-update-eylear-afflibercept-injection-andで入手可能な「Regeneron provides update on EYLEA（R）（afibercept）injection and nesvacumab（ang2 antibody）combination program」プレスリリースを参照されたい。

20

30

【0007】

上述のAng 2中和アプローチとは対照的に、直接的なTie 2活性化もまた、血管新生を阻害し、血管透過性を抑制するための代替アプローチと考えられてきた。Tie 2受容体に直接結合し、Tie 2のリン酸化及び活性化を誘導する組換えタンパク質も、多くの前臨床癌及び眼モデルにおいて開発及び試験されてきた。その例としては、軟骨オリゴマー基質タンパク質（COMP）-Ang 1（Cho et al., 2004, PNAS 101（15）: 5547-5552）及びバスキュロチド（David S et al., 2011, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 300（6）: L851-L862）が挙げられる。これらの薬剤は抗血管新生活性及び抗透過性活性を示したが、これらは非常に短い半減期及び不安定な物理化学的特性を有する傾向がある。さらに、リン酸化されたTie 2からリン酸基を除去することによってTie 2を不活性化するホスファターゼであるVE-PTPの阻害剤として、小分子化合物（AKB-9778）が開発された（Goel S et al., 2013, J Natl Cancer Inst 105（16）: 1188-1201）。この化合物は、VE-PTPを阻害することによってTie 2活性を間接的に増加させるが、他の受容体も活性化するという欠点を有する。例えば、Frye M. et al., 2

40

50

015, J Exp. Med., 212 (13): 2267-2287; Hayashi M, et al., 2013, Nature Communication, 4: 1672; 及び Mellberg S. et al., 2009, FASEB J., 23 (5): 1490-1502) を参照されたい。さらに、アゴニスト作用を有する Tie2 抗体が開発されてきた。例えば、米国特許第 6365154 号及び米国特許出願公開第 20170174789 号を参照されたい。これらの抗体は、内皮細胞の生存を増加させ、血管漏出を阻害した。興味深いことに、ハーブ抽出物が Tie2 活性を活性化することが示され、スキンケア化粧品として使用されることにつき権利が請求された。例えば、特開第 2011102273 号、特開第 2018043949 号、特開第 2015168656 号を参照されたい。

10

【0008】

Tie2 は、血管の分化及び安定化を促進する受容体タンパク質であり、血管において高度に発現されている。活性化されると、Tie2 受容体は血管を安定化させ、周囲の支持細胞を集めることが可能となる。例えば、癌血管中の活性化された Tie2 は、癌血管を正常化し、血管漏出を低下させ、腫瘍内の増加した低酸素を排除し、腫瘍内への血流を増加させることによって十分な酸素を供給し、他の抗癌剤の送達及び免疫細胞の浸透を増加させる。

【0009】

血管内皮増殖因子 (VEGF) 阻害剤は、糖尿病性黄斑浮腫 (DME) 及び滲出型加齢黄斑変性 (wAMD) に対する標準治療の第一選択処置であるが、少なくない頻度の眼内投与及びかなりの不十分な応答の集団によって、これらの処置の有効性は制限される。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献 1】米国特許第 7, 658, 924 号

【特許文献 2】米国特許第 8, 987, 420 号

【特許文献 3】米国特許第 6, 365, 154 号

【特許文献 4】米国特許出願公開第 2017 / 0174789 号

【特許文献 5】特開第 2011102273 号

【特許文献 6】特開第 2018043949 号

【特許文献 7】特開第 2015168656 号

30

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献 1】Saharinen P et al., 2017, Nature Review Drug Discovery 16: 635-661

【非特許文献 2】Marth C et al, 2017, Eur. J. Cancer, 70: 111-121

【非特許文献 3】Cho et al., 2004, PNAS 101 (15): 5547-5552

【非特許文献 4】David S et al., 2011, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 300 (6): L851-L862

40

【非特許文献 5】Goel S et al., 2013, J Natl Cancer Inst 105 (16): 1188-1201

【非特許文献 6】Frye M. et al., 2015, J Exp. Med., 212 (13): 2267-2287

【非特許文献 7】Hayashi M, et al., 2013, Nature Communication, 4: 1672

【非特許文献 8】Mellberg S. et al., 2009, FASEB J., 23 (5): 1490-1502

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、血管新生、内皮シグナル伝達、炎症及び／若しくは血管漏出を調節するための、並びに／又は血管新生疾患を処置するための改善された方法が必要とされている。例えば、改善された有効性、親和性、半減期、安定性、薬力学、持続性、並びに／又は患者の負担及び服薬遵守の問題を軽減するための処置の頻度の減少を伴う、癌などの血管新生疾患のための処置が必要とされている。本開示は、これらのニーズの1以上を満たすこと、他の利益を提供すること、又は少なくとも有用な選択肢を公衆に提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本開示は、抗Tie2抗体又はその抗原結合断片と血管内皮増殖因子(VEGF)結合ドメインとを含む融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2、3又は4を含むTie2 Ig3-FNIII(1-3)ドメイン及びVEGFに結合する。

【0014】

一実施形態では、VEGF結合ドメインは、VEGF受容体細胞外ドメインを含む。

【0015】

一実施形態では、VEGF結合ドメインは、アンタゴニストVEGF結合ドメインである。したがって、一実施形態では、VEGF結合ドメインは、細胞中のVEGFの活性を拮抗する(すなわち、阻害する)。VEGF結合ドメインは、VEGFを結合し、その結果、VEGFがその活性を発揮するのを妨げることによってそのアンタゴニスト効果を達成する。

【0016】

一実施形態では、VEGF結合ドメインは、2つのVEGF受容体アイソフォームの細胞外ドメイン、例えばVEGF受容体1及びVEGF受容体2の両方の細胞外ドメイン(例えば、VEGF受容体1のIg2ドメイン及びVEGF受容体2のIg3ドメイン)を含む。

【0017】

一実施形態では、VEGF結合ドメインは、抗VEGF抗体又はその抗体結合断片を含む。さらなる実施形態では、抗VEGF抗体又はその断片は、ペバシズマブ、ラニビズマブ又はHuMa b G6-31(米国特許出願公開第2007/0141065号)の可変結合ドメインを含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、本開示は、血管内皮増殖因子(VEGF)結合ドメインであって、配列番号13のVEGF受容体1(VEGFR1)の血管内皮増殖因子(VEGF)-A結合領域及び配列番号14のVEGF受容体2(VEGFR2)の血管内皮増殖因子(VEGF)-A結合領域を含む、血管内皮増殖因子(VEGF)結合ドメインと、抗Tie2抗体又はその抗体結合断片と、を含む融合タンパク質であって、

ここで、前記融合タンパク質は、配列番号2、3又は4を含むTie2 Ig3-FNIII(1-3)ドメイン及びVEGFに結合する、融合タンパク質を提供する。

【0019】

一実施形態では、抗Tie2抗体又はその抗原結合断片は、アゴニスト抗Tie2抗体又はその抗原結合断片である。したがって、一実施形態では、抗Tie2抗体又はその抗原結合断片はTie2を結合し、細胞表面膜においてTie2又はTie2活性を提供し、保存し、又は増強する。

【0020】

一実施形態では、VEGF結合ドメインは、抗Tie2抗体又はその抗原結合断片の重鎖(HC)のC末端に連結されている。

10

20

30

40

50

【0021】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列のT i e 2のアミノ酸633～644（配列番号19）及び／又はアミノ酸713～726（配列番号20）を結合する。一実施形態では、抗T i e 2抗体又はその抗体結合断片は、配列番号1のアミノ酸配列のT i e 2のアミノ酸633～644（配列番号19）及び／又はアミノ酸713～726（配列番号20）を結合する。

【0022】

一実施形態では、抗T i e 2抗体はI g G 1アイソタイプを有する。

【0023】

一実施形態では、抗T i e 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号5～7のアミノ酸配列を含む重鎖C D Rを含む重鎖可変領域と、配列番号8～10のアミノ酸配列を含む軽鎖C D Rを含む軽鎖可変領域とを含む。

【0024】

一実施形態では、V E G F結合ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する配列を含む。

【0025】

一実施形態では、V E G F結合ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列を含む。

【0026】

一実施形態では、融合タンパク質は、V E G F結合ドメイン（例えば、V E G F受容体）と抗T i e 2抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含む。さらなる実施形態では、リンカーは、5～50個のアミノ酸残基、例えば10～40個の残基、例えば15～30個の残基、例えば20個の残基を含む。

【0027】

一実施形態では、融合タンパク質は、V E G F結合ドメイン（例えば、V E G F受容体）と抗T i e 2抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、リンカーは、配列番号16のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する配列を含む。

【0028】

一実施形態では、融合タンパク質は、V E G F結合ドメイン（例えば、V E G F受容体）と抗T i e 2抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、リンカーは、配列番号16のアミノ酸配列を含む。

【0029】

一実施形態では、融合タンパク質は、V E G F結合ドメイン（例えば、V E G F受容体）と抗T i e 2抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、リンカーは、配列番号25のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する配列を含む。

【0030】

一実施形態では、融合タンパク質は、V E G F結合ドメイン（例えば、V E G F受容体）と抗T i e 2抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、リンカーは、配列番号25のアミノ酸配列を含む。

【0031】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号17のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する配列を含むC Hドメインを含む。

【0032】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号17のアミノ酸配列を含むC Hドメインを含む。

【0033】

一実施形態では、融合タンパク質は、体内の他の免疫細胞上のF c受容体との効率的な

10

20

30

40

50

相互作用を低下させるか又は排除するために、重鎖の定常領域ドメイン中に1以上の変異を含む。一実施形態では、1以上の変異は、L234、L235、G236及びG237（EUNANバリング）をLAGA変異、FEGG変異、AAGG変異、AAGA変異、LALA変異又はそれらの組み合わせに変化させることを含む。一実施形態では、1以上の変異は、LALA変異と、K322における変異（例えば、K322A）及びP331における変異（例えば、P331S）とを含む（EUNANバリング）。

【0034】

一実施形態では、融合タンパク質は、L234、L235、H310、M252、I253、S254、T256、H433、N434及び／又はH435（EUNANバリング）に1以上の変異を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、L234A、L235A及び／又はH310Aに1以上の変異を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、M252（例えば、M252Y）、I253（例えば、I253A、I253M又はI253V）、S254（例えば、S254T）、T256（例えば、T256D）、H433（例えば、H433K）、N434（例えば、N434F）及び／又はH435（例えば、H435A、H435Q又はH435R）に1以上の変異を含む。

10

【0035】

一実施形態では、融合タンパク質は、抗Tie2抗体又はその抗原結合断片の1以上の重鎖定常ドメインのC末端側に及びN末端からC末端への順序で、VEGF結合ドメインと抗Tie2抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、例えばリンカーは、5～50残基、例えば10～40残基、例えば15～30残基、例えば20残基を有する配列を含み、VEGF結合ドメインは配列番号15のアミノ酸配列を含む。

20

【0036】

一実施形態では、融合タンパク質は、抗Tie2抗体又はその抗原結合断片の1以上の重鎖定常ドメインのC末端側に及びN末端からC末端への順序で、VEGF結合ドメインと抗Tie2抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、リンカーは、配列番号16又は25のアミノ酸配列を含み、VEGF結合ドメインは配列番号15のアミノ酸配列を含む。

【0037】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号17のアミノ酸配列を含むCHドメインと、VEGF結合ドメインと抗Tie2抗体又はその抗体断片との間に配列番号16又は25のアミノ酸配列を含むリンカーを含み、VEGF結合ドメインは配列番号15のアミノ酸配列を含む。

30

【0038】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0039】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号11のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を含む重鎖を含む。

【0040】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号26のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を含む重鎖を含む。

40

【0041】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0042】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0043】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号12のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を含む軽

50

鎖を含む。

【0044】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0045】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

【0046】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

【0047】

一実施形態では、融合タンパク質は、 3×10^{-9} M未満の親和性 K_D (M) で、配列番号2、3又は4を含むTie2 Ig3-FNIII (1-3) ドメインに結合する。

【0048】

一実施形態では、融合タンパク質はペグ化されている。PEG化（又はペグ化）は、複数のポリエチレングリコール（PEG、マクロゴールとも呼ばれる）単位（例えば、PEGポリマー）を含む鎖の共有結合的な付着又は融合を指す。一実施形態では、PEGは、約40 kDa又は約20 kDaの分子量を有する。

【0049】

一実施形態では、融合タンパク質は、部位特異的にペグ化されている。一実施形態では、融合タンパク質は、システイン残基上で部位特異的にペグ化されている。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号22の配列をさらに含み、配列番号22の配列のシステイン残基上で部位特異的にペグ化されている。

【0050】

一実施形態では、配列番号22の配列は、重鎖のC末端に存在する。一実施形態では、重鎖は、配列番号23の配列を含む。一実施形態では、重鎖は、配列番号24の配列を含む。

【0051】

一実施形態では、融合タンパク質は、1以上の半減期延長モジュレータをさらに含む。一実施形態では、1以上の半減期延長モジュレータは、融合タンパク質の半減期を増加させる化学物質、バイオポリマー又はペプチドを含む。

【0052】

一実施形態では、本発明の融合タンパク質の鎖状単量体を含むポリペプチドが提供される。

【0053】

一実施形態では、ポリペプチドは、本発明の融合タンパク質の重鎖単量体を含む。さらなる実施形態では、ポリペプチドは、配列番号11又は26の配列に対して少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも75%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、例えば少なくとも85%の同一性、例えば少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも91%の同一性、例えば少なくとも92%の同一性、例えば少なくとも93%の同一性、例えば少なくとも94%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、例えば少なくとも97%の同一性、例えば少なくとも98%の同一性、例えば少なくとも99%の同一性、例えば100%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号11の配列からなる。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26の配列からなる。

【0054】

一実施形態では、ポリペプチドは、本発明の融合タンパク質の軽鎖単量体を含む。さらなる実施形態では、ポリペプチドは、配列番号12に対して少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも75%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、例えば少なくとも85%の同一性、例えば少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも91%の同一性、例えば少なくとも92%の同一性、例えば少なくとも93%の同一性、例えば少なくとも94%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、例えば少なくとも97%の同一性、例えば少なくとも98%の同一性、例えば少なくとも99%の同一性、例えば100%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号12の配列からなる。

10

20

30

40

50

94%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、例えば少なくとも97%の同一性、例えば少なくとも98%の同一性、例えば少なくとも99%の同一性、例えば100%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号12の配列からなる。

【0055】

本明細書で使用される場合、「バイオポリマー」は、生物学的材料から化学的に合成されるか、又は生物若しくは微生物によって完全に生合成されるかのいずれかの、天然源から生産されるポリマーを指す。いくつかの実施形態では、バイオポリマーは、ポリペプチド又はタンパク質（すなわち、アミノ酸のポリマー、例えば、コラーゲン、アクチン及びフィブリン）、ポリヌクレオチド（すなわち、核酸のポリマー、例えばDNA又はRNA）、多糖（すなわち、炭水化物及びグリコシル化分子、例えば、セルロース、デンプン又はアルギネート）、天然ゴム（イソプレンのポリマー）、スバリン、リグニン（複合ポリフェノールポリマー）、クチン及びクタン（長鎖脂肪酸の複合ポリマー）、メラニン、代謝産物及びその他の構造分子を含むが、これらに限定されない。

【0056】

一実施形態では、1以上の半減期延長モジュレータは、PEG（ポリエチレングリコール）、ヒアルロン酸（HA）又はホスホリルコリンを含有するバイオポリマー；アルブミン；アルブミン結合ペプチド及び／又はHA結合タンパク質断片を含む。

【0057】

別の実施形態では、本開示は、融合タンパク質をコードする核酸を提供する。

【0058】

別の実施形態では、本開示は、本発明の融合タンパク質の鎖状単量体を含むポリペプチドをコードする核酸を提供する。一実施形態では、本開示は、融合タンパク質の重鎖をコードする核酸を提供する。別の実施形態では、本開示は、融合タンパク質の軽鎖をコードする核酸を提供する。

【0059】

一実施形態では、核酸分子は、配列番号27又は29に対して少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも75%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、例えば少なくとも85%の同一性、例えば少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも91%の同一性、例えば少なくとも92%の同一性、例えば少なくとも93%の同一性、例えば少なくとも94%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、例えば少なくとも97%の同一性、例えば少なくとも98%の同一性、例えば少なくとも99%の同一性、例えば100%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号27又は29からなる。

【0060】

一実施形態では、核酸分子は、配列番号28に対して少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも75%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、例えば少なくとも85%の同一性、例えば少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも91%の同一性、例えば少なくとも92%の同一性、例えば少なくとも93%の同一性、例えば少なくとも94%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、例えば少なくとも97%の同一性、例えば少なくとも98%の同一性、例えば少なくとも99%の同一性、例えば100%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号28からなる。

【0061】

一実施形態では、本開示は、各ポリヌクレオチドが本発明の融合タンパク質の単量体鎖の少なくとも1つをコードする、1以上のポリヌクレオチドのセットを提供し、前記融合タンパク質のこのような両方の鎖（すなわち、軽鎖及び重鎖）がコードされる。

【0062】

別の実施形態では、本開示は、核酸を含む発現ベクターを提供する。別の実施形態では、融合タンパク質の1つの重鎖配列及び1つの軽鎖配列をコードする核酸を含むベクター

が提供される。

【0063】

一実施形態では、融合タンパク質の両方の鎖（すなわち、軽鎖及び重鎖）がベクターの前記セットにおいてコードされるように、本発明の1以上のポリヌクレオチドのセットを集団的に含む1以上のベクターのセットが提供される。

【0064】

一実施形態では、ベクターは、動物ウイルス、例えば逆転写酵素ウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、水痘ウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、アネロウイルス及びパポバウイルスから選択されるウイルスである。

【0065】

一実施形態では、発現ベクターは、ヒトサイトメガロウイルスIE1（CMV-IE1）プロモーター／エンハンサーをさらに含む。

【0066】

別の実施形態では、本開示は、発現ベクターで形質転換された細胞を提供する。

【0067】

別の実施形態では、本開示は、Tie2及びVEGFを結合する融合タンパク質を製造する方法であって、発現ベクターで形質転換された細胞を培養する工程と、培養された細胞から融合タンパク質を回収する工程とを含む、方法を提供する。別の実施形態では、本開示は、ベクター又はベクターのセットからの発現による本発明の融合タンパク質の生産のための方法を提供する。

【0068】

別の実施形態では、本開示は、血管新生疾患を予防又は処置するための方法であって、血管新生疾患を予防又は処置することを必要とする対象に、有効量の融合タンパク質を投与することを含む、方法を提供する。

【0069】

別の実施形態では、本開示は、血管新生疾患を処置することを必要とする対象における血管新生疾患を処置するための医薬の製造のための、融合タンパク質の使用を提供する。

【0070】

別の実施形態では、本開示は、血管新生疾患又は血管疾患を処置することを必要とする対象における血管新生疾患又は血管疾患の処置において使用するための融合タンパク質を提供する。

【0071】

いくつかの実施形態では、血管新生疾患又は血管疾患は、癌、転移、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、角膜移植片拒絶反応、黄斑変性、血管新生緑内障などの緑内障、全身性紅皮症、増殖性網膜症、乾癬、血友病性関節症、類縁硬化症、アテローム性プラークの毛細血管形成、ケロイド、創傷肉芽形成、血管接着、関節リウマチ、骨関節炎、自己免疫疾患、クローン病、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、腸管癒着、ネコ引っ掻き病、潰瘍、肝硬変、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病、炎症性疾患又は神経変性疾患である。

【0072】

いくつかの実施形態では、癌は、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、肺癌、結腸癌、乳癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、膵臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳癌、甲状腺癌、白血病、ホジキンリンパ腫、リンパ腫又は多発性骨髄性血液癌である。

【0073】

いくつかの実施形態では、本開示は、血管新生、内皮シグナル伝達、炎症及び／又は血管漏出を調節するための方法であって、血管新生、内皮シグナル伝達、炎症及び／又は血管漏出を調節することを必要とする対象に有効量の融合タンパク質を投与することを含む、方法を提供する。

【0074】

いくつかの実施形態では、炎症は、敗血症、急性呼吸促迫症候群及び／又はウイルス感染性疾患に由来する。

【0075】

いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物の愛玩動物などの愛玩動物である。いくつかの実施形態では、哺乳動物の愛玩動物は、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレット、ウマ、ラバ、ロバ若しくはハムスター又はその他の家畜化されたペットである。

【0076】

いくつかの実施形態では、本開示は、融合タンパク質を含む薬学的組成物を提供する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、薬学的に許容され得る担体、希釈剤又は賦形剤をさらに含む。

【0077】

追加の目的及び利点は、以下の説明において部分的に記載されており、説明から部分的に理解されるか、又は実践によって習得され得る。目的及び利点は、添付の特許請求の範囲において特に指摘されている要素及び組み合わせによって実現及び達成される。

【0078】

前述の一般的な説明及び以下の詳細な説明はいずれも、例示的かつ説明的なものにすぎず、特許請求の範囲を限定するものではないことを理解されたい。セクションの見出しは、単に読者の便宜のために提供されており、本開示を限定するものではない。

