

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-543158
(P2024-543158A)