【0079】

本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を構成する添付の図面は、特定の実施形態を示し、説明と共に、本明細書に記載されている原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1A】図1A～1Cは、ヒト（図1A）、ウサギ（図1B）及びマウス（図1C）Tie2-Fc融合タンパク質へのIGT-427の結合についてのセンサーグラムを提供する。

【図1B】図1A～1Cは、ヒト（図1A）、ウサギ（図1B）及びマウス（図1C）Tie2-Fc融合タンパク質へのIGT-427の結合についてのセンサーグラムを提供する。

【図1C】図1A～1Cは、ヒト（図1A）、ウサギ（図1B）及びマウス（図1C）Tie2-Fc融合タンパク質へのIGT-427の結合についてのセンサーグラムを提供する。

【図2A】図2A～2Cは、IGT-427によるVEGFR2リン酸化及びAKT活性化の阻害を示す。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUEVC）を4時間血清飢餓状態にし、表記された濃度のIGT-427（図2A）又はアフリベルセプト（図2B）とともに30分間インキュベートし、次いで、組換えヒトVEGFで2分間処理した。細胞可溶化物をSDS-PAGE／ウェスタンブロッティングに供し、抗ホスホ-VEGFR2（Tyr1175）、抗VEGFR2、抗ホスホ-Akt（S473）又は総Akt抗体でプロットをブローブした。VEGFレポーターアッセイは、IGT-427、ファリシマブ及びアフリベルセプトの同等の阻害効果を示す（図2C）。

【図2B】図2A～2Cは、IGT-427によるVEGFR2リン酸化及びAKT活性化の阻害を示す。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUEVC）を4時間血清飢餓状態にし、表記された濃度のIGT-427（図2A）又はアフリベルセプト（図2B）とともに30分間インキュベートし、次いで、組換えヒトVEGFで2分間処理した。細胞可溶化物をSDS-PAGE／ウェスタンブロッティングに供し、抗ホスホ-VEGFR2（Tyr1175）、抗VEGFR2、抗ホスホ-Akt（S473）又は総Akt抗体でプロットをブローブした。VEGFレポーターアッセイは、IGT-427、ファリシマブ及びアフリベルセプトの同等の阻害効果を示す（図2C）。

【図2C】図2A～2Cは、IGT-427によるVEGFR2リン酸化及びAkt活性化の阻害を示す。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUV EC）を4時間血清飢餓状態にし、表記された濃度のIGT-427（図2A）又はアフリベルセプト（図2B）とともに30分間インキュベートし、次いで、組換えヒトVEGFで2分間処理した。細胞可溶化物をSDS-PAGE／ウェスタンブロッティングに供し、抗ホスホ-VEGFR2（Tyr1175）、抗VEGFR2、抗ホスホ-Akt（S473）又は総Akt抗体でプロットをブローブした。VEGFレポーターアッセイは、IGT-427、ファリシマブ及びアフリベルセプトの同等の阻害効果を示す（図2C）。

【図3】図3は、アンジオポエチン-1と比較した場合の、IGT-427によるホスホ-Tie2シグナル伝達のより強力かつより持続的なレベルを示す。ヒトTie2を過剰発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を4時間血清飢餓状態にし、次いで、10nMのIGT-427又はアンジオポエチン-1で表記の期間処理した。可溶化物をホスホ-Tie2及び総Tie2 ELISAアッセイに供した。

【図4】図4は、HUV ECにおけるIGT-427によるAktシグナル伝達の用量依存的活性化を示す。

【図5】図5は、IGT-427が、HUV ECにおいて、Tie2シグナル伝達に対するアンジオポエチン-2の効果を乗り越え、回避し、前処理されたAng2の存在下でAktシグナル伝達のさらなる活性化をもたらすことを示す。

【図6】図6は、IGT-427がAng2と複合体を形成したTie2及びVEGFに同時に結合することを示す。Ang2をCM5チップに捕捉し、続いて、ヒトTie2、IGT-427及びヒトVEGFを表面プラズモン共鳴（SPR）（Biocore（商標））分析において注入した。

【図7】図7は、IGT-427によるTNF- α 誘導性アポトーシスの阻害を示す。IGT-427又はアイリーア（R）でHUV ECを1時間前処理し、次いで、TNF（50ng/ml）で24時間処理した。APO-BrdU（商標）TUNEL Assay Kit（Thermo Fisher、A23210）によってアポトーシス細胞を染色し、Attune（Thermo Fisher）によって判定した。値は平均±標準誤差である。一元配置ANOVAにより***p<0.001、****p<0.0001。

【図8】図8は、様々な時点で様々な薬剤で処理された、ヒトTie2を過剰発現するチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO-Tie2）上のTie2の細胞表面レベルを示す。

【図9】図9は、IGT-427がMMP14によるTie2切断を阻止することを示す。組換えヒトMMP14、ヒトTie2-EC-D-ヒトIgGFc融合タンパク質又はIGT-427を混合し、示されているようにインキュベートした。

【図10】図10は、IGT-427が、基礎のHUV EC又はTNF- α 処理されたHUV ECにおけるsTie2生成を阻害することを示す。sTie2のレベルは、Tie2 ELISAアッセイによって測定された。

【図11】図11は、IGT-427がVEGF処置による損なわれた内皮バリア完全性を回復することを示す。HUV ECにおいて、TEER（経内皮電気抵抗）を評価した。

【図12】図12は、レーザー誘発CNVモデルにおける硝子体内注射されたIGT-427又はアイリーア（R）によるCNV（脈絡膜新生血管形成）の抑制を示す。抗体（50 μ lの注入体積／眼、アイリーア（R）（800 μ g）、IGT-427（885 μ g）、対照IgG（716 μ g）の硝子体内投与をレーザー光凝固後0日目に行った。アイリーア（R）、IGT-427及び対照IgGのモル比は、1：0.65：0.68である。レーザー光凝固後14日目に撮影したFA画像において、CNV周辺の漏出領域における蛍光強度を測定した。各群について、4～7匹のウサギを試験し、6つのレーザー誘発CNV病変を各ウサギについて試験した。CNV病変（n=24～42）を各群について画像化した。値は平均±SEMである。一方向ANOVAにより*p<0.05、**p<0.001。

10

20

30

40

50

【図13】図13は、PEG化のためのIGT-427バリエーションの概略図を示す。すべての構築物は、抗体あたり2つの不安定なシステインを生成する5つの異なる重鎖を有する共通の軽鎖を有する。

【図14】図14は、5つのIGT-427バリエーションに対する最適化されたPEG化条件のSDS-PAGEデータを示す。PRO593、PRO594及びPRO595は、反応混合物中に非修飾抗体を有せずに完全な変換を受ける。PRO592及びPRO596の反応混合物は、反応の終了時にいくつかの非修飾抗体を有する。

【図15】図15は、Tie2及びVEGF表面へのIGT-427及びPEG化バリエーションのSPR結合を示す。いずれかの抗原への結合シグナルにわずかな差が存在するが、非修飾IGT-427と比較して、PEG化バリエーションは両抗原を同じように結合する。

【図16】図16は、5つの眼のPK研究被験物質のSEC-HPLCクロマトグラムを示す。15%の高分子量種を含有する20kDaのPEG化種を除いて、すべての構築物は、90%を超えて純粋であった。

【図17】図17は、眼のPK研究被験物質の非還元型SDS-PAGEデータを示す。レーン1：アイリーア(R)；レーン2：ファリシマブ；レーン3：IGT-427；レーン4：(2×20kDaの直鎖状PEG)-IGT-427；レーン5：(2×40kDa分枝状PEG)-IGT-427。

【図18A】図18A～18Cは、ウサギVEGF(図18A)、Tie2(図18B)及びAng2(図18C)への眼のPK被験物質のSPR結合データを示す。測定された結合定数の要約が表として記載されている。

【図18B】図18A～18Cは、ウサギVEGF(図18A)、Tie2(図18B)及びAng2(図18C)への眼のPK被験物質のSPR結合データを示す。測定された結合定数の要約が表として記載されている。

【図18C】図18A～18Cは、ウサギVEGF(図18A)、Tie2(図18B)及びAng2(図18C)への眼のPK被験物質のSPR結合データを示す。測定された結合定数の要約が表として記載されている。

【図19-1】図19は、ニュージーランド白ウサギ硝子体からの総薬物測定の要約を示す。ELISA定量からの測定された薬物レベルを経時的にプロットした。各データ点は、単一のウサギの眼からの2つ組の測定を表す。各データセットへの指数関数フィットが、フィットされたパラメータとともに赤色で示されており、抽出された眼の半減期が各曲線の下に示されている。PEG化IGT-427バリエーションについては、14日間の測定値がプロットに含まれているが、フィッティング及び抽出された半減期分析からは除外されている。各被験物質について観察された半減期の要約が右下に示されている。

【図19-2】図19は、ニュージーランド白ウサギ硝子体からの総薬物測定の要約を示す。ELISA定量からの測定された薬物レベルを経時的にプロットした。各データ点は、単一のウサギの眼からの2つ組の測定を表す。各データセットへの指数関数フィットが、フィットされたパラメータとともに赤色で示されており、抽出された眼の半減期が各曲線の下に示されている。PEG化IGT-427バリエーションについては、14日間の測定値がプロットに含まれているが、フィッティング及び抽出された半減期分析からは除外されている。各被験物質について観察された半減期の要約が右下に示されている。

【図19-3】図19は、ニュージーランド白ウサギ硝子体からの総薬物測定の要約を示す。ELISA定量からの測定された薬物レベルを経時的にプロットした。各データ点は、単一のウサギの眼からの2つ組の測定を表す。各データセットへの指数関数フィットが、フィットされたパラメータとともに赤色で示されており、抽出された眼の半減期が各曲線の下に示されている。PEG化IGT-427バリエーションについては、14日間の測定値がプロットに含まれているが、フィッティング及び抽出された半減期分析からは除外されている。各被験物質について観察された半減期の要約が右下に示されている。

【発明を実施するための形態】

【0081】

配列の説明

表 1 は、本明細書で参照される特定の配列のリストを提供する。
【表 1】

表 1: 配列の説明		配列	配列番号
ヒト Tie2 完 全長		MDSLASLVLCGVSLLSLGSVTEGAMDLILINSLPLVSDAETSLTCIASGWR 50 PHEPITIGRDFEALMNQHQQDPLEVTQDVTREWAKKVVWKREKASKINGAY 100 FCEGRVGEAIRITMRQKASFLPATITMTDGDNDVNISFKKVLKE 150 EDAVIYKNGSFIHSPRHEVPDILEVHLPHAQDAGVYSARYIGGNLFT 200 SAFTLIVRCEAQKWPECNHLCTACMNNNGCHEDTECICPPGFMGR 250 CEKACELHTFGRTCKERCSCGEGCKSYVFCLPDPYGCSCATGWKGLQNE 300 ACHPGFYGPDCKLRCSCNNGEMCDRFQGLCSPGWGLQCLREGIGRMT 350 KIVDLPDHIENVSGKFNPKICKASGWPLPTNEEMTLVKPDGTVLHPKDFNH 400 TDHFSVAIFTHRLPPDSGVVVCSTNVTAGMVEKFNISVKVLPKPLNA 450 PNVIDTGHNFVINISSEPYFGDGPICKKLLYKPNHYEAWQHIQVTNE 500 IVTLNYLEPRTEYELCVLVRREGEGEGHPGVRFRFTASIGLPPRGLN 550 LLPKSQTTLNLTWQPIFPSSDDFYVEVERRSVQKSDQNNIKVPGNLTSV 600 LLNHLHPREQYVVRARVNTKAQGEWSEDLTAWTSLDILPPQPENIKISNI 650 THSSAVISWTILDGYSISSITIRYKVGKNEHQHVDVKIKNATITQYQLK 700 GLEPETAYQVDIFAENNIGSSNPAFSHELVTLPESQAPADLGGKMLLIA 750 ILGSAGMTCLTVLLAFILQLKRANVQRRMAQAFQNVREEPVQFNSGT 800 LALNRKVNKNPDPTIYPVLDWNDIKFQDVIGEGFQVLKARIKDGRLM 850 DAAIKRMKEYASKDDHRDFAGELEVLCKLGHPNIINLLGACEHRYLYL 900 AIEYAPHGNLLDFLRKSRLVETDPAFAIANSTASLSSQQLLHFAADVAR 950 GMDYLSKQKFHRLDAARNILVGENYVAKIADFLSRGQEVYVKKTMGRL 1000 PVRWMAIESLNYSVYTTNSDVWSYGVLLWEIVSLGTPYCGMTCAELYEK 1050 LPQGYRLEKPLNCDDEVYDLMRQCWREKPYERPSFAQILVSLNRMLEERK 1100 TYVNTTLYEKFTYAGIDCSAEAA 1124	1
ヒト Tie2 Ig3- FNIII(1-3)		TPKIVDLPDHIENVSGKFNPKICKASGWPLPTNEEMTLVKPDGTVLHPKDF 50 NHTDHFSAIFTIHRILPPDSGVVVCSTNVTAGMVEKFNISVKVLPKPL 100 NAPNVIDTGHNFVINISSEPYFGDGPICKKLLYKPNHYEAWQHIQVT 150 NEIVTLNYLEPRTEYELCVLVRREGEGEGHPGVRFRFTASIGLPPRPG 200 LNLPKSQTTLNLTWQPIFPSSDDFYVEVERRSVQKSDQNNIKVPGNLT 250 SVLLNHLHPREQYVVRARVNTKAQGEWSEDLTAWTSLDILPPQPENIKIS 300 NITHSSAVISWTILDGYSISSITIRYKVGKNEHQHVDVKIKNATITQYQ 350 LKGLEPETAYQVDIFAENNIGSSNPAFSHELVTLPESQAP 390	2
ウサギ Tie2		TPKIEDLPDHIENVNTGKFNPKICKASGWPLPANEEMLTVKPDGTVLHPKDFNHTENFSVAI 60	3

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

Ig3-FNIII(1-3)	FTIHRILPLDSGVWVCSVNTVAGMVEKPFNISVKVLPKPLNAPNVIDTGHNFVAINISSE 120 PYFGDGPIKSKKLLYKPVNDYEAWRHIQVTNEIVTLNYLEPRTEYELCVQLIRRGEGEG 180 HPGPVRRFTTASIGLPPPPQGLILPKSQTTLNLTWQPIFPSEDDFYVEVERRSVQIKSD 240 QQNIKVPGNLTSVLLNNLHPREQYVVRARVNTKAQGEWSEDLTAWTSLDIVPPQPENIKI 300 SNITDSSAVISWTILDGYSISSIIIRYKVQGNEDQHIDVKIKNATITQYQLKGLEPETA 360 YQVDMFAENNIGSSNPAFSHELMTLPESQAP 391	
マウス Tie2 Ig3-FNIII(1-3)	TPQIEDLPDHIEVNSGKFNPKICKASGWPLPTSEEMTLVKPDGTVLQPNDFNYTDRFSVAI 60 FTVNRVLPPDSGVWVCSVNTVAGMVEKPFNISVKVLPKPLHAPNVIDTGHNFVAINISSE 120 PYFGDGPIKSKKLLYKPVNQAWKYIEVTNEIFTLNYLEPRTDYELCVQLARPGEGEGHP 180 GPVRRFTTASIGLPPPPRGLSLLPKSQTALNLTWQPIFTNSEDEFYVEVERRSQTTSDDQQ 240 NIKVPGNLTSVLLSNLVPREQYTVRARVNTKAQGEWSEELRAWTSLDIVPPQPENIKISN 300 ITDSTAMVSWTIVDGYSSIIIRYKVQGNEDQHIDVKIKNATVTQYQLKGLEPETTYH 360 VDIFAENNIGSSNPAFSHELRTLPHSPAS 389	4
抗体 3H7 CDRH1-KABAT	SYWMN	5
抗体 3H7 CDRH2-KABAT	MIHPSDSETRLNQKFMD	6
抗体 3H7 CDRH3-KABAT	GLYGNS	7
抗体 3H7 CDRL1-KABAT	RASQDIGISLN	8
抗体 3H7 CDRL2-KABAT	ATSSLDS	9
抗体 3H7 CDRL3-KABAT	LQYASSPYT	10
(G4S) ₄ リンカーを有する IGT-427 HC	MNFGRLRILFLVLTILKGVQCEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYWMNWVRQAP 60 GQGLEWMGMIHPSDSETRLNQKFMDRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLY 120 GNSWGGQGLTAVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGAL 180 TSGVHTFPAPVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKKVDEPKSCDKT 240 HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE 300 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP 360 REPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS 420	11

【 0 0 8 3 】

10

20

30

40

	FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMMHEALHNHYTQKSLSPGKGGSGGGSGGGSG 480 GGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPTNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI 540 IWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVLSPSHGIELSV 600 GEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT 660 RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK 689
IGT-427 LC	MNFGRLIFLVLTCLKGVQCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGISLNWYQQEPG 60 KAIKRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGTEYTLTISSLESEDADYYCLQYASSPYTFGGG 120 TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE 180 SVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEHKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 233
VEGFR1	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPTNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIWDSRKGFIISNATY KEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDV
VEGFR2	VLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTI DGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
組換えヒト VEGF165 タンパク 質、VEGFR 結合ドメイ ン	APMAEGGGQNHHEVVKFMDEVYQRSYCHPIETLVDFIQEYPPDEIEYIFKPPSCVPLMRCGGCCNDEGLE CVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLLQHNNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQT CKCCKNTDS ROKARQLELNERTCRCDKPRR
(G ₄ S) ₄ リン カー	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGS
IGT-427 CHドメイン	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSVFLFPPKPKDTLTMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IGT-427 VH(HC可変 領域)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGGLFWMGMIHPSDSETRLNQKFMD RVTMTTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARGLYGNSWGQGTLVTVTS
IGT-427 VL(LC可変 領域)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGISLNWYQQEPGKAIKRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGTE YTLTISSLESEDADYYCLQYASSPYTFGGGTKLEI
結合ドメイ ン(配列番号 1のTie2の アミノ酸 633~644)	TLSDILPPQPEN

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

結合ドメイン (配列番号 1 の Tie2 の アミノ酸 713~726)	FAENNIGSSNPAFS	21
C 末端付加	GGSSKCA	22
C 末端付加 を有する IGT-427 HC	MNFGRLFLVLTCLKGVQCEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTSYWMNWVRQAP 60 GQGLEWGMGIHPSDETRLNQKFMDRVMTTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGLY 120 GNSWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGAL 180 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKT 240 HTCPPCPAPEAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE 300 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYCKVKSNKALPAIEKTIKAKGQP 360 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS 420 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSG 480 GGSSDTGRPFVEMYSEIPIIHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI 540 IWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSV 600 GEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT 660 RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGSSKCA 696	23
IGT-427 HC からの C 末端付加配 列を有する VEGFR2	VLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRRDLKTQSGSEMKKFLSTLTI DGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGSSKCA	24
IgG ₁ リンカ ー	GGGGGGGGSEPKSSDKTHT	25
IgG ₁ リンカ ーを有する IGT-427 HC	MGWSCHILFLVATATGVHSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTSYWMNWVRQAPGQGLEWM GMIHPSDSETRLNQKFMDRVMTTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGLYGNSWGQGLTVVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAGGPSVFLPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGS EPKSSDKTHTSDTGRPFVEMYSEIPIIHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIWDS RKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTEL NVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS TFVRVHEK	26

【 0 0 8 5 】

10

20

30

40

(G ₄ S) ₄ リン カーを有す る IGT-427 HC のヌクレ オチド配列	ATGGGATGGTCAATGATATCATCCCTTTTCTGGTAGCAAACTGCAAACTGGAGTACATAGCGAGGTGCAGCT GGTGCAATCAGGCGCTGAGGTCAAGAAAACCGGGGCTTCAAGTCAAGGTGAGCTGTAAGGCTTCTGG CTACTCTTCACTCTACTGATGAATGGGTGAGACAGGCCCTCGGCAAGGACTGGAGTGGATG GGCATGATCCACCAAGCGACAGTGAACACGCCCTGAACACGAAAGTTATGGACCGGTGTCACCATGA CAAGAGACACACGACCAAGCACTGTGTATATGAGCTCTCTTCCCTGCGTCCGAAAGATACCGCCGT GTAATACTGCGCCGGGACTCTATGAAACTCTGCGGCCAGGGACCCCTAGTACAGTGTCTCTCT GCTAGCAAAAGGCCCATCGTCTTCCCTCCCTGGCACCCCTCCTCCAAAGCACCTCTGGGGGACACAG CGGCCCTGGGTGCTGCTCAAGGACTACTTCCCGAAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCG CCCTGACACAGCGGTGCAACCTTCCCGGCCGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGCAAGAAAGTTGACCCCAAACTTCTGACATAAACTCACATGCCCAACCGT GCCAGCACCTGAAGCCGCTGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGCACACCT CATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCTGGTGGTGGAGCTGAGACGACGACCCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGCTCAGCTCCTACCGTCTCGGCCAGGACTGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAACCATCTCCAAGGCCAA AGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGACACCTGCCCTCCCATCCCGGACGAGTGAACCAAGAACCA GGTCAGCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCCTCCGTGCTGACTCCGACGGCTCTTCTCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGACAAAGCAGGTGGCAGAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAAACCACTACAGCAGAAAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAAAGGTGGCGGAG GCTCTGAGGCGCGGATCCGGGAGGAGGCTCCGGAGAGGTGGCAGCAGTGAACGGGAAAGC CTTTCGTGGAGATGACTCTGAGATCCCGAAATATTACATGACCGAGGCGCGGAGCTGGTCTAT CCCTTGCCGAGTGACAAGCCCAACATCACTGTACTCTCAAGAAAGTTCTCTCGACACCTGTATAC CGGATGGCAAGAGATCATTTGGGATTCCTCGCATAGGCTTCTATCTCTAAACCTCTAAACCTACATAAAGGAG ATCGGACTGCTGACATGCGAAGCCACCGTGAATGGCACTCTACAAAACCAACTACCTGACCCAC GCCAAACAATACCATCATTGACGTGGTTCTATCCCAAGCCATGGATTGAACTGAGTGTGGGAGA AAAGTTAGTGTGAATGCACCGCAGCAGCAAGAACTGAACGTGGCATCGACTTAATTGGGAGTAC CCCTCTAGCAAGCACAGCACAAAAGCTGGTTAATCGAGACCTGAAGACCCAGAGCGGTCTTGAAA TGAAAGAAATTCCTGTCCACCTGACTATTGACGGGGTAACCAAGTCCGATCAAGGGCTGTATACCTTG CGCGGCTCTAGTGGCTTGATGACAAAGAAACAGCACCTTCGTTAGAGTGCATGAGAAA	27
IGT-427 LC のヌクレ オチド配列	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTGGGTCCAGGCTCCACCGGCGACATTC AGATGACCCCAATCGCGCTCTTCCCTCTCTGCTAGCGTGGCGGACCGAGTTACCATCACTTGTGAGC TAGCCAGGACATCGGTATCTCACTGAATGGTACCAAGAGCCAGGAAAAGCCATCAAGAGGCTG ATATATGCCACAAAGTTCACTGGATAGCGAGTCCCAAAAGTTTAGTGGCATGAAAGCGGCACAG AGTATACCTGACTATCTCAAGCCCTGGAGTCCGAGGACTTTGCTGACTACTATTGCCACAAATACCG TCAAGTCCCTACACATTTGGCGGGGGAACAAAGCTGGAATCAAGCGTACGGTGGTGCACCATCTG TCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAAT AACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGATAACGCCCCCTCCAATCGGGTAACCTCCC	28

【 0 0 8 6 】

10

20

30

40

50

	29	AGGAGAGTGTCAACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAAGCAGACTACGAGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGGAAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGT
IgG ₁ リン ーを有する IGT-427 HCのヌクレ オチド配列	30	ATGGGATGGTCAATGATATCATCTTTTCTGGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATAGCGAGGTCCAGTT AGTGCAATCGGAGCCGAAAGTCAAGAAAGCCAGGTGCCTCCGTTAAAGTTTCATGTAAAGCTTCAGGA TACAGTTTACATCTTATGATGAAATGGTTAGACAGCTCCAGTCAAGCCCTGGAGTGGATGG CGATGATCCATCTTGTATGACGAAACCCGCTGAACCAAGATTTCATGGACAGAGTTACCATGACC CGGACACAGACGACCGTATACATGAGTGTAGTAGCTGAGTGTGAGGTCAGAGGATACAGCCGTGT ATTACTGTGCAAGTGGCCTTATGGCAATTTTGGGCGCAGGCACTTTGGTAAACAGTCTCCTCAGCT AGCACAAAGGCGCATCGTCTCCCTTGGCACCTCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGCGCC TGGTGACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACTGCAATCAAGCCAG CAACCAAGGTGACAAAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAACCTCACACATGCCCAACCGTGC CCAGCACTGAAGCCGTGGGACCGTCAAGTCTCTTCCCGCAACCAAGGACACCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCTGCTGGTGGAGCTGAGCCAGCAAGACCCCTGAGTCA AGTTCAACTGGTACGTTGACGCGGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGT ACAAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCACCGTCTCCGCGCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAAGTGCAGGTCTCCACAAAGCCCTCCAGCCCTCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCTCCCGACATCCCGGACGAGCTGACCAAGAACCCAG GTCAGCCTGACCTGCTGTCAAAGGCTTCTATCCCGACGACATCCGCGGTGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACCAACTACAGACCAAGCCCTCCCGTGTGCTGAGTCCGACGCTCCCTCTCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGCAGGTTGGCAGCAGGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCAACCACTACACGCAAGAGCCCTCTCCGTCTCCGGCAAGGAGGAGGCGGC TCTGGTGGTGGAGGCAAGTGAACCAAGAGCAGCAGCAACATACAAAGTACACAGGCGCGGCA TTCGTGGAATGATTCGAAATACCTGAGATCATTCATGACAGAGGGCAGAGAGTGTCTATTCC GTGTCGGGTCAATCCCTAATATCACTGTGACCTTGAAAAAGTTCCCTGGATACCTGATTCCTG ACGGAAGCGCATCATCTGGGACAGCAGAAAGGTTCTATCATCTTAAAGCCACCTACAAAGAAAT TGGCTTGTGATGATGAGCAACCGTCAACGGGCACTGTACAAAGCACTATCTGACTCATCTCGG CAAACTAATACCATCATCGATGTGTCTCTCCAAAGTCAAGTGAATGAGCTCTCCGTGGCGAGAA ACTGGTGTCAATTCACCGCACCGGAGGAGTTGAACGTCGGAATCGATTTAATGGGAGTACCCC TCCTCGAAGCATCAGACAAAGAGCTCGTAAACCGAGATCTCAAAACCCAGTCCGGCTCTGAGATGA AGAAATTCCTGAGCACACTGACAAATGATGAGTGAACCGGAGACGAGGCGCTCTACACCTGCGC TGCTAGCTCCGGATTGATGACCAAGAAACTCCACTTTCTGCTCCGAGTGCAACGAGAAAG
IGT-427 CL1ドメイ ン		KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

【0087】

実施形態の説明

定義

特に明記しない限り、本明細書で使用される以下の用語及び語句は、以下の意味を有することが意図される。

【0088】

本明細書で使用される場合、「抗Tie2抗体」という用語は、Tie2に特異的に結合する抗体を意味し、Tie2に特異的に結合する完全な抗体に加えて、抗体分子の抗原結合断片を含む。いくつかの実施形態では、完全な抗体は、2つの完全長軽鎖及び2つの

50

完全長重鎖の構造を有し、各軽鎖はジスルフィド結合によって重鎖に接続されている。重鎖の定常領域は、ガンマ1 ($\gamma 1$)、ガンマ2 ($\gamma 2$)、ガンマ3 ($\gamma 3$)、ガンマ4 ($\gamma 4$)、アルファ1 ($\alpha 1$) 及びアルファ2 ($\alpha 2$) のサブクラスを有する、ガンマ (γ)、ミュー (μ)、アルファ (α)、デルタ (δ) 及びイプシロン (ϵ) 型を有する。軽鎖の定常領域は、カッパ (κ) 型及びラムダ (λ) 型を有する。

【0089】

「抗原結合断片」又は「抗体の抗体断片」は、抗原に結合することができる断片を意味し、F a b、F (a b')、F (a b')₂ 及び F v を含む。抗体断片のうち、F a b は、軽鎖及び重鎖の可変領域、軽鎖の定常領域並びに重鎖の第1の C H 1 の構造を有する1つの抗原結合部位を有する。

【0090】

F a b' は、C H 1 ドメインのC末端に1以上のシステイン残基を含むヒンジ領域を有するという点でF a bとは異なる。F (a b')₂ 抗体は、F a b' のヒンジ領域内のシステイン残基間でのジスルフィド結合形成によって産生される。F v は、重鎖の可変領域及び軽鎖の可変領域のみを有する最小の抗体断片である。二重鎖 F v (二本鎖 F v) は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間での非共有結合によって形成され、単鎖 F v (s c F v) は、一般に、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域との間で共有結合したペプチドリンカーを介して形成されるか、又は二重鎖 F v のような二量体様構造を形成することによってC末端において直接接続される。この断片は、タンパク質加水分解酵素によって得ることができ(例えば、パパインを使用した全抗体の制限消化によってF a bを得ることができ、ペプシンで切断することによってF (a b')₂ 断片を得ることができる。)、遺伝子操作技術によっても作製される。

【0091】

抗体は、例えば、F v 形態(例えば、s c F v)又は完全な抗体形態であり得る。さらに、重鎖の定常領域は、ガンマ (γ)、ミュー (μ)、アルファ (α)、デルタ (δ) 又はイプシロン (ϵ) の任意のアイソタイプから選択され得る。例えば、定常領域は、ガンマ1 (I g G 1)、ガンマ3 (I g G 3) 又はガンマ4 (I g G 4) である。軽鎖定常領域は、カッパ型又はラムダ型のものであり得る。

【0092】

抗体には、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖 F v (s c F v)、単鎖抗体、F a b 断片、F (a b') 断片、ジスルフィド結合 F v (s d F v) 及び抗イデオタイプ(抗 I d) 抗体、又は上記抗体のエピトープ結合断片などが含まれるが、これらに限定されない。

【0093】

「H C」の「重鎖」という用語は、抗原特異性を提供するために十分な可変領域を有するアミノ酸配列を有する、可変領域ドメイン V H 及び3つの定常領域ドメイン C H 1、C H 2 及び C H 3 を含む完全長重鎖又はその断片を意味する。さらに、本明細書で使用される場合、「軽鎖」又は「L C」は、抗原特異性を提供するために十分な可変領域を有するアミノ酸配列を有する、可変領域ドメイン V L 及び定常領域ドメイン C L を含む完全長軽鎖又はその断片を意味する。(例えば、ヒト I g G 1 の) 重鎖定常領域ドメインは、体内の免疫細胞上の F c 受容体との効率的な相互作用を低下させるか又は排除するために、1以上の修飾を含有することができる。(1又は複数の) このような変異は、F c 受容体へのその結合を抑制し、抗体誘導性細胞傷害を低下又は消失させることができる。このような修飾は、L₂₃₄L₂₃₅G₂₃₆G₂₃₇ 残基 (E U ナンバリング) を L A G A 変異、F E G G 変異、A A G G 変異、A A G A 変異、L A L A 変異又はそれらの組み合わせに変更することを含むことができる。いくつかの実施形態では、I g G 定常領域は、免疫細胞によって媒介される細胞傷害を低下又は消失させるために、(例えば、前述の変異のいずれかと組み合わせで) K₃₂₂ 及び P₃₃₁ (E U ナンバリング) に変異を含む。いくつかの実施形態では、I g G 定常領域は、免疫細胞によって媒介される細胞傷害を低下又は消失させるために、L A L A 変異並びに K₃₂₂ 及び P₃₃₁ における変異(例えば、K

10

20

30

40

50

3 2 2 A 及び P 3 3 1 S) (E U ナンバリング) を含む。

【0094】

「モノクローナル抗体」は、細胞又は細胞株の単一クローンによって産生され、同一の抗体分子からなる抗体である。モノクローナル抗体は、一価の親和性を有することができ、同じエピトープにのみ結合する。対照的に、ポリクローナル抗体は複数のエピトープに結合し、通常、いくつかの異なる抗体分泌形質細胞系統によって作製される。1つのモノクローナル抗体の標的を2つのエピトープに増加させることによって、二重特異性モノクローナル抗体を設計することもできる。

【0095】

「エピトープ」は、抗体が特異的に結合することができるタンパク質決定基（例えば、抗体によって認識される抗原の一部）を意味する。エピトープは、化学的に活性な表面分子、例えばアミノ酸又は糖側鎖の群であり得、一般に、特定の電荷特性及び特定の三次元構造特性を有する。

【0096】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体（ドナー又はソース抗体）由来の1以上のアミノ酸配列（例えば、6つのCDR配列などの1以上のCDR配列）と、非ヒト免疫グロブリンに由来する他の最小配列とを含むキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、その超可変領域が、レシピエントの超可変領域由来の残基の所望の特異性、親和性及び能力を有する、非ヒト霊長類、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類（受容体抗体）の超可変領域由来の残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリン（受容体抗体）である。ヒト化のために、フレームワークドメイン（FR）中の1以上の残基が、非ヒトドナー抗体の対応する残基によって置き換えられ得る。これは、（1又は複数の）移植されたCDRの適切な三次元立体配置を維持し、それによって親和性及び抗体安定性を改善するのに役立ち得る。ヒト化抗体は、例えば、代替的に又は追加的に、抗体のさらなる性能をさらに改良するために、元のレシピエント抗体又はドナー抗体には現れない新しい残基を含むことができる。

【0097】

重鎖及び／若しくは軽鎖の一部が特定の種に由来するか、又はサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一若しくは相同であるのに対して、（1又は複数の）残りの鎖は別の種に由来するか、又は他の抗体クラスに属するか、又はサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一である、所望の生物学的活性を示す任意の「キメラ」抗体（免疫グロブリン）及び上記抗体の断片が含まれる。

【0098】

本明細書で使用される「抗体可変ドメイン」は、相補性決定領域（CDR；例えば、CDR1、CDR2及びCDR3）及びフレームワーク領域（FR）を含むドメインを指す。VHは、重鎖の可変ドメインを指す。VLは、軽鎖の可変ドメインを指す。「フレームワーク領域」（FR）は、CDRの外側の可変ドメインセグメントである。各可変ドメインは、典型的には、FR1、FR2、FR3及びFR4として特定される4つのFRを有する。

【0099】

「相補性決定領域」（CDR；すなわち、CDR1、CDR2及びCDR3）は、抗原結合のために必要である、抗体の可変ドメインのアミノ酸残基を指す。各可変ドメインは、典型的には、CDR1、CDR2及びCDR3として特定される3つのCDR領域を含む。

【0100】

本明細書で使用される「半減期延長モジュレータ」は、抗体又は抗体断片の半減期を増加させるために抗体又は抗体断片に付加することができる化学物質、バイオポリマー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質断片を指す。半減期延長モジュレータは、PEG（ポリエチレングリコール）、ヒアルロン酸（HA）又はホスホリルコリンを含有するバイオポリマー；アルブミン；アルブミン結合ペプチド；又はHA結合タンパク質断片を含み

10

20

30

40

50

得る。

【0101】

半減期はまた、例えば、抗体又は抗体断片と新生児型Fc受容体(FcRn)媒介性再利用との相互作用を消失させることによって減少させ得る。例えば、複数の部位におけるコンビナトリアル変異は、抗体の半減期に影響を及ぼすことが知られている。いくつかの実施形態では、変異は、M252(例えば、M252Y)、I253(例えば、I253A、I253M又はI253V)、S254(例えば、S254T)、T256(例えば、T256D)、H310(例えば、H310A)、H433(例えば、H433K)、N434(例えば、N434F)及び／又はH435(例えば、H435A、H435Q又はH435R)(EUNANBARIING)を含む。いくつかの実施形態では、変異は、L235A、L236A及びH310A(EUNANBARIING)を含む。全身半減期の減少は、VEGF阻害の確立されたオンターゲット毒性問題(出血、高血圧など)のために最小の全身曝露及び減少した全身半減期が望まれる、眼疾患処置などの非全身性疾患処置に有利であり得る。

10

【0102】

本明細書で使用される場合、「又は」は、文脈が明らかに包括的な意味でないことを示さない限り、包括的な意味(すなわち、及び／又はに等しい)を有する。

【0103】

本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」は、複数の源からの配列を含む任意のポリペプチドを包含する。融合タンパク質は、例えば、遺伝子融合物(例えば、融合タンパク質の配列をコードするポリヌクレオチド)から、又は別々に生産若しくは合成されたポリペプチドを化学的に連結することによって生産され得る。

20

【0104】

「血管新生関連疾患」とも呼ばれる「血管新生疾患」は、血管新生の発生、又は血管新生の進行に関連する疾患を意味する。

【0105】

本明細書で使用される場合、「対象」はヒト又は動物であり得る。例えば、対象はヒトであり得る。いくつかの実施形態では、対象は哺乳動物であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、愛玩動物(「ペット」とも呼ばれる)を含み得る。「愛玩動物」という用語は、ペットとして、又はその他愛玩目的のために飼育され得る家畜化された動物を指し、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレット、ウマ、ロバ、ラバ及びハムスターが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、愛玩動物は、哺乳動物の愛玩動物である。

30

【0106】

本明細書で使用される「予防」という用語は、融合タンパク質又は組成物を投与することによって、目的の疾患を阻害する、その発症を遅延させる、又はその発生の可能性を低下させる任意の行為を表す。「処置」又は「治療」という用語は、目的の疾患の症候を軽減する、遅延させる、若しくは緩和するか、又は目的の疾患を治癒する、目的の疾患の重症度を低下させる、若しくは目的の疾患の進行を遅延させる任意の行為を示す。

【0107】

本開示は、それぞれ所与の核酸配列又はアミノ酸配列(参照配列)に対してある程度の同一性を有する核酸配列及びアミノ酸配列を記載する。

40

【0108】

2つの核酸配列間の「配列同一性」は、それらの配列間で同一であるヌクレオチドのパーセンテージを示す。2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」は、それらの配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。

【0109】

「%同一の」、「%同一性」という用語又は類似の用語は、特に、比較されるべき配列間での最適なアラインメントにおいて同一であるヌクレオチド又はアミノ酸のパーセンテージを指すことが意図される。前記パーセンテージは純粋に統計的であり、2つの配列間

50

での差は、比較されるべき配列の全長にわたってランダムに分布し得るが、必ずしも比較されるべき配列の長さ全体にわたってランダムに分布するとは限らない。2つの配列の比較は、通常、対応する配列の局所領域を特定するために、最適なアラインメント後に、セグメント又は「比較のウィンドウ」に関して前記配列を比較することによって行われる。比較のための最適なアラインメントは、手作業で、又はSmith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482による局所的相動性アルゴリズムの助けを借りて、Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443による局所的相動性アルゴリズムの助けを借りて、Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2444による類似性検索アルゴリズムの助けを借りて、又は前記アルゴリズムを使用するコンピュータプログラム(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 サイエンスドライブ、マジソン、ウィスコンシン州のGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA)の助けを借りて実施され得る。

10

【0110】

パーセンテージ同一性は、比較されるべき配列が一致する同一の位置の数を決定し、この数を比較される位置の数(例えば、参照配列中の位置の数)で割り、この結果に100を掛けることによって得られる。

【0111】

いくつかの実施形態では、同一性の程度は、参照配列の全長の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%又は約100%である領域に対して与えられる。例えば、参照核酸配列が200ヌクレオチドからなる場合、同一性の程度は、いくつかの実施形態では連続ヌクレオチド中の少なくとも約100、少なくとも約120、少なくとも約140、少なくとも約160、少なくとも約180又は約200ヌクレオチドに対して与えられる。いくつかの実施形態では、同一性の程度は、参照配列の全長に対して与えられる。

20

【0112】

それぞれ所与の核酸配列又はアミノ酸配列に対して特定の程度の同一性を有する核酸配列又はアミノ酸配列は、前記所与の配列の少なくとも1つの機能的特性を有し得、例えば、いくつかの例では、前記所与の配列と機能的に等価である。1つの重要な特性には、特に対象に投与された場合にサイトカインとして作用する能力が含まれる。いくつかの実施形態では、所与の核酸配列又はアミノ酸配列に対して特定の程度の同一性を有する核酸配列又はアミノ酸配列は、前記所与の配列と機能的に等価である。

30

【0113】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、記載された主題の特性に実質的に影響を及ぼさない、例えば10%、5%、2%又は1%以内の変動の程度を示す。したがって、反対のことが示されていない限り、以下の明細書及び添付の特許請求の範囲に記載されている数値パラメータは、得ることが求められる所望の特性に応じて変動し得る近似値である。少なくとも、及び特許請求の範囲に対する均等論の適用を制限する試みとしてではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数に照らして、及び通常の丸め技法を適用することによって少なくとも解釈されるべきである。

40

【0114】

概要

Tie 2及びVEGFの両方に特異的に結合する融合タンパク質が本明細書において提供される。融合タンパク質は、Tie 2及びVEGFの現在の治療の制限並びに血管新生疾患又は血管疾患のための他の現在利用可能な治療の制限の両方に対処するように設計された。その結果、抗Tie 2抗体又はその抗原結合断片と血管内皮増殖因子(VEGF)結合ドメインとを含む融合タンパク質が提供される。これらの融合タンパク質は、VEGF阻害及びTie 2活性化という二重の機能の故に、血管新生疾患又は血管疾患のための治療剤として有益な役割を果たすことができる。

50

【0115】

融合タンパク質

本開示は、T i e 2 抗体又はその抗原結合断片とV E G F 結合ドメインとを含む融合タンパク質に関する。いくつかの実施形態では、T i e 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号2の配列を含むT i e 2 I g 3 - F N I I I (1-3)ドメインに結合する。

【0116】

いくつかの実施形態では、T i e 2 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号5～7のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、C D R 2及びC D R 3を含む重鎖可変領域と、配列番号8～10のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、C D R 2及びC D R 3を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0117】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2、3又は4を含むT i e 2 I g 3 - F N I I I (1-3)ドメイン及びV E G Fに結合する。

【0118】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、血管内皮増殖因子(V E G F)結合ドメインであって、前記V E G F結合ドメインは、配列番号13のV E G F受容体1(V E G F R 1)の血管内皮増殖因子(V E G F)-A結合領域及び配列番号14のV E G F受容体2(V E G F R 2)の血管内皮増殖因子(V E G F)-A結合領域を含む、血管内皮増殖因子(V E G F)結合ドメインと、抗T i e 2抗体又はその抗体結合断片とを含み、前記融合タンパク質は、配列番号2、3又は4を含むT i e 2 I g 3 - F N I I I (1-3)ドメイン及びV E G Fに結合する。

【0119】

いくつかの実施形態では、V E G F結合ドメインは、抗V E G F抗体又はその抗体結合断片を含む。さらなる実施形態では、抗V E G F抗体又はその断片は、ペバシズマブ、ラニビズマブ又はH u M a b G 6 - 3 1 (米国特許出願公開第2007/0141065号)の可変結合ドメインを含む。

【0120】

一実施形態では、V E G F結合ドメインは、抗T i e 2抗体又はその抗原結合断片の重鎖(H C)のC末端に連結されている。

【0121】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有するT i e 2のアミノ酸633～644(配列番号20)及び／又はアミノ酸713～726(配列番号21)を結合する。一実施形態では、抗T i e 2抗体又はその抗体結合断片は、配列番号1のアミノ酸配列のT i e 2のアミノ酸633～644(配列番号19)及び／又はアミノ酸713～726(配列番号20)を結合する。

【0122】

一実施形態では、抗T i e 2抗体はI g G 1アイソタイプを有する。

【0123】

一実施形態では、V E G F結合ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、V E G F結合ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列を含む。

【0124】

一実施形態では、融合タンパク質は4つのポリペプチド鎖を含み、2つの鎖は一对の重鎖であり、2つの鎖は一对の軽鎖である。適切には、重鎖は、配列番号2、3又は4を含むT i e 2 I g 3 - F N I I I (1-3)ドメインに結合するT i e 2結合ドメインをN末端に含み、V E G F結合ドメインをC末端に含み。適切には、T i e 2結合ドメインは抗T i e 2抗体であり、融合タンパク質の重鎖の対は抗体の重鎖を含み、融合タンパク質の軽鎖の対は抗体の軽鎖を含む。

【0125】

10

20

30

40

50

一実施形態では、融合タンパク質は、

a. 第1及び第2の重鎖単量体の二量体であって、各重鎖単量体は、N末端からC末端へ、

i. i i. の定常重鎖ドメイン (CH) に連結された、軽鎖可変ドメインと一緒に T i e 2 を結合する重鎖可変ドメイン (VH) ドメインと、

i i. i i i. の V E G F 結合ドメインに連結された、C H 1 ドメイン及び F c 領域又はその断片を含む定常重鎖ドメイン (CH) と、

i i i. V E G F 受容体細胞外ドメインを含む V E G F 結合ドメイン (V E G F 受容体 1 (V E G F R 1) 及び V E G F 受容体 2 (V E G F R 2) の V E G F - A 結合領域など) と

を含む一本鎖ポリペプチドを含む、第1及び第2の重鎖単量体の二量体と；

b. 第1及び第2の軽鎖単量体であって、各軽鎖単量体は、N末端からC末端へ、定常軽鎖ドメイン (CL 1) に連結された、VHと一緒に T i e 2 を結合する軽鎖可変ドメイン (VL) を含む、第1及び第2の軽鎖単量体と；

を含み、

前記第1及び第2の単量体は、それらの F c 領域又はその断片を介して二量体化し；

前記 T i e 2 結合ドメインは、各重鎖単量体の前記 VH 及び C H 1 が前記軽鎖単量体の前記 VL 及び C L 1 ドメインと対を形成するように、各重鎖単量体と前記軽鎖単量体の 1 つとの対形成によって形成される。

【0126】

一実施形態では、融合タンパク質は、V E G F 受容体と抗 T i e 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含む。さらなる実施形態では、リンカーは、5 ~ 50 残基、例えば 10 ~ 40 残基、例えば 15 ~ 30 残基、例えば 20 残基を含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、V E G F 結合ドメインと抗 T i e 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、リンカーは、配列番号 16 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号 16 の配列を含む。

【0128】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、V E G F 受容体と抗 T i e 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、リンカーは、配列番号 25 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号 25 の配列を含む。

【0129】

一実施形態では、融合タンパク質は、抗 T i e 2 抗体又はその抗原結合断片の 1 以上の重鎖定常ドメインの C 末端側に及び N 末端から C 末端への順序で、V E G F 結合ドメインと抗 T i e 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、例えばリンカーは、5 ~ 50 アミノ酸残基、例えば 10 ~ 40 残基、例えば 15 ~ 30 残基、例えば 20 残基を有する配列を含む。

【0130】

一実施形態では、融合タンパク質は、抗 T i e 2 抗体又はその抗原結合断片の 1 以上の重鎖定常ドメインの C 末端側に及び N 末端から C 末端への順序で、V E G F 結合ドメインと抗 T i e 2 抗体又はその抗体断片との間にリンカーを含み、リンカーは、配列番号 16 又は 25 のアミノ酸配列を含み、V E G F 結合ドメインは配列番号 15 のアミノ酸配列を含む。

【0131】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む C H ドメインと、V E G F 結合ドメインと抗 T i e 2 抗体又はその抗体断片との間に配列番号 16 又は

10

20

30

40

50

25のアミノ酸配列を含むリンカーを含み、VEGF結合ドメインは配列番号15のアミノ酸配列を含む。

【0132】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0133】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号11のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を含む重鎖を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

10

【0134】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号26のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を含む重鎖を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0135】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号12のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を含む軽鎖を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

20

【0136】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号17のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する配列を含むCHドメインを含む。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号17のアミノ酸配列を含むCHドメインを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、体定常領域ドメインにおいて他の免疫細胞上のFc受容体との効率的な相互作用を低下させるか又は排除するために、重鎖中の定常領域ドメインに1以上の修飾又は変異を含む。いくつかの実施形態では、1以上の修飾又は変異は、L234L235G236G237(EUナンバリング)をLAGA変異、FEGG変異、AAGG変異、AAGA変異、LALA変異又はそれらの組み合わせに変化させることを含む。いくつかの実施形態では、IgG定常領域は、免疫細胞によって媒介される細胞傷害を低下及び消失させるために、前述の変異のいずれか(例えば、LALA変異)並びにK322及びP331(EUナンバリング)における変異を含む。

30

【0137】

Tie2抗体は、一価又は二価であり、一本鎖又は二本鎖を含有する。機能的には、結合親和性又は解離定数(K_D)は、系平衡状態においてタンパク質上のリガンド結合部位の半分が占有される、リガンドのモル(M)濃度である。解離定数(K_D)は、解離速度(K_{off})値を会合速度(K_{on})値で割ることにより算出される。解離定数の文脈では、より低い値はより強い結合と一致する。Tie2抗体の K_D は、 $10^{-5}M \sim 10^{-12}M$ の範囲内である。例えば、Tie2抗体の結合親和性(K_D)は、 $10^{-6}M \sim 10^{-12}M$ 、 $10^{-7}M \sim 10^{-12}M$ 、 $10^{-8}M \sim 10^{-12}M$ 、 $10^{-9}M \sim 10^{-12}M$ 、 $10^{-5}M \sim 10^{-11}M$ 、 $10^{-6}M \sim 10^{-11}M$ 、 $10^{-7}M \sim 10^{-11}M$ 、 $10^{-8}M \sim 10^{-11}M$ 、 $10^{-9}M \sim 10^{-11}M$ 、 $10^{-10}M \sim 10^{-11}M$ 、 $10^{-5}M \sim 10^{-10}M$ 、 $10^{-6}M \sim 10^{-10}M$ 、 $10^{-7}M \sim 10^{-10}M$ 、 $10^{-8}M \sim 10^{-10}M$ 、 $10^{-9}M \sim 10^{-10}M$ 、 $10^{-5}M \sim 10^{-9}M$ 、 $10^{-6}M \sim 10^{-9}M$ 、 $10^{-7}M \sim 10^{-9}M$ 、 $10^{-8}M \sim 10^{-9}M$ 、 $10^{-5}M \sim 10^{-8}M$ 、 $10^{-6}M \sim 10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M \sim 10^{-8}M$ 、 $10^{-5}M \sim 10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M \sim 10^{-7}M$ 又は $10^{-5}M \sim 10^{-6}M$ である。

40

【0138】

50

本明細書に記載の例示的な融合タンパク質である I G T - 4 2 7 は、同時に、V E G F シグナル伝達を抑制し、T i e 2 シグナル伝達経路を活性化する。I G T - 4 2 7 は、細胞表面相互作用と同様に、二価の相互作用において 1 n M 未満の K_D でヒト T i e - 2 を結合し、1 0 p M 未満の K_D でヒト V E G F を結合する。表面上の V E G F とは、I G T - 4 2 7 は、5 0 0 p M 未満の見かけの親和性で結合する。表面上の I G T - 4 2 7 とは、 K_D は 1 0 p M 未満である。I G T - 4 2 7 は、ウサギオルソログに対して同等の高い親和性を示す。

【0139】

一実施形態では、融合タンパク質は、 $3 E^{-9} M$ （ここで、 E^{-X} は負の指数及びゼロの数を表し、例えば $3 E^{-9}$ は、. 0 0 0 0 0 0 0 0 0 3 と同じである。）未満、 $3.5 E^{-9} M$ 未満、 $4 E^{-10} M$ 未満、又はそれ未満の親和性 K_D (M) で、配列番号 2、3 又は 4 を含む T i e 2 I g 3 - F N I I I (1 - 3) ドメインに結合する。所与の量より未満の K_D 値は、その K_D が所与の量より数値的に小さいことを意味し、これはより強い結合を示す。

10

【0140】

I G T - 4 2 7 は、V E G F のみを阻害する薬剤と比較して優れた有効性を提供する、及び／又は A n g 2 阻害剤と比較してより強力な T i e - 2 アゴニスト活性を有する可能性を有する。

【0141】

融合タンパク質中の T i e 2 抗体又は抗体断片は、T i e 2 を特異的に認識することができる範囲内でその生物学的等価物を含むことができる。例えば、融合タンパク質中の T i e 2 抗体又は抗体断片は、抗体の結合親和性及び／又はその他の生物学的特性をさらに改善するために、アミノ酸配列への変化を含むことができる。そのような修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列残基の欠失、挿入及び／又は置換が含まれ得る。これらのアミノ酸変動は、保存的置換を提供するために、アミノ酸側鎖の疎水性、親水性、電荷、サイズなどのアミノ酸置換基の相対的類似性に基づいて行われ得る。アミノ酸側鎖置換基のサイズ、形状及び種類の分析により、アルギニン、リジン及びヒスチジンはすべて正に帯電した残基であり、アラニン、グリシン及びセリンは同様のサイズを有し、フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンは類似の形状を有することが知られている。したがって、これらの考察に基づいて、アルギニン、リジン及びヒスチジンアラニン、グリシン及びセリン；並びにフェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンは保存的置換であると言うことができる。

20

30

【0142】

生物学的に等価な活性を有する上記の変動を考慮して、いくつかの実施形態では、融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 5 ~ 1 0 中の 6 つの C D R の配列、並びに／又は配列番号 1 1 及び 1 2 の重鎖及び軽鎖、又は実質的な同一性を示す任意の配列を含む。実質的な同一性は、少なくとも 8 0 % の同一性、例えば少なくとも 8 5 % の同一性、9 0 % の同一性、9 5 % の同一性、9 6 % 以上、9 7 % 以上、9 8 % 以上、又は 9 9 % 以上の配列同一性を意味する。

【0143】

これに基づいて、融合タンパク質又はその構成要素は、本明細書に記載されている指定された又はすべての配列と比較した場合、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又はそれを超える同一性を有し得る。

40

【0144】

一実施形態では、融合タンパク質はペグ化されている。一実施形態では、融合タンパク質は、半減期延長モジュレータ、例えば P E G、ヒアルロン酸又はホスホリルコリンで修飾されている。一実施形態では、融合タンパク質は、部位特異的にペグ化されている。一実施形態では、融合タンパク質は、システイン残基上で部位特異的にペグ化されている。一実施形態では、融合タンパク質は、P E G、ヒアルロン酸又はホスホリルコリンを含み

50

得る半減期延長モジュレータで部位特異的に（例えば、システイン残基上で）修飾されている。あるいは、半減期延長モジュレータはアルブミン、アルブミン結合ペプチド及び／又はH A結合タンパク質断片を含み得る。

【0145】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号22の配列をさらに含み、配列番号22の配列のシステイン残基上で、本明細書に記載されている半減期延長モジュレータのいずれかで部位特異的に修飾（例えば、ペグ化）されている。一実施形態では、配列番号22の配列は、重鎖のC末端に存在する。一実施形態では、重鎖は、配列番号23の配列を含む。一実施形態では、重鎖は、配列番号24の配列を含む。

【0146】

一実施形態では、PEGは約40kDaの分子量を有する。

【0147】

一実施形態では、本発明の融合タンパク質の鎖状単量体を含むポリペプチドが提供される。

【0148】

一実施形態では、ポリペプチドは、本発明の融合タンパク質の重鎖単量体を含む。さらなる実施形態では、ポリペプチドは、配列番号11又は26の配列に対して少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも75%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、例えば少なくとも85%の同一性、例えば少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも91%の同一性、例えば少なくとも92%の同一性、例えば少なくとも93%の同一性、例えば少なくとも94%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、例えば少なくとも97%の同一性、例えば少なくとも98%の同一性、例えば少なくとも99%の同一性、例えば100%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号11の配列からなる。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26の配列からなる。

【0149】

一実施形態では、ポリペプチドは、本発明の融合タンパク質の軽鎖単量体を含む。さらなる実施形態では、ポリペプチドは、配列番号12に対して少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも75%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、例えば少なくとも85%の同一性、例えば少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも91%の同一性、例えば少なくとも92%の同一性、例えば少なくとも93%の同一性、例えば少なくとも94%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、例えば少なくとも97%の同一性、例えば少なくとも98%の同一性、例えば少なくとも99%の同一性、例えば100%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号12の配列からなる。

【0150】

ポリヌクレオチド；製造方法；ベクター及び宿主細胞

別の態様では、本開示は、融合タンパク質をコードする核酸に関する。

【0151】

別の実施形態では、本開示は、本発明の融合タンパク質の鎖状単量体を含むポリペプチドをコードする核酸を提供する。一実施形態では、本開示は、融合タンパク質の重鎖をコードする核酸を提供する。別の実施形態では、本開示は、融合タンパク質の軽鎖をコードする核酸を提供する。

【0152】

一実施形態では、核酸分子は、配列番号27又は29に対して少なくとも70%の同一性、例えば少なくとも75%の同一性、例えば少なくとも80%の同一性、例えば少なくとも85%の同一性、例えば少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも91%の同一性、例えば少なくとも92%の同一性、例えば少なくとも93%の同一性、例えば少なくとも94%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性、例えば少なくとも96%の同一性、例えば少なくとも97%の同一性、例えば少なくとも98%の同一性、例えば少なく

10

20

30

40

50

とも 99% の同一性、例えば 100% の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 27 又は 29 からなる。

【0153】

一実施形態では、核酸分子は、配列番号 28 に対して少なくとも 70% の同一性、例えば少なくとも 75% の同一性、例えば少なくとも 80% の同一性、例えば少なくとも 85% の同一性、例えば少なくとも 90% の同一性、例えば少なくとも 91% の同一性、例えば少なくとも 92% の同一性、例えば少なくとも 93% の同一性、例えば少なくとも 94% の同一性、例えば少なくとも 95% の同一性、例えば少なくとも 96% の同一性、例えば少なくとも 97% の同一性、例えば少なくとも 98% の同一性、例えば少なくとも 99% の同一性、例えば 100% の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 28 からなる。

10

【0154】

一実施形態では、本開示は、各ポリヌクレオチドが本発明の融合タンパク質の単量体鎖の少なくとも 1 つをコードする、1 以上のポリヌクレオチドのセットを提供し、前記融合タンパク質のこのような両方の鎖（すなわち、軽鎖及び重鎖）がコードされる。

【0155】

融合タンパク質は、融合タンパク質をコードする核酸を構築又は単離することによって組換え的に生産され得る。核酸を単離し、それを複製可能なベクターに挿入することによるさらなるクローニング（DNA 増幅）を行ってもよく、又はさらなる発現を行ってもよい。これに基づいて、本開示は、別の態様において、核酸を含有するベクターに関する。

20

【0156】

いくつかの実施形態では、本開示は、融合タンパク質を含む核酸に関する。「核酸」は、DNA（gDNA 及び cDNA）及び RNA 分子を包括的に包含するものとし、核酸の基本構造単位であるヌクレオチドは、天然のヌクレオチド及び修飾された糖又は塩基部分を有する類似体を含む。重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする核酸の配列は、修飾され得る。修飾には、ヌクレオチドの付加、欠失、又は非保存的若しくは保存的置換が含まれる。

【0157】

融合タンパク質をコードする DNA は、従来のプロセスを用いて（例えば、重鎖及び軽鎖をコードする DNA に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に分離又は合成される。多くのベクターが利用可能である。ベクター構成要素は、一般に、以下のもの：シグナル配列、複製起点、1 以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター及び転写終結配列のうちの 1 以上を含むが、これらに限定されない。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、本開示は、融合タンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。別の実施形態では、融合タンパク質の 1 つの重鎖配列及び 1 つの軽鎖配列をコードする核酸を含むベクターが提供される。

【0159】

一実施形態では、融合タンパク質の両方の鎖（すなわち、軽鎖及び重鎖）がベクターの前記セットにおいてコードされるように、本発明の 1 以上のポリヌクレオチドのセットを集団的に含む 1 以上のベクターのセットが提供される。

40

【0160】

一実施形態では、ベクターは、動物ウイルス、例えば逆転写酵素ウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、水痘ウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス及びパポバウイルスから選択されるウイルスである。

【0161】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、ヒトサイトメガロウイルス IE1（CMV-IE1）プロモーター／エンハンサーなどのプロモーター／エンハンサーをさらに含む

50

。

【0162】

本明細書で使用される場合、宿主細胞において目的の遺伝子を発現させるための手段としての、「ベクター」という用語は、プラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターを含む。ベクター中の抗体をコードする核酸は、プロモーターに動作可能に連結されている。

【0163】

本明細書で使用される場合、「動作可能に連結された」又は「連結された」という用語は、核酸発現制御配列（例えば、プロモーター、シグナル配列又は転写調節因子結合部位のアレイ）と異なる核酸配列との間での機能的な連結を意味し、それにより、制御配列は他の核酸配列の転写及び／又は翻訳を制御する。

10

【0164】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞が本明細書で提供される。宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。宿主細胞は、単離されてもよく、例えば、培養されてもよく、又は多細胞生物の一部でなくともよい。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、細胞株のメンバーである。いくつかの実施形態では、宿主細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、不死化された哺乳動物細胞である。

20

【0165】

宿主としての原核細胞の場合、転写を処理することができる強力なプロモーター（例えば、*tac*プロモーター、*lac*プロモーター、*lacUV5*プロモーター、*lpp*プロモーター、*pL λ* プロモーター、*pR λ* プロモーター、*rac5*プロモーター、*amp*プロモーター、*recA*プロモーター、*SP6*プロモーター、*trp*プロモーター及び*T7*プロモーターなど）、翻訳の開始のためのリボソーム結合部位及び転写／翻訳終結配列が一般に含まれる。さらに、例えば宿主としての真核細胞の場合、哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例：メタロチオニンプロモーター、 β -アクチンプロモーター、ヒトヘモグロビンプロモーター及びヒト筋肉クレアチンプロモーター）又は哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例：アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5 Kプロモーター、SV40プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、HSVの*tk*プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）プロモーター、HIVの*LTR*プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、エプスタインバーウイルス（EBV）プロモーター及びラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター）を用いることができ、一般的には、転写終結配列としてポリアデニル化配列を含めることができる。

30

【0166】

いくつかの事例では、ベクターは、発現された抗体の精製を容易にするために他の配列と融合され得る。融合される配列は、例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（*Pharmacia*、米国）、マルトース結合タンパク質（*NEB*、米国）、*FLAG*（*IBI*、米国）及び6×*His*（ヘキサヒスチジン；*Qiagen*、米国）である。

40

【0167】

ベクターは、選択マーカーとして当技術分野で一般的に使用される抗生物質耐性遺伝子、例えばアンピシリン、ゲンタマイシン、カルベニシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、カナマイシン、ジェネティシン、ネオマイシン及びテトラサイクリンに対する耐性遺伝子を含む。

【0168】

別の態様では、本開示は、上記発現ベクターで形質転換された細胞に関する。抗体を生産するために使用される細胞は、原核生物、酵母及び高等真核生物の細胞であり得るが、これらに限定されない。

50

【0169】

大腸菌 (*Escherichia coli*)、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*) 及びバチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) などのバチルス (*Bacillus*) 株、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) (例えば、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*))、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) 及びスタフィロコカス (*Staphylococcus*) (例えば、スタフィロコカス・カルノーサス (*Staphylococcus carnosus*)) などの原核宿主細胞を使用することができる。

【0170】

例示的な有用な動物宿主細胞株は、COS-7、BHK、CHO、CHOK1、DXB-11、DG-44、CHO/DHFR、CV1、COS-7、HEK293、BHK、TM4、VERO、HELA、MDCK、BRL 3A、W138、Hep G2、SK-Hep、MMT、TRI、MRC 5、FS4、3T3、RIN、A549、PC12、K562、PER.C6、SP2/0、NS-0、U2OS又はHT1080であるが、これらに限定されない。

【0171】

一実施形態では、本開示は、Tie2及びVEGFを結合する融合タンパク質を製造する方法であって、融合タンパク質をコードする、発現ベクターなどの核酸を含む(例えば、融合タンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターで形質転換された)細胞を培養する工程と、前記培養された細胞から融合タンパク質を回収する工程とを含む、方法を提供する。

【0172】

細胞は、様々な培地中で培養され得る。任意の市販の培養培地を制限なく使用することができる。当業者に公知のすべての他の必須サプリメントは、適切な濃度で含まれ得る。温度、pHなどの培養条件、及び選択される宿主細胞は、当業者に公知である。

【0173】

抗体又はその抗原結合断片の回収は、例えば遠心分離又は限外濾過を用いて、及び例えばアフィニティークロマトグラフィーなどを用いて不純物を除去することによって行うことができる。アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどのさらなる追加の精製技術を使用することができる。

【0174】

融合タンパク質の使用；治療

別の態様では、本開示は、有効量の融合タンパク質を投与することによって血管新生疾患又は血管疾患を予防又は処置するための方法及び組成物に関する。他の態様では、本実施形態は、血管新生、内皮シグナル伝達、炎症及び／又は血管漏出を調節することを必要とする対象に融合タンパク質を投与することによって、血管新生、内皮シグナル伝達、炎症及び／又は血管漏出を調節するための方法及び組成物に関する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている融合タンパク質は、治療において使用するためのものである。

【0175】

血管新生は、既存の血管からの新しい血管の形成又は成長を意味する。血管新生疾患又は血管新生関連疾患の例には、癌、転移、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、未熟児網膜症、角膜移植片拒絶反応、黄斑変性、血管新生緑内障などの緑内障、全身性紅皮症、増殖性網膜症、乾癬、血友病性関節症、アテローム性プラークにおける毛細血管形成、ケロイド、創傷肉芽形成、血管接着、関節リウマチ、変形性骨関節炎、自己免疫疾患、クローン病、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、腸管癒着、ネコ引っ掻き病、潰瘍、肝硬変、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病、炎症性疾患及び神経変性疾患が含まれるが、これらに限定されない。さらに、例示的な癌には、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉

10

20

30

40

50

頭癌、肺癌、結腸癌、乳癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、膵臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳癌、甲状腺癌、白血病、ホジキンリンパ腫、リンパ腫及び多発性骨髄性血液癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0176】

融合タンパク質は、血管新生、内皮シグナル伝達、炎症及び／又は血管漏出を調節するために投与され得る。例えば、融合タンパク質は、血管内皮細胞膜の完全性を増加させ、及び／又は血管漏出を低下させるために投与され得る。血管漏出は、糖尿病性黄斑浮腫（DME）、糖尿病性網膜症（DR）及び加齢黄斑変性（AMD）を含むがこれらに限定されないいくつかの一般的な眼障害における視覚障害の一因であることが知られている。いくつかの実施形態では、炎症は、敗血症、呼吸促迫症候群及び／又はウイルス感染性疾患に由来する。

10

【0177】

融合タンパク質及びその組成物は、ラット、マウス、家畜、愛玩動物、ヒトなどを含む哺乳動物に投与され得る。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物の愛玩動物などの愛玩動物である。いくつかの実施形態では、愛玩動物は、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレット、ウマ、ラバ、ロバ又はハムスターである。融合タンパク質又はその組成物は、毎日投与され得る。融合タンパク質又はその組成物は、1、2、3、4、6又は12ヶ月ごとに1回投与され得る。一実施形態では、融合タンパク質は、6ヶ月に1回（すなわち、1年に2回）投与される。投与は、典型的に受け入れられた経路、例えば、経口、直腸、硝子体内、静脈内、皮下、子宮内、又は脳血管内投与によるものである。いくつかの実施形態では、投与は硝子体内注射によるものである。一実施形態では、1mg～10mgの融合タンパク質が、毎日、毎月又は6ヶ月ごとに硝子体内注射によって投与される。一実施形態では、10mg未満の融合タンパク質が、6ヶ月ごとに約1回（例えば、1年に2回）の硝子体内注射によって投与される。

20

【0178】

薬学的組成物；投与

いくつかの実施形態では、融合タンパク質を含む組成物は薬学的組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、当分野で典型的に使用される適切なビヒクル、賦形剤又は希釈剤を含む。

【0179】

適切なビヒクル、賦形剤、希釈剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A. R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, Pa. 1995に記載されている。適切な薬学的に許容され得るビヒクル、賦形剤又は希釈剤としては、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、ヒスチジン、グリセロール、スクロース、ポリソルベート、エタノールなどの1以上、及びそれらの組み合わせが挙げられる。溶液のpHは、好ましくは約5～約8、より好ましくは約6～約7である。例えば、投与経路及び濃度に応じて、ある種の担体がより好ましい場合があることは、当業者には明らかであろう。

30

【0180】

薬学的に許容され得るビヒクルを有する薬学的組成物は、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、経口溶液、エマルジョン、シロップ、無菌水溶液、非水溶液、懸濁剤、凍結乾燥物及び坐剤などの様々な経口又は非経口剤形であり得る。薬学的組成物は、充填剤、増粘剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの、組み合わせで調合され得る希釈剤又は賦形剤を含むことができる。経口投与用の固体調製物は、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤などの形態であり得る。結束との関連で、化合物は、デンプン、炭酸カルシウム、スクロース、ラクトース又はゼラチンなどの1以上の賦形剤を組み合わせることによって製剤化され得る。単純な賦形剤及びステアリン酸マグネシウム、タルクなどの潤滑剤がさらに使用され得る。

40

【0181】

50

経口投与用液体調製物は、懸濁液、経口溶液、エマルジョン、シロップなどであり得る。賦形剤、例えば水又は湿潤パラフィンのような単純な希釈剤、様々な湿潤剤、甘味料、芳香剤、防腐剤などを液体製剤中に含めることができる。さらに、薬学的組成物は、無菌水溶液、非水性溶媒、懸濁液、エマルジョン、凍結乾燥物、坐剤などの非経口剤形であり得る。注射可能なプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油及びオレイン酸エチルなどのエステルは、不溶性溶媒及び懸濁液に適し得る。坐剤の基本物質としては、ウイテプゾール、マクロゴール、T w e e n 61、カカオバター、ラウリンバター、グリセロゼラチンが挙げられる。

【0182】

組成物は、薬学的有効量で投与される。「薬学的有効量」などの本明細書で使用される用語は、すべての医学的処置に適用可能であり得る適切な利益／リスク比を有する、疾患処置のための薬学的組成物の十分な量を指す。有効量は、疾患の重症度、患者／患者の年齢及び性別、疾患の種類、薬物活性、薬物感受性、投与時間、投与経路、分泌速度、処置の期間及び他の要因などのパラメータを含む様々な要因に応じて異なり得る。また、上記組成物は、単一用量で投与され得るか、又は複数用量に分割され得る。これらの要因を十分に考慮すると、副作用なしで最大の効果を得るのに十分な最小量を投与することが重要である。薬学的組成物の投与量は、特に限定されないが、患者／患者の健康状態及び体重、疾患の重症度、薬物の種類、投与経路及び投与時間を含む種々の要因に応じて変動する。

10

【0183】

組成物は、典型的に受け入れられた経路、例えば、経口、直腸、静脈内、皮下、子宮内、硝子体内又は脳血管内を介して、1日に1回又は複数回、ラット、マウス、家畜、愛玩動物、ヒトなどを含む哺乳動物に投与され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、硝子体内注射によって投与される。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物の愛玩動物などの愛玩動物である。いくつかの実施形態では、愛玩動物は、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレット、ウマ、ラバ、ロバ、ハムスター又はその他の家畜化されたペットである。

20

【0184】

他の観点での本開示は、抗体又は上記組成物を必要とする個体中に投与するための工程を含む、血管新生疾患又は血管疾患のための予防又は処置方法、及び抗血管新生方法に言

30

【0185】

融合タンパク質は、薬学的組成物で提供され得る。

【0186】

本開示の方法は、血管新生の阻害を必要とする個体に対して薬学的有効用量の薬学的組成物を投与するための手順を含む。個体は、イヌ、ネコ、フェレット、ウシ、ウマ、ウサギ、マウス、ラット又はヒトなどの哺乳動物であり得るが、これらに限定されない。例えば、一実施形態では、個体は、ニワトリ、シチメンチョウ又はその他の非哺乳動物であり得る。薬学的組成物は、非経口、皮下、腹腔内、肺内又は鼻腔内、及び必要に応じて局所処置のための病変内を含む適切な方法で投与され得る。いくつかの実施形態では、薬学的組成物の投与量は、個体の健康状態及び体重、疾患の重症度、薬物の種類、投与経路及び投与時間を含むがこれらに限定されない様々な要因に応じて変化し、当業者によって容易に決定され得る。

40

【0187】

他の態様では、本開示は、抗体及び抗体を含む癌の予防又は処置のための組成物又は薬学的組成物を必要とする個体への組成物又は抗体の投与手順を含む、癌の予防又は処置の方法に言及する。

【0188】

癌は、本開示の抗体で処置可能である限り、限定されない。具体的には、抗体は、血管新生を阻害することにより、癌の発生又は進行を予防することができる。癌の例には、食

50

道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、肺癌、結腸癌、乳癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、脾臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳癌、甲状腺癌、白血病、ホジキンリンパ腫、リンパ腫及び多発性骨髄性癌血液癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0189】

別段の定義がなければ、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、当業者によって理解されるものと同じ意味を有する。

【0190】

[実施例]

以下の実施例は、単に本発明を例示することを意図しており、本発明を限定するように構成されていない。

【0191】

[実施例1]

融合タンパク質の調製

A. 構築物の設計

VEGF受容体1 (VEGFR1) 及びVEGF受容体2 (VEGFR2) のVEGF-A結合領域が抗Tie2抗体の重鎖 (HC) のC末端に融合された融合タンパク質、IGT-427を設計した。構築物を、ヒトサイトメガロウイルスIE1 (CMV-IE1) プロモーター／エンハンサーを含有するタンパク質発現ベクターにした。重鎖 (HC) 及び軽鎖 (LC) のアミノ酸配列が、上記の表1に示されている。

【0192】

B. IGT-427の発現及び精製

製造者の説明書 (Gibco) に基づいて、IGT-427をコードするプラスミドDNAをExp CHO-S細胞に一過性に同時トランスフェクトした。等量の重鎖及び軽鎖DNAを使用した。次いで、Max力価プロトコルのために、振盪しながら空気中5% CO₂の加湿雰囲気中で、32℃で、トランスフェクトされた細胞をインキュベートした。12日間のインキュベーション後、分泌された融合タンパク質を含有する培養培地を回収し、遠心分離して細胞を除去し、培養上清を回収し、濾過した。結合／洗浄緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.2 及び150 mM NaCl) 及び溶出緩衝液 (25 mM 酢酸ナトリウム、pH 3.3) 中で、HiTrap MabSelect Sure Protein A (Cytiva) のアフィニティークラムを有するAKTAPure 精製システム (Cytiva) を使用して融合タンパク質を精製し、したがって1ミリリットルの画分当たり100 µlの1M Tris-HCl、pH 8.8を添加することによって直ちに中和した。次いで、遠心フィルターユニット (Amicon) を使用して、プールされた画分をPBS、pH 7.4に緩衝液交換した。その結果得られた最終試料をさらに使用するまで保存した。同時に、SDS-PAGE (Invitrogen (商標) Novex (商標) WedgeWell)、SEC-HPLC (Agilent Infinity 1260 及び300 Å 細孔径のカラム) 及び内毒素測定 (Charles River Cartridge <0.05 EU/ml 感度) 及び表面プラズモン共鳴 (SPR Biacore) などの品質管理研究に融合タンパク質を供した。

【0193】

[実施例2]

オルソログスなTie2タンパク質の調製

A. 構築物の設計

Tie2の3つのオルソログスなタンパク質 (ヒト、ウサギ及びマウス) のIg3ドメイン及びFNIII (1-3) ドメインを、IGT-427への結合タンパク質として選択した。Tie2とIgG1 Fc配列との間の連続するC末端ヘキサヒスチジン及びトロンピンプロテアーゼ切断部位 (LVPRGS) と共に、伸長因子1-アルファ (EF-1α) プロモーター及びIL2シグナルペプチドから構成されるpFuse-マウスIgG1 Fc2ベクターに各Tie2オルソログのドメインをクローニングした。ヒト (

配列番号 2)、ウサギ (配列番号 3) 及びマウス (配列番号 4) T i e 2 オルソログの配列が上記の表 1 に示されている。

【0194】

B. T i e 2 オルソログの発現及び精製

T i e 2 オルソログを生産するために、組換えタンパク質を高効率で生産することができる E x p i 2 9 3 F (G i b c o) 細胞を使用した。製造者の取扱説明書 (G i b c o) を参照することによって、E x p i 2 9 3 F 細胞株において、オルソログスな T i e 2 タンパク質を一過性に発現させた。4 日のトランスフェクション及び振盪しながら空気中 8 % C O₂ の加湿雰囲気での、3 7 °C でのインキュベーション後、得られた培養培地を回収し、遠心分離して細胞を除去した。分泌された抗体を含有する培養上清を単離し、4 °C で保存するか、又は結合及び洗浄 (2 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 2 及び 1 5 0 m M N a C l) 並びに溶出緩衝液 (2 5 m M 酢酸ナトリウム、p H 3 . 3) という 2 つの異なる緩衝液系中で、アフィニティーカラム (H i T r a p M a b S e l e c t S u r e P r o t e i n A、C y t i v a) を備えた A K T A P u r e 精製装置 (C y t i v a) を使用して直ちに精製した。1 ミリリットルの画分当たり 1 0 0 μ l の 1 M T r i s - H C l、p H 8 . 8 を添加することによって、T i e 2 タンパク質を直ちに中和した。画分をプールし、次いで、タンパク質遠心分離フィルター (A m i c o n) を通して P B S、p H 7 . 4 に緩衝液交換し、- 8 0 °C で保存した。次のプロセスとして、S D S - P A G E (I n v i t r o g e n (商標) N o v e x (商標) W e d g e W e l l)、S E C - H P L C (A g i l e n t I n f i n i t y 1 2 6 0 及び 3 0 0 Å 孔径のカラム) 及び表面プラズモン共鳴 (S P R) などの品質管理研究のためにタンパク質を分析した。

10

20

【0195】

[実施例 3]

T i e 2 オルソログに対する融合タンパク質 (I G T - 4 2 7) の親和性測定

S P R システム (B i a c o r e 3 0 0 0) によって、オルソログスな T i e 2 タンパク質に対する融合タンパク質の親和性を測定した。E D C / N H S 化学を使用して、ヒト、ウサギ又はマウス T i e 2 の単量体又は二量体形態のいずれかで、C M 5 S P R チップ (C y t i v a) を修飾した (ここでは、二量体形態は F c 融合物であった)。センサーチップを E D C (0 . 2 M) 及び N H S (0 . 0 5 M) で 7 分間活性化した後、約 2 0 0 R U の抗原表面密度に達するように、p H 5 の 1 0 m M 酢酸ナトリウム中 2 . 5 μ g m L⁻¹ の T i e 2 構築物を注入した。次いで、1 M エタノールアミン・H C l p H 8 . 5 の 7 分間の注入で表面を非活性化した。活性化及び非活性化試薬は、C y t i v a から購入した。T i e 2 構築物の固定化後、3 0 0 m M リン酸の 2 回の 5 秒間パルスで表面の状態を整えた。これらの固定化された T i e 2 表面上に、1 0 0 n M、3 3 . 3 n M、1 1 . 1 n M、3 . 7 n M 及び 1 . 2 n M で、3 0 μ L / 分で 5 分間、ランニング緩衝液 (1 0 m M H E P E S p H 7 . 4、1 5 0 m M N a C l、3 m M E D T A、2 m g / m L B S A 及び 0 . 0 5 % ポリソルベート - 2 0) 中の融合タンパク質を注入し、解離を 2 0 分間監視した。3 0 0 m M リン酸の 1 0 秒間の注入で表面再生を行った。S c r u b b e r ソフトウェア (B i o L o g i c) を使用して、センサーグラムを 1 : 1 ラングミュア結合モデルに当てはめた。K_D 値及び S P R センサーグラムが、それぞれ以下の表 2 及び図 1 A ~ 1 C に示した。

30

40

【表 2】

表 2. 抗原 Tie2-Ig3-FNIII(1-3)オルソログに対する融合タンパク質 IGT-427 の

親和性

抗原	$K_{on}(M^{-1} s^{-1})$	$K_{off}(1/s)$	$K_D(M)$
ヒト二量体 Tie2	1.06E+05	4.70E-05	4.42E-10
ウサギ二量体 Tie2	1.28E+05	6.82E-05	5.32E-10
マウス二量体 Tie2	8.87E+04	3.07E-04	3.46E-09
ヒト単量体 Tie2	1.59E+05	4.00E-05	2.50E-10
ウサギ単量体 Tie2	1.65E+05	6.49E-05	3.93E-10
マウス単量体 Tie2	1.19E+04	4.33E-04	3.62E-09

10

【0196】

【実施例 4】

IGT-427 による VEGFR2 リン酸化の阻害

60mm培養皿において、EGM-2 培地 (Lonza) 中、37℃で、HUVEC (1×10^5 細胞/ml) を培養した。飢餓状態にするために、サプリメントを含まない EBM-2 培地とともに4時間、90%コンフルエントの細胞をインキュベートした。表記された濃度の IGT-427 又はアイリニア (R) で、飢餓状態にした HUVEC を30分間前処理し、次いで組換えヒト VEGF で2分間処理した。冷 PBS で細胞を洗浄し、溶解緩衝液 (10mM Tris-Cl pH7.4、150mM NaCl、5mM EDTA、10%グリセロール、1%Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤) で処理し、4℃で20分間溶解した。次いで、13000rpmで15分間の遠心分離によって細胞可溶化物を調製した。上清中のタンパク質濃度を BCA アッセイによって定量した。4×SDS 試料緩衝液を添加することによって細胞可溶化物を調製し、細胞可溶化物を SDS PAGE に供し、タンパク質をニトロセルロース膜 (GE) に転写した。

20

【0197】

VEGFR2 及び Akt のリン酸化を調べるために、5%スキムミルク含有 TBS-T により室温 (RT) で1時間ブロットをブロッキングし、抗ホスホ VEGFR2 抗体 (Tyr1175) 又は抗ホスホ Akt (S473) 抗体とともに、4℃で約16時間インキュベートした。増感化学発光 (ECL) によって、ホスホ VEGFR2 (Tyr1175) 又は pAkt (S473) のシグナルを、可視化した。次いで、ストリッピング緩衝液 (Thermo) 中で15分間、膜をインキュベートし、その後、抗 VEGFR2 抗体又は抗 Akt 抗体により再度プローブして、総 VEGFR2 及び総 Akt の量を決定した。Tyr1175 における VEGF 誘導性 VEGFR2 リン酸化は、IGT-427 によって濃度依存的に阻害され、その阻害は、アイリニア (R) による阻害に匹敵する (図 2A 及び 2B)。さらに、IGT-427 は、Akt のリン酸化を用量依存的様式で誘導した。

30

【0198】

VEGF レポーターバイオアッセイキット (PROMEGA (商標)) を使用して、VEGF レポーターアッセイを行った。簡潔には、10%FBS (アッセイ緩衝液) を含有する 4.6ml の DMEM 培地に、0.4ml の KDR/NFAT-RE HEK293 細胞を加え、25µl の細胞懸濁液を白色平底 96 ウェルアッセイプレート (Corning) に蒔いた。50nM の3倍高濃度の濃度及び25µl のアッセイ緩衝液中での3倍連続希釈で、IGT-427、ファリシマブ又はアフリベルセプトを添加し、25µl のアッセイ緩衝液中の 40ng/ml の3倍高濃度の組換えヒト VEGF をプレートに添加した。37℃で6時間インキュベートした後、75µl のキットに付属の BIO-GLO (商標) 試薬を加え、GloMax (R) Discovery System (PROMEGA (商標)) を用いて発光を測定した。IGT-427、ファリシマブ又はアフリベ

40

50

ルセプトのIC50値は、それぞれ約0.48 nM、0.32 nM又は0.75 nMであり（図2C）、IGT-427によるVEGF阻害がファリシマブ又はアフリベルセプトのいずれかによる阻害と同等であることを示唆した。

【0199】

〔実施例5〕

IGT-427によるTie2のより強くかつより持続的な活性化

完全長のヒトTie2を過剰発現するCHO細胞（CHO-hTie2、 1×10^5 細胞／ml）を、60 mm培養皿中において、37℃でDMEM培地（Thermo Fisher）中で培養した。飢餓状態にするために、サプリメントを含まないDMEM培地とともに4時間、90%コンフルエントの細胞をインキュベートした。飢餓状態にされたCHO細胞を、様々な期間（30分、1時間、2時間、6時間及び24時間）、10 nMの濃度のIGT-427又は組換えヒトアンジオポエチン-1（R&D Systems（R））で処理した。細胞を冷PBSで洗浄し、溶解緩衝液（10 mM Tris-Cl pH 7.4、150 mM NaCl、5 mM EDTA、10%グリセロール、1% Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤）で処理し、4℃で20分間溶解した。次いで、13000 rpmで15分間の遠心分離によって細胞可溶化物を調製した。次いで、可溶化物を使用して、pTie2及び総Tie2 ELISAアッセイキット（R&D Systems（R））を使用して、ホスホ-Tie2及び総Tie2シグナルのレベルを検出した。総Tie2シグナルによってホスホ-Tie2シグナルを正規化した。IGT-427は、アンジオポエチン-1と比較して、より強くかつより持続的なpTie2シグナルを示した（図3）。

【0200】

〔実施例6〕

IGT-427によるAktシグナル伝達の用量依存的活性化

60 mm培養皿において、EGM-2培地（Lonza）中、37℃で、HUVEC（ 1×10^5 細胞／ml）を培養した。飢餓状態にするために、サプリメントを含まないEBM-2培地とともに4時間、90%コンフルエントの細胞をインキュベートした。飢餓状態にされたHUVECを様々な濃度のIGT-427（0.3、1、3、10、30、100 nM）で30分間処理した。冷PBSで細胞を洗浄し、溶解緩衝液（10 mM Tris-Cl pH 7.4、150 mM NaCl、5 mM EDTA、10%グリセロール、1% Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤）で処理し、4℃で20分間溶解した。次いで、13000 rpmで15分間の遠心分離によって細胞可溶化物を調製した。タンパク質濃度をBCAアッセイによって定量した。4×SDS試料緩衝液を添加することによって細胞可溶化物を調製し、細胞可溶化物をSDS PAGEに供し、タンパク質をニトロセルロース膜（GE）に転写した。Aktのリン酸化を調べるために、5%スキムミルク含有TBS-Tにより室温（RT）で1時間ブロットをブロッキングし、抗ホスホAkt（S473）抗体とともに、4℃で約16時間インキュベートした。増感化学発光（ECL）によって、pAkt（S473）のシグナルを可視化した。次いで、ストリッピング緩衝液（Thermo）中で15分間、膜をインキュベートし、その後、抗Akt抗体により再度プローブして、総Aktの量を決定した。図4に示されているように、IGT-427によるホスホ-Aktシグナル伝達の用量依存的な漸増が存在した。

【0201】

〔実施例7〕

IGT-427によってAng2シグナル伝達を回避する

60 mm培養皿において、EGM-2培地（Lonza）中、37℃で、HUVEC（ 1×10^5 細胞／ml）を培養した。飢餓状態にするために、サプリメントを含まないEBM-2培地とともに4時間、90%コンフルエントの細胞をインキュベートした。0.01、0.1、1 nMの濃度の組換えヒトアンジオポエチン-2（R&D System（R））で30分間、飢餓状態にされたHUVECを前処理し、次いで、30 nMの濃

度の $2 \times 20 \text{ kDa}$ のペグ化 IGT-427 で 60 分間処理した。冷 PBS で細胞を洗浄し、溶解緩衝液 (10 mM Tris-Cl pH 7.4、 150 mM NaCl 、 5 mM EDTA 、 10% グリセロール、 1% Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤) で処理し、 4°C で 20 分間溶解した。次いで、 13000 rpm で 15 分間の遠心分離によって細胞可溶化物を調製した。タンパク質濃度を BCA アッセイによって定量した。 $4 \times \text{SDS}$ 試料緩衝液を添加することによって細胞可溶化物を調製し、細胞可溶化物を SDS PAGE に供し、タンパク質をニトロセルロース膜 (GE) に転写した。Akt のリン酸化を調べるために、 5% スkimミルク含有 TBS-T により室温 (RT) で 1 時間ブロットをブロッキングし、抗ホスホ Akt (S473) 抗体とともに、 4°C で約 16 時間インキュベートした。増感化学発光 (ECL) によって、pAkt (S473) のシグナルを可視化した。次いで、ストリッピング緩衝液 (Thermo) 中で 15 分間、膜をインキュベートし、その後、抗 Akt 抗体により再度プローブして、総 Akt の量を決定した。組換えアンジオポエチン-2 (Ang2) は、Akt の弱いリン酸化を濃度依存的様式で誘導した。しかしながら、IGT-427 は、組換えアンジオポエチン-2 の存在下で Akt リン酸化をさらに増加させ、IGT-427 が Ang2 シグナル伝達を乗り越えることを実証した (図 5)。

10

【0202】

[実施例 8]

IGT-427 の二重結合能力

表面プラズモン共鳴 (SPR) システム (BIACORE (商標) 3000) によって、IGT-427 の、その抗原である Tie2 及び VEGF への二重結合特性を調べた。組換えヒト完全長 Ang2 (R&D Systems (R)) を CM5 SPR チップ (Cytiva) 上に捕捉し、まずヒト二量体型の Tie2 (100 nM) を注射した後、IGT-427 (150 nM) 及びヒト VEGF (20 nM) (R&D Systems (R)) を順次注射した。センサーグラムは、シグナルの逐次の増加を示し、IGT-427 が Ang2-Tie2 複合体及び VEGF に同時に結合することができることを実証した (図 6)。

20

【0203】

[実施例 9]

IGT-427 による TNF- α 誘導性アポトーシスの阻害

60 mm 培養皿において、EGM-2 培地 (Lonza) 中、 37°C で、HUVEC (1×10^5 細胞/ mL) を培養した。IGT-427 又はアイリーア (R) で 60 分間、 90% コンフルエントの細胞を前処理し、次いで、組換えヒト TNF- α (50 ng/mL) で 24 時間処理した。APO-BrdU (商標) TUNEL Assay Kit (Thermo Fisher、A23210) によってアポトーシス細胞を染色し、Attune (Thermo Fisher) によって判定した。簡潔には、 0.5 mL の PBS に細胞を懸濁し、PBS 中の 5 mL の 1% (w/v) パラホルムアルデヒドを細胞懸濁液に添加し、次いで、細胞懸濁液を氷上に 15 分間置いた。細胞を $300 \times g$ で 5 分間遠心分離し、 5 mL の PBS で 2 回洗浄した。 0.5 mL の PBS に細胞を再懸濁し、 5 mL の氷冷 70% (v/v) エタノールを細胞懸濁液に添加し、細胞懸濁液を最低 30 分間、 -20°C の冷凍庫内に置いた。 70% (v/v) エタノールを除去するために、細胞懸濁液を $300 \times g$ で 5 分間遠心分離し、次いで、キットに付属の 1 mL の洗浄緩衝液で細胞ペレットを再懸濁した。 $50 \mu\text{L}$ の DNA 標識溶液 ($10 \mu\text{L}$ の反応緩衝液、 $0.75 \mu\text{L}$ の TdT 酵素、 $8.0 \mu\text{L}$ の BrdUTP 及び $31.25 \mu\text{L}$ の dH_2O) 中で、 37°C で 60 分間、細胞ペレットをインキュベートした。インキュベーション時間の最後に、 1.0 mL のリンス緩衝液を細胞に添加し、細胞を $300 \times g$ で 5 分間遠心分離した。リンス緩衝液でさらに洗浄した後、 $100 \mu\text{L}$ の抗体染色溶液 ($5.0 \mu\text{L}$ の Alexa Fluor (商標) 488 色素標識抗 BrdU 抗体) と $95 \mu\text{L}$ のリンス緩衝液) 中で、室温で 30 分間、細胞をインキュベートした。Attune フローサイトメトリー (Thermo Fisher) によってアポトーシス細胞を分析した。TNF- α は H

30

40

50

U V E C細胞のアポトーシスを誘導し、I G T-427は、T N F- α によって誘導されたアポトーシスを有意に阻害したが、アイリーア（R）は阻害しなかった（図7）。

【0204】

〔実施例10〕

表面T i e 2レベルの測定

アッセイの準備として、10cm組織培養皿上で、コンフルエントになるまでC H O-h T i e 2細胞を増殖させた。ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（D P B S）でC H O-h T i e 2細胞を洗浄し、トリプシンで処理して細胞を剥離し、計数し、200gで5分間遠心分離し、 0.05×10^6 細胞/mLの密度で再懸濁した。アッセイプレートに播種するために、24ウェル組織培養プレートの各ウェルに1mLの細胞懸濁液を分注し、プレートを37°Cで一晩インキュベートした。翌日、組織培養プレートから培地を取り出し、非刺激群についてはD M E Mのみ、又は10nMアンジオポエチン1（R & D S y s t e m s（R）#923-AN）、10nM I G T-301（I T P-006）若しくは10nM I G T-427（I T P-016）を含有するD M E Mのいずれかの0.5mLと交換した。アッセイプレートを37°Cの組織培養インキュベータに所定の時間（0.5時間、1時間、2時間、4時間、6時間又は24時間）戻した。

10

【0205】

インキュベーション後、組織培養プレートを氷上に置き、冷D P B Sで洗浄し、0.5mLの非酵素的細胞解離緩衝液（P e p r o T e c h（R）#C P D-125）を添加することによって剥離させた。細胞を氷上で5分間インキュベートし、1mLのF A C S緩衝液（D P B S中0.5% B S A）を添加し、培養表面になお付着している細胞を剥離させるために穏やかにピペット操作を行うことによって回収した。得られた細胞懸濁液を5mL F a l c o n F A C Sチューブに回収し、300gで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を吸引した。1mLのF A C S緩衝液で細胞を1回洗浄し、上清を吸引すると、チューブ内に約100uLの残留F A C S緩衝液が残存した。次いで、99.5uLのF A C S緩衝液及び0.5uLのP E-T i e 2（B i o L e g e n d（R）#334205）からなる100uLの染色カクテルを添加することによって細胞を染色した。パラフィルムで試料を覆い、暗所において40°Cで30分間インキュベートした。

20

【0206】

インキュベーション後、上記のように1mLのF A C S緩衝液で細胞を2回洗浄し、次いで400uLの最終体積のF A C S緩衝液に再懸濁し、直ちに分析するか又は翌日の分析のために固定した。固定のために、上記のように細胞を2回洗浄し、暗所において40°Cで30分間、200uLの4%パラホルムアルデヒドに再懸濁し、1mLのF A C S緩衝液で1回洗浄し、400uLの最終体積のF A C S緩衝液で再懸濁し、40°Cで一晩被覆して保存した。A t t u n e N X T A c o u s t i cフローサイトメーター（T h e r m o F i s h e r）を用いて試料を取得し、F l o w J o（商標）（T r e e S t a r, I n c.）を用いてファイルを分析した。I G T-427処理は、内因性T i e 2アゴニストであるアンジオポエチン-1（A n g 1）と比較して、表面T i e 2のより遅い消失及びより多い存在をもたらした（図8）。

30

【0207】

〔実施例11〕

T i e 2切断を遮断する

T i e 2は、様々な炎症症状でヒト、マウス及び内皮細胞において切断及び下方制御され、可溶性T i e 2（s T i e 2）のレベルの増加をもたらすことが知られている（T h a m m e t a l., C r i t i c a l C a r e M e d i c i n e, 2018. 46:e928-e936）。広範囲のマトリックスメタロプロテアーゼ（M M P）を遮断することは、T i e 2切断及び血管漏出を防ぐのに十分であることが知られている（T h a m m e t a l., C r i t i c a l C a r e M e d i c i n e, 2018. 46:e928-e936; S u n g e t a l., 2011. T h e J o u r n a l o f C l i n i c a l E n d o c r i n o l o g y & M e t a b o l i s m 96:

40

50

E1148-E1152; Findley et al., 2007, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27:2619-2626)。MMP-14は、主要なTie2切断であるとされており、Tie2は、マトリックスメタロプロテアーゼ-14によってフィブロネクチン3型ドメイン内の複数の部位において切断される (Idowu, TO et al., eLife, August 24, 2020, 9:e59520)。

【0208】

IGT-427 (hTie2-ECDの同じモル濃度) の非存在下又は存在下で、組換えヒトMMP-14 (R&D Systems (R)、カタログ#、918-MP-010, 0.5 ug) を二量体ヒトTie2細胞外ドメイン (ECD) -ヒトIgG融合タンパク質 (hTie2-ECD、5 ug) と混合した。混合物を30℃で16時間インキュベートし、SDS-PAGE (還元条件) に供した。以前の報告と一致して、MMP-14及びヒトTie2の共インキュベーションは、無傷のhTie2-ECDの有意な低下をもたらし、より短い切断された断片が出現した。しかしながら、IGT-427は、MMP-14による無傷のヒトTie2-ECDタンパク質の切断及び低下を有意に遮断した (図9)。

【0209】

理論に拘束されることを望むものではないが、この証拠に基づくと、配列番号2、3若しくは4、又はより具体的には配列番号20のアミノ酸配列及び／若しくは配列番号21のアミノ酸配列を含むTie2 Ig3-FNIII (1-3) ドメインに結合する抗Tie2抗体又は抗原結合断片と、VEGF結合ドメインとを含む二重特異性は、ヒトTie2へのMMP-14の結合を遮断するという効果と、VEGFによって引き起こされるヒトTie2-ECDタンパク質の切断を阻害するという効果とを組み合わせることによって、Tie2のシェディングを低下させると考えられる。これは、Tie2を細胞表面膜に保つという特に有益な結果を提供する。

【0210】

[実施例12]

可溶性Tie2 (sTie2) 測定

60mm培養皿において、EGM-2培地 (Lonza) 中、37℃で、HUVEC (1×10⁵細胞/ml) を培養した。10nMの濃度のIGT-427、ファリシマブ又は組換えヒトアンジオポエチン-1 (R&D Systems (R)) で、90%コンフルエントの細胞を60分間前処理し、次いで、組換えヒトTNF-α (50ng/ml) で24時間処理した。細胞上清を回収し、13000rpmで10分間遠心分離した。総Tie2 ELISAアッセイキット (R&D Systems (R)) によって細胞上清中の可溶性Tie2を測定した。IGT-427は、基礎条件及びTNF-αによって誘導された条件の両方で可溶性Tie2レベルを抑制したが、他の薬剤は抑制しなかった (図10)。

【0211】

[実施例13]

TEER (経内皮電気抵抗) アッセイ

EGM-2培地 (Lonza) 中の24ウェルプレート (Corning) 中の細胞培養インサート中で、HUVEC (2×10⁵細胞) を37℃で培養した。2日間のインキュベーション後、培地を、0.5% FBSを含有するEGM-2培地に変えた。その後の2日間のインキュベーション後に、細胞培養インサートをCellZscope (R) (NanoAnalytics) の中に入れ、TEER (経内皮電気抵抗) を37℃のCO₂インキュベータ中で連続的に測定した。細胞バリア形成を確認した後、10ng/mlの濃度の組換えヒトVEGF (R&D) を下方の区画に添加した。種々の薬剤、例えば10nMの濃度のIGT-427、ファリシマブ、アフリベルセプト又は組換えヒトアンジオポエチン-1 (R&D) を下方の区画に添加し、VEGF処理後48時間にわたってTEERをモニターした。VEGFは内皮バリアの完全性を破壊し、IGT-427は、V

E G Fによって誘発された損傷から内皮バリアの完全性を回復させる上で、ファリシマブ及びアフリベルセプト、並びにA n g 1よりも優れていた（図11）。

【0212】

〔実施例14〕

硝子体内注射されたI G T-427によるC N V（脈絡膜新生血管形成）の抑制

点眼剤（M y d r i a c y l点眼液、1%）を右眼球に適用することによってチンチラウサギ（雄、2.0～2.5kg）に麻酔をかけ、532nm、出力150mW、持続時間0.1秒で右眼球にレーザー（E l i t e、L u m e n i s（R）、米国）を照射して、視神経の周囲に6つのスポットを生成した。麻酔をかけた動物の右眼に、3ゲージ針を備えたシリンジを使用して、脈絡膜新生血管形成（C N V）誘発の日に、I G T-427、アイリーア（R）又は対照I g G（50μl注入体積／眼、アイリーア（R）（800μg）、I G T-427（885μg）、対照I g G（716μg））を硝子体内投与した。アイリーア（R）、I G T-427及び対照I g Gのモル比は、1：0.65：0.68である。濃度及び体積に対するいくつかの制限のために、異なるモルを使用した。0日目、7日目及び14日目に、右眼球に点眼剤（M y d r i a c y l点眼液、1%）を適用することによって動物に麻酔をかけ、1mLのフルオレセインナトリウム塩溶液（2%）を静脈内注射して2分以内に眼底カメラ（T R C-50IX、T O P C O N、日本）を用いて眼底画像を撮影した。網膜フルオレセイン眼底写真を用いて網膜C N V面積及び有効性の評価を行い、C N V病変部位の蛍光強度を検証するために、I m a g e Jソフトウェア（N I H、ベセスダ、メリーランド州）を用いて画像解析を行った。I G T-427は、対照I g Gと比較して網膜漏出を30%抑制した。一方、アイリーア（R）は網膜漏出を20%阻害することができた（図12）。

10

20

【0213】

〔実施例15〕

P E G化のためのI G T-427バリエーション

I G T-427の眼半減期を延長するために、I G T-427の重鎖及び軽鎖プラスミドを改変して、P E G化のための5つの異なる抗体構築物を作製した（図13に概説されている）。5つバリエーションはすべて、各重鎖上のC218S変異（E Uナンバリング）と組み合わせて、重鎖と軽鎖間の鎖間ジスルフィド結合を除去する変異C214S（E Uナンバリング）を有する軽鎖を有する。さらに、I G T-427のヒンジ領域内の一方又は両方の重鎖システインをセリンで置換し、重鎖間の鎖間ジスルフィド結合の1つを残すか、又は全く残さなかった。P R O 5 9 2及びP R O 5 9 6の場合には、単一のジスルフィド結合が還元及びP E G化された状態を保つ。P R O 5 9 3、P R O 5 9 4及びP R O 5 9 5の場合には、すべての鎖間ジスルフィド結合が除去され、P E G化のために新しいシステイン残基が導入される。P R O 5 9 3は、重鎖のC末端にシステインが導入されているのに対して、P R O 5 9 4及びP R O 5 9 5はそれぞれ、F cドメインとV E G Fトラップドメインの間のリンカードメインにシステインが導入されている。合わせて、これらのバリエーションは、P E G化効率、抗原結合及び生物活性について試験された多様なP E G化部位を有する一組の構築物となる。E x p i 2 9 3一過性発現系を使用して、各I G T-427バリエーションを発現させた。清澄化した細胞培養上清をH i T r a p m A b s e l e c t P r i s m Aカラム（C y t i v a）で精製した。溶出した抗体を1×P B S中に透析し、P E G化研究のために10mg/mLに濃縮した。

30

40

【0214】

〔実施例16〕

P E G化反応スクリーニング

10mg/mLのI G T-427バリエーションのそれぞれを10又は20mMシステアミンで、室温で1時間還元し、次いでP E G化緩衝液（50mMリン酸ナトリウム、150mM N a C l、2.5mM E D T A、p H 7.2）に緩衝液交換した。緩衝液交換した抗体に10モル当量の20kDa直鎖状P E G-マレイミドを加え、室温で1.5時間P E G化反応を進行させた。非還元S D S-P A G Eによって反応混合物を分析すると、

50

これらのバリエーションは、二重に PEG 化された種への、最大で約 50% の転化を示すことが明らかになった。

【0215】

PEG 化効率をさらに最適化するために、穏やかな還元条件下で最も優れた転化を示したバリエーションである PRO593 を使用して還元条件をスクリーニングした。10 若しくは 100 mM のシステアミンで 1 時間、1 若しくは 10 mM の DTT で 15 分間、又は 2 若しくは 20 倍モル過剰の TCEP (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン) で 15 分間、10 mg/mL の PRO593 を還元した。それぞれの還元後、PRO593 を PEG 化緩衝液に緩衝液交換し、10 倍モル過剰の 20 kDa 直鎖状 PEG-マレイミドで 1.5 時間 PEG 化した。この一連の還元条件から、20 倍モル過剰の TCEP が、2 つの PEG 付加を有する種への PRO593 のほぼ完全な転化をもたらしたことが観察された。次いで、室温で 15 分間、20 倍モル過剰の TCEP で 5 つの IGT-427 バリエーションすべてを還元し、続いて PEG 化緩衝液に緩衝液交換し、10 倍モル過剰の 20 kDa 直鎖状 PEG-マレイミドで PEG 化した。最適化された反応条件の結果を図 14 に示す。HiTrap SP-HP 陽イオン交換クロマトグラフィーカラム (Cytiva) 及びグラジエント塩溶出を使用して、2 つの PEG 付加を有する抗体を反応混合物から精製した。PEG 化抗体を 1×PBS 中に透析し、10 mg/mL に濃縮し、0.01% ポリソルベート-20 とともに製剤化し、0.2 µm フィルターに通して濾過した。

10

【0216】

【実施例 17】

20

PEG 化 IGT-427 バリエーションの特徴付け

Tie2 又は VEGF の結合を SPR によって特徴付けた (図 15)。固定化された Tie2 又は VEGF を含有する表面上に、30 µL/分で 300 秒間、各抗体の 100 nM 溶液を注入した。300 秒後の相対結合シグナルを使用して、結合の差を決定した。

【0217】

【実施例 18】

眼の PK 研究

IGT-427 の眼の薬物動態に対する PEG 化及び PEG 分子量の効果を評価するために、アイリーア (R)、ファリシマブ、IGT-427、(2×20 kDa PEG)-IGT-427 及び (2×40 kDa PEG)-IGT-427 の 500 µg 硝子体内注射を雄のニュージーランドホワイトウサギに投与した。各被験物質群について、3 匹又は 4 匹の動物が 0 日目に投薬された。投薬後 1 日目、3 日目、7 日目及び 14 日目に、3 匹又は 4 匹のいずれかの動物から血液を採取し、次いで、静脈内バルビツレート過量投与によって安楽死させた後、両眼を採取し、液体窒素中で急速凍結し、房水、硝子体液、網膜及び脈絡膜の採取のために解剖した。ホモイナイズせずに硝子体液試料を 1×PBST で 1:5 希釈し、さらなる分析まで -70°C で保存した。

30

【0218】

ザルトラップ (R) を商業的供給源から購入し、アイリーア (R) 製剤緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム、40 mM NaCl、0.03% ポリソルベート-20、5% スクロース) に対して透析し、同じ緩衝液で 10 mg/mL に希釈した。

40

【0219】

Exp1293 一過性発現系 (ThermoFisher) を使用して、ファリシマブを発現させた。内毒素を除去するために 2% エタノール洗浄を含む HiTrap Mab Select Prisma カラム (Cytiva) で、清澄化した細胞培養上清を精製し、続いて不完全に組み立てられた抗体を除去するために pH 勾配溶出を行った。溶出した抗体を 1×PBS 中に透析し、10 mg/mL に濃縮し、0.01% ポリソルベート-20 とともに製剤化し、0.2 µm フィルターに通して濾過した。

【0220】

Exp1293 一過性発現系を使用して、IGT-427 を発現させた。内毒素を除去するために 2% エタノール洗浄を含む HiTrap Mab Select Prisma

50

カラム (Cytiva) で、清澄化した細胞培養上清を精製した。溶出した抗体を $1 \times \text{PBS}$ 中に透析し、 10 mg/mL に濃縮し、 0.01% ポリソルベート-20 とともに製剤化し、 $0.2 \mu\text{m}$ フィルターに通して濾過した。

【0221】

ペグ化 IGT-427。Expi293 一過性発現系 (ThermoFisher) を使用して、PRO593 を発現させた。内毒素を除去するために 2% エタノール洗浄を含む HiTrap MabSelect PrismA カラム (Cytiva) で、清澄化した細胞培養上清を精製した。溶出した抗体を $1 \times \text{PBS}$ 中に透析し、PEG 化のために 10 mg/mL に濃縮した。濃縮された抗体を 20 倍モル過剰の TCEP で還元し、次いで PEG 化緩衝液に脱塩し、10 倍モル過剰の 20 kDa 直鎖状又は 40 kDa 分枝状 PEG マレイミドのいずれかとともに、室温で 1.5 時間インキュベートした。NaCl 勾配を用いて $\text{pH} 4.6$ で HiTrap SP-HP カラム (Cytiva) を使用して、PEG 化反応混合物を精製した。溶出中の PEG 化抗体を PBS 中に透析し、 10 mg/mL に濃縮し、 0.01% ポリソルベート-20 とともに製剤化し、 $0.2 \mu\text{m}$ フィルターに通して濾過した。

【0222】

【実施例 19】

PK 研究用の試料の特徴付け

$5 \mu\text{g}$ のタンパク質を $4 \times \text{LDS}$ (ドデシル硫酸リチウム) と混合し、 $4 \sim 12\%$ のビーストリスゲル上で、 150 V で 60 分間、加熱せずに試料を泳動し、続いて SafeS-tain (ThermoFisher) で染色することによって、各被験物質の非還元 SDS-PAGE 分析を行った。 100 mM アルギニン、 $1 \times \text{PBS}$ 、 $\text{pH} 6.7$ 中、 0.5 mL/分 で Zenix (R) サイズ排除カラム (SEC) -300 に $5 \mu\text{g}$ の各被験物質をロードすることによって、SEC-HPLC 分析を行った。ウサギ Tie2 及び VEGF への結合を SPR によって特徴付けた。

【0223】

SPR を使用して、Tie2 又は VEGF のいずれかへの PEG 化 IGT-427 バリアントの結合を評価した。図 3 は、ヒト Tie2 又は VEGF 表面上へのバリアントの 100 nM 注射から得られたセンサーグラムを示す。非修飾 IGT-427 と比較して、PEG の存在に起因する結合シグナルの劇的な低下が存在する。しかしながら、残りのバリアントに対する各バリアントの相対的結合シグナルは、抗原に対する相対的親和性の尺度として使用することができる。各バリアントの結合シグナルにはわずかな差が存在するが、総じて、Tie2 又は VEGF のいずれかへの結合は PEG 化部位とは概ね無関係である。

【0224】

すべての被験物質は 10 mg/mL で製剤化され、 15% の高分子量種を含有した 20 kDa の PEG 化 IGT-427 を除いて、SEC-HPLC (図 16) 及び非還元 SDS-PAGE (図 17) によって 90% 超の純度であった。内毒素レベルはすべて 0.1 EU/mg 未満であり、すべての被験物質は予想された親和性でそれらのそれぞれの抗原を結合した (図 18A ~ 18C)。

【0225】

【実施例 20】

硝子体液測定のための総薬物 ELISA

投与された薬物に応じて、3 つの異なる ELISA によって、硝子体液中の総薬物レベルを定量した。IGT-427 及び IGT-427 の PEG 化バージョンをマウス抗ヒト IgG 被覆プレート上に捕捉し、Tie2-HRP コンジュゲートで検出した。アイリーア (R) をマウス抗ヒト IgG 被覆プレート上に捕捉し、ポリクローマルヤギ抗ヒト IgG-HRP コンジュゲートで検出した。最後に、ファリシマブを VEGF 被覆プレート上に捕捉し、ポリクローマルヤギ抗ヒト IgG-HRP コンジュゲートで検出した。すべての ELISA 分析について、試料を $1:1250 \sim 1:62500$ 希釈で、2 つ組でアッ

10

20

30

40

50

セイシ、Molecular Devices SpectraMax (R) M5 プレートリーダーを使用してアッセイプレートの発光を読み取った。すべてのELISA分析について、試料発光値は標準曲線の線形範囲内であった。4パラメータ式を使用して標準曲線全体をフィッティングし、4パラメータフィットによって試料発光値を濃度に変換した。

【0226】

抗ヒトIgG捕捉／Tie2検出ELISA。炭酸塩緩衝液（pH9.5）中の1μg/mL抗ヒトIgGを使用して、4℃で一晩、高結合プレートをコーティングした。コーティングしたプレートを洗浄緩衝液（150mM NaClを含む1×PBST（Phosphate Buffered Saline with TWEEN（R）20））で洗浄し、PBST中5%BSAを用いて37℃で1時間ブロッキングした（420RPMで振盪）。ブロッキングしたプレートを洗浄し、試料、標準曲線及びブランクを室温で1.5時間プレート上でインキュベートした（420RPMで振盪）。試料のインキュベーション後、プレートを洗浄し、室温で1時間、1μg/mLのビオチン化ヒトTie2とともにインキュベートした（蓋をして、420RPMで振盪）。プレートを再度洗浄し、遮光してストレプトアビジン-HRPと1時間インキュベートした。プレートに最後の洗浄を行い、次いで、化学発光HRP基質で発色させた。30秒後にすべての発光波長をプレートリーダーで読み取った。

10

【0227】

抗ヒトIgG捕捉／抗huFc検出ELISA。炭酸塩緩衝液（pH9.5）中の1μg/mL抗ヒトIgGを使用して、4℃で一晩、高結合プレートをコーティングした。コーティングしたプレートを洗浄緩衝液で洗浄し、PBST中1%BSAを用いて4℃で4時間ブロッキングした。ブロッキングしたプレートを洗浄し、最終洗浄後にプレートを4℃で乾燥させた。試料、標準曲線及びブランクをプレート上で、4℃で一晩インキュベートした。試料のインキュベーション後、プレートを洗浄し、室温で1時間、ポリクロナルヤギ抗ヒトIgG-HRPコンジュゲートとともにインキュベートした（蓋をして、420RPMで振盪）。プレートに最後の洗浄を行い、次いで、化学発光HRP基質で発色させた。30秒後にすべての発光波長をプレートリーダーで読み取った。

20

【0228】

VEGF捕捉／抗huFc検出ELISA。炭酸塩緩衝液（pH9.5）中の1μg/mLのVEGFを使用して、4℃で一晩、高結合プレートをコーティングした。コーティングしたプレートを洗浄緩衝液で洗浄し、PBST中1%BSAを用いて4℃で4時間ブロッキングした。ブロッキングしたプレートを洗浄し、最終洗浄後にプレートを4℃で乾燥させた。試料、標準曲線及びブランクをプレート上で、4℃で一晩インキュベートした。試料のインキュベーション後、プレートを洗浄し、室温で1時間、ポリクロナルヤギ抗ヒトIgG-HRPコンジュゲートとともにインキュベートした（蓋をして、420RPMで振盪）。プレートに最後の洗浄を行い、次いで、化学発光HRP基質で発色させた。30秒後にすべての発光波長をプレートリーダーで読み取った。

30

【0229】

〔実施例21〕

40

眼のPKの測定

投薬後1、3、7及び14日目に、硝子体液中で各被験物質の総薬物レベルを測定した。各時点で、3匹又は4匹の動物から眼を採取し、1時点当たり被験物質当たり6つ又は8つのいずれかの硝子体液試料を得た。抗ヒトIgG捕捉及びTie2検出ELISAによって、IGT-427又はPEG化IGT-427を投薬された動物からの総薬物レベルを定量した。抗ヒトIgG捕捉及び抗ヒトFc検出ELISAによって、アイリーア（R）を投薬された動物からの総薬物レベルを定量した。最後に、VEGF捕捉及び抗ヒトFc検出ELISAによって、ファリシマブを投薬された動物からの総薬物レベルを定量した。これらのELISAのそれぞれの結果を図19に示す。硝子体内でアイリーア（R）を測定し、433.8μg/mLのCmax値及び4.2日の半減期であった。硝子体

50

内でファリシマブを測定し、154.2 μg/mLのCmax及び4.4日の半減期での崩壊であった。硝子体内でIGT-427を測定し、217.3 μg/mLのCmax値及び3.8日の半減期であった。硝子体内で2つの20kDaの直鎖状PEG分子で修飾されたIGT-427を測定し、406.6 μg/mLのCmax及び8.3日の半減期での崩壊であった。硝子体内で2つの40kDaの分枝状PEG分子で修飾されたIGT-427を測定し、268.8 μg/mLのCmax値及び8.0日の半減期であった。

【産業上の利用可能性】

【0230】

Tie2及びVEGFに結合する融合タンパク質は、Tie2及びVEGFに高い親和性で結合し、ヒト、マウス及びウサギに対する交差反応性を維持し、所望の抗原反応性を示すことができる。さらに、Tie2リン酸化、Tie2受容体の活性化及びVEGFの阻害を誘導することによって、Tie2及びVEGFに結合する融合タンパク質は、目的の血管新生疾患又は血管疾患を予防又は処置するために使用され得る。

【0231】

均等物

前述の明細書は、当業者が実施形態を実施することを可能にするのに十分であると考えられる。前述の説明及び実施例は、特定の実施形態を詳述し、本発明者らが企図する最良の態様を記載する。しかしながら、前述の内容がいかに詳細に文章で記載されていても、実施形態は多くの様式で実施され得、添付の特許請求の範囲及びその均等物に従って解釈されるべきであることが理解されよう。

【0232】

少なくとも及び約などの用語が数値又は範囲のリストの前に存在する場合、それらの用語は、リストに提供された値又は範囲のすべてを修飾する。場合によっては、約という用語は、最も近い有効数字に丸められた数値を含み得る。任意の記載された範囲は、反対のことを明示する文言が存在しなければ、端点を含み、例えば、「5～50」は、値5及び50を包含する。

【図面】

【図1A】

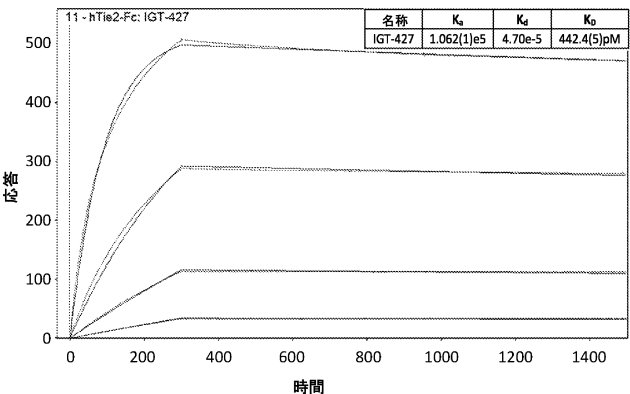


Fig. 1A

【図1B】

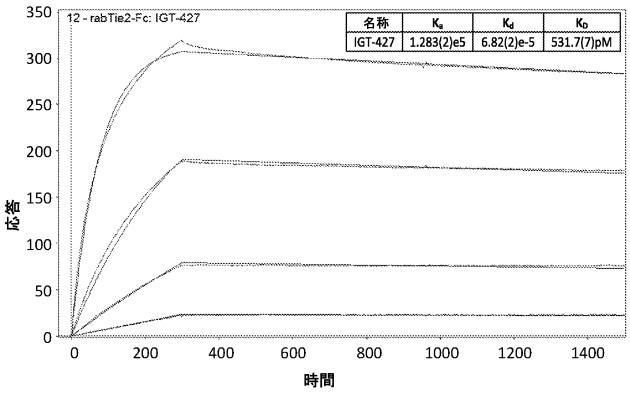


Fig. 1B

10

20

30

40

50

【図 1 C】

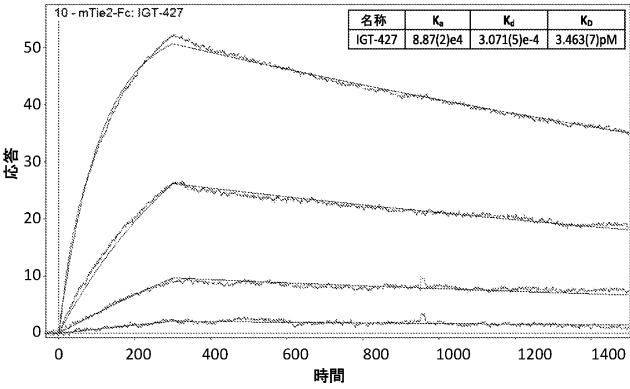


Fig. 1C

【図 2 A】

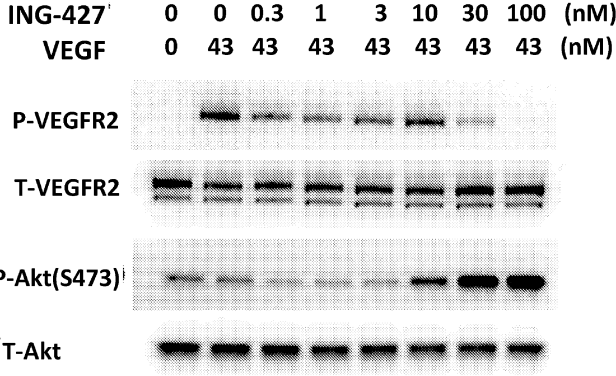


Fig. 2A

【図 2 B】

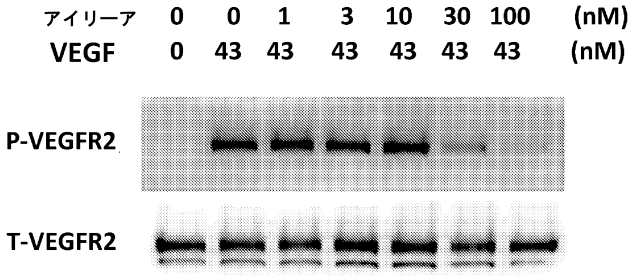


Fig. 2B

【図 2 C】

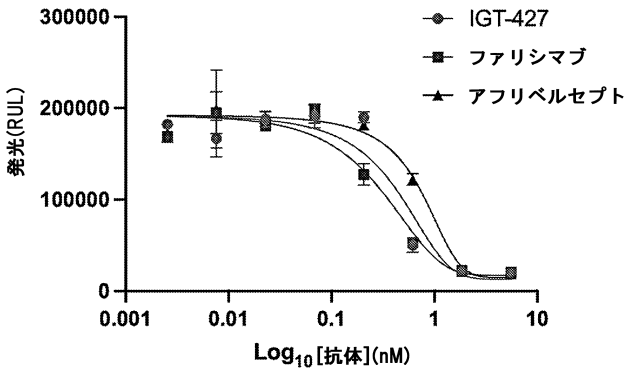


Fig. 2C

10

20

30

40

50

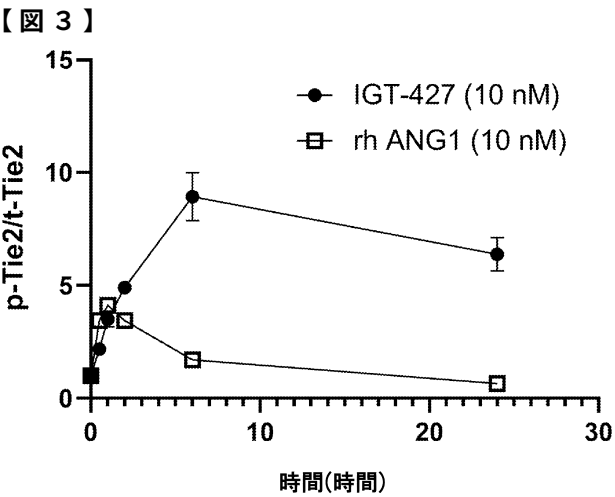


Fig. 3

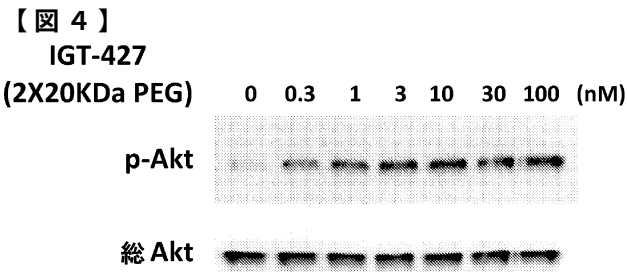


Fig. 4

10

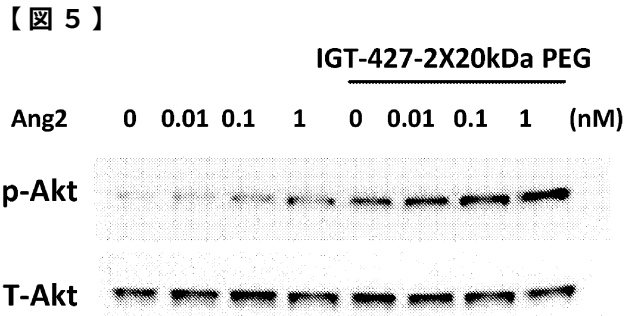


Fig. 5

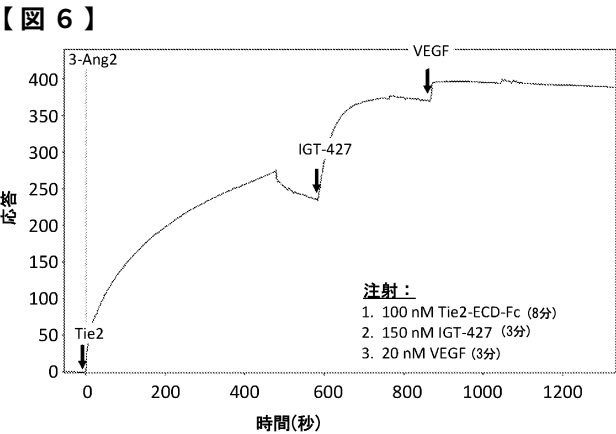


Fig. 6

20

30

40

50

【 図 7 】

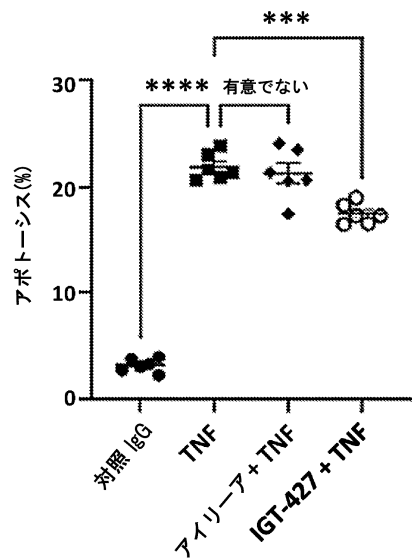


Fig. 7

【 図 8 】

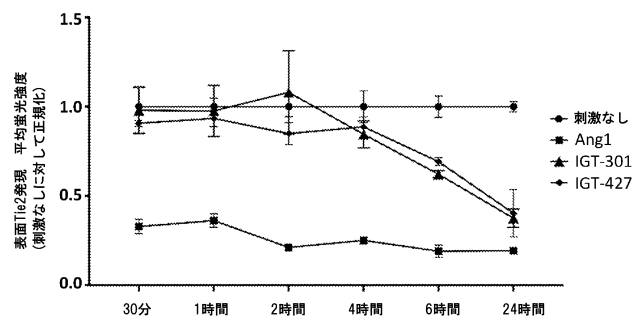


Fig. 8

【 図 9 】

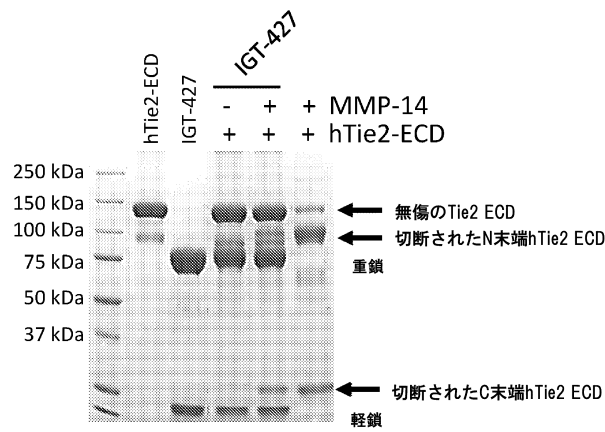


Fig. 9

【 図 10 】

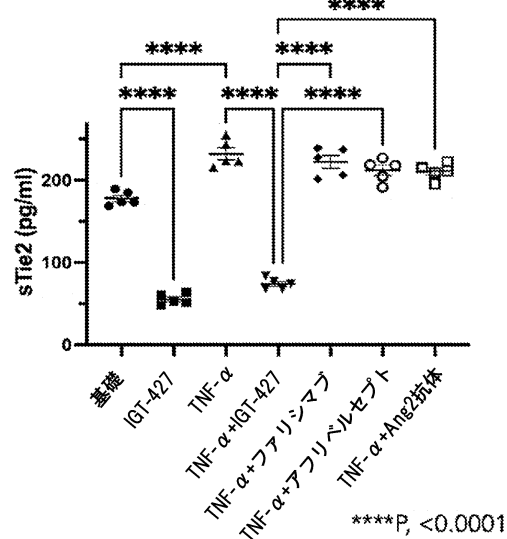


Fig. 10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

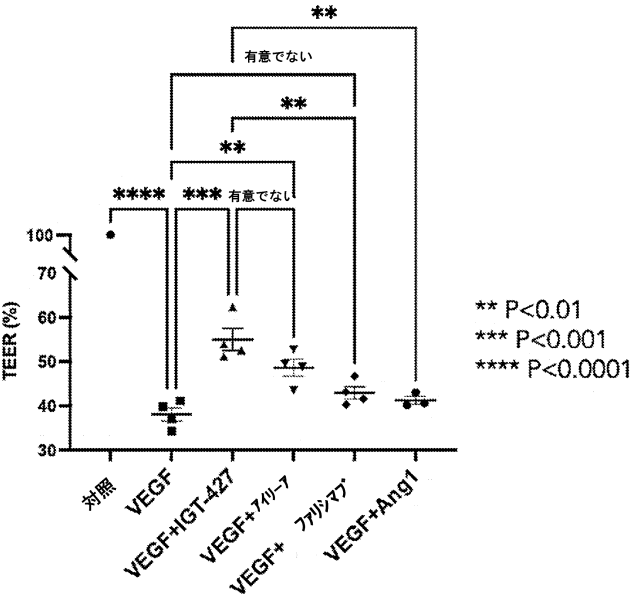


Fig. 11

【図 1 2】

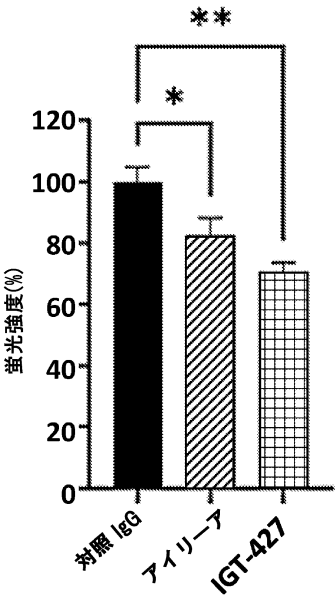


Fig. 12

【図 1 3】

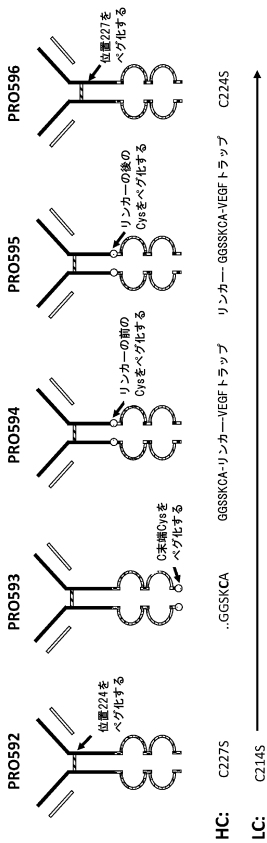


Fig. 13

【図 1 4】

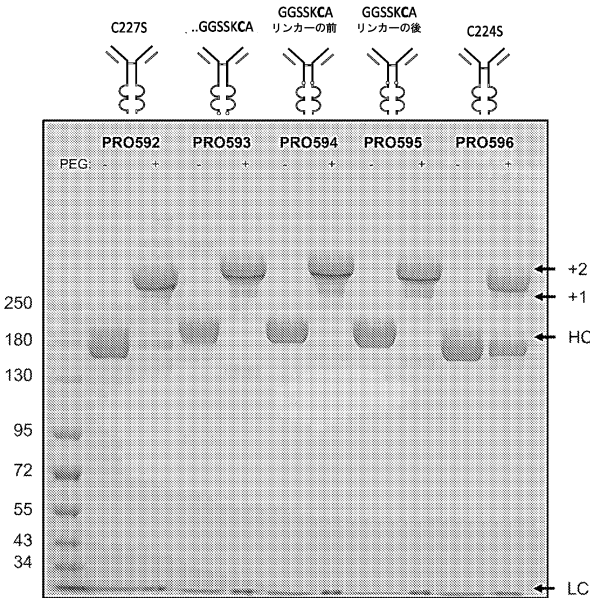


Fig. 14

【図 15】

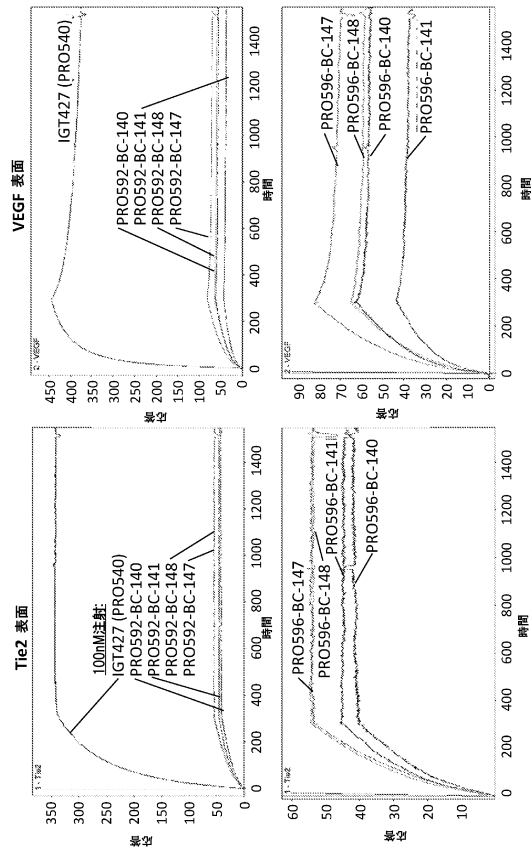


Fig. 15

【図 16】

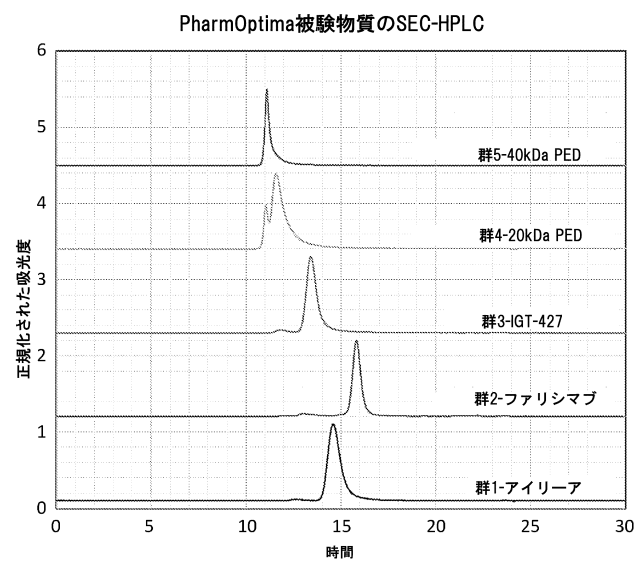


Fig. 16

【図 17】

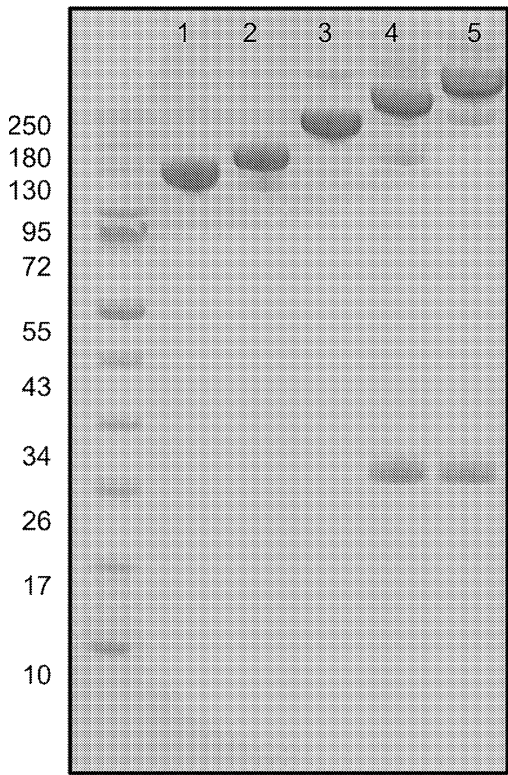


Fig. 17

【図 18 A】

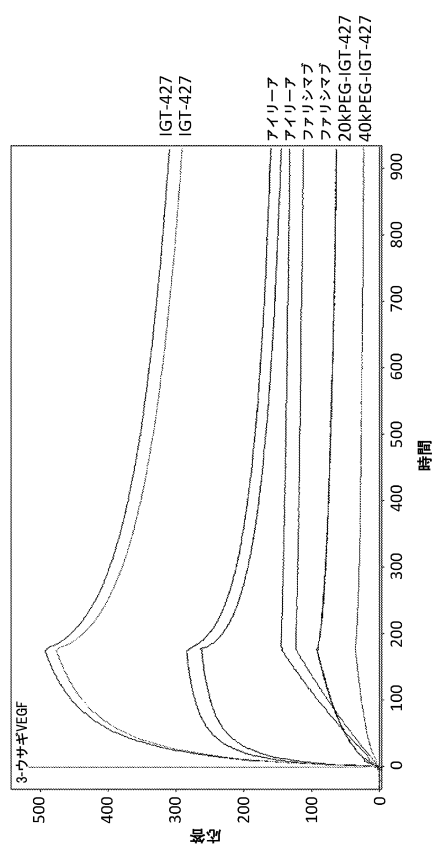


Fig. 18A

10

20

30

40

50

【図 18 B】

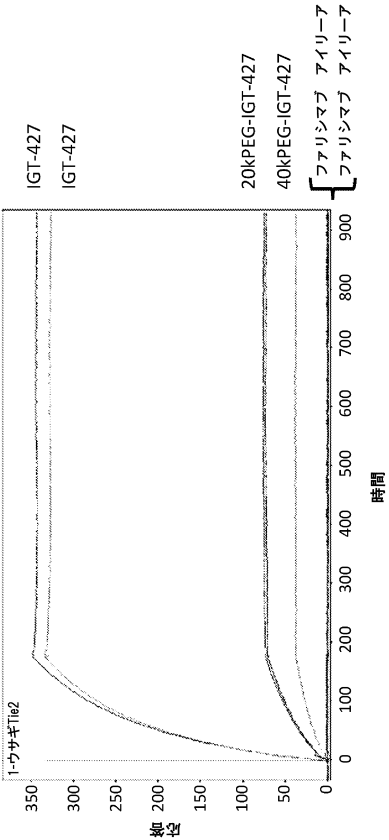
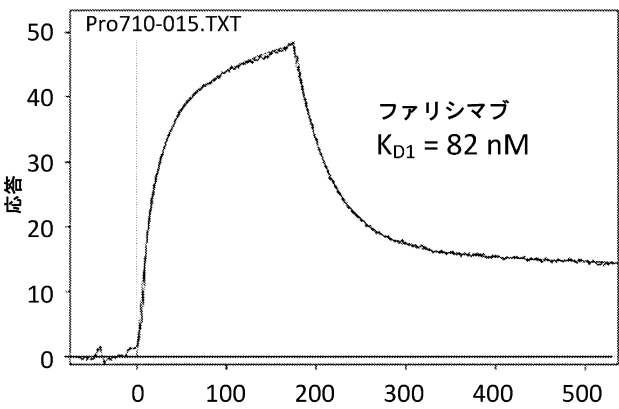


Fig. 18B

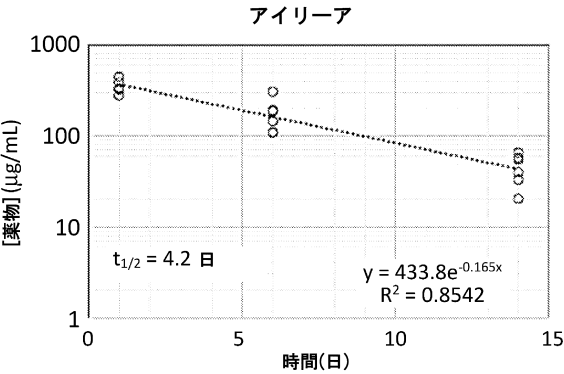
【図 18 C】



被験物質	ウサギ Tie2	ウサギ VEGF	ウサギ Ang2
	K _d [M]	K _d [M]	K _d [M]
アイリーア	N.B.	1.41E-09	N.T.
ファリシマブ	N.B.	5.10E-09	8.21E-08
IGT-427	< 6.42E-11	1.07E-09	N.T.
20kPEG-IGT-427	< 1.27E-10	2.50E-09	N.T.
40kPEG-IGT-427	< 1.30E-10	3.30E-09	N.T.

Fig. 18C

【図 19 - 1】



【図 19 - 2】

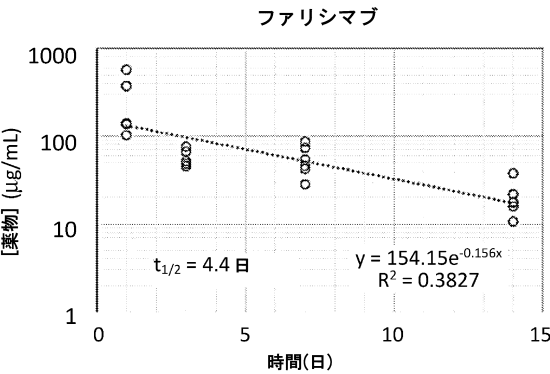
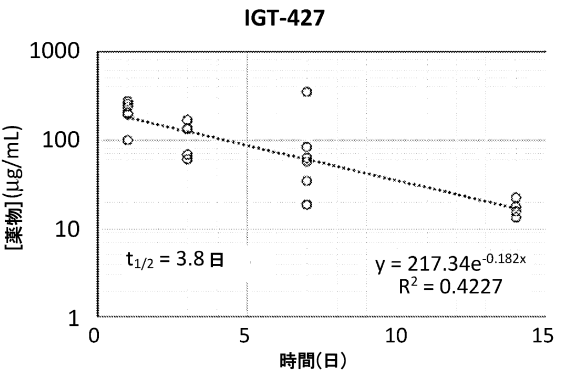
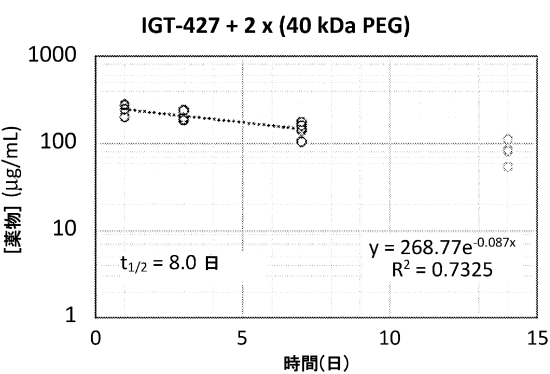
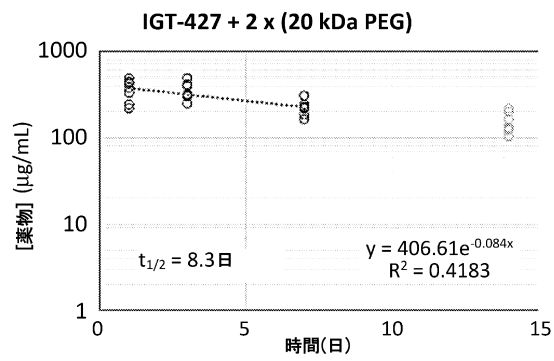


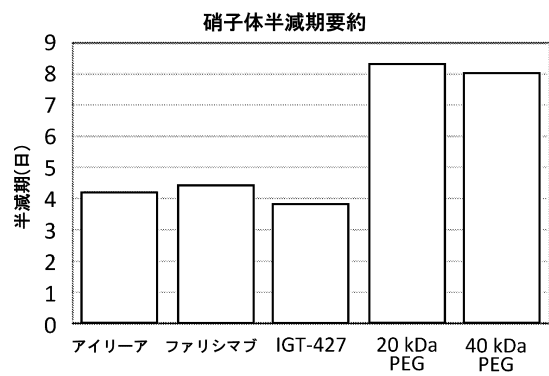
Fig. 19

Fig. 19 (cont.)

【 図 1 9 - 3 】



10



20

Fig. 19 (cont.)

【 配 列 表 】

202550370400001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/060582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - INV. - C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 9/00; A61P 35/00 (2023.01) ADD. - C12N 5/10; C12N 15/85 (2023.01) CPC - INV. - C07K 16/2863; A61K 39/3955; C07K 16/2803; A61P 9/00; A61P 35/00 (2023.02) ADD. - A61K 2039/505; C07K 2317/75; C07K 2319/32; C12N 15/85; C12N 5/10 (2023.02) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021/0155697 A1 (UNITY BIOTECHNOLOGY INC.) 27 May 2021 (27.05.2021) entire document	1, 2, 4
Y		3
Y	US 2019/0225710 A1 (QUADRUCPT BIO LIMITED) 25 July 2019 (25.07.2019) entire document	3
A	US 2020/0002426 A1 (GENSUN BIOPHARMA INC.) 02 January 2020 (02.01.2020) entire document	1-4
A	US 2018/0291105 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.) 11 October 2018 (11.10.2018) entire document	1-4
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 March 2023		Date of mailing of the international search report APR 17 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/060582

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/060582

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-83
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	Z	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60		
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		

(32)優先日 令和4年4月28日(2022.4.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100196483

弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100216839

弁理士 大石 敏幸

(74)代理人 100228980

弁理士 副島 由加里

(74)代理人 100151448

弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 チュ, ミンキュン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142, ケンブリッジ、イースト・ケンドール・ストリート・650、イノベーション・センター・バイオラプス、セカンド・フロア

(72)発明者 キム, クワンズ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02142, ケンブリッジ、イースト・ケンドール・ストリート・650、イノベーション・センター・バイオラプス、セカンド・フロア

(72)発明者 ハン, サンヨル
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・０２１４２, ケンブリッジ、イースト・ケンドール・ストリート・６５０、イノベーション・センター・バイオラプス、セカンド・フロア

(72)発明者 ドゥロスト, フィリップ
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・０２１４２, ケンブリッジ、イースト・ケンドール・ストリート・６５０、イノベーション・センター・バイオラプス、セカンド・フロア

F ターム (参考) 4B064 AG01 CA19 CC24 CE12 DA01
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24
 CA44
 4C076 AA95 CC50 EE59
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 BA37 BA41 BA42 CA53
 DC50 NA14 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZB261 ZB262
 4C085 AA13 AA14 BB11 DD62 EE01 GG01
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 BA57 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74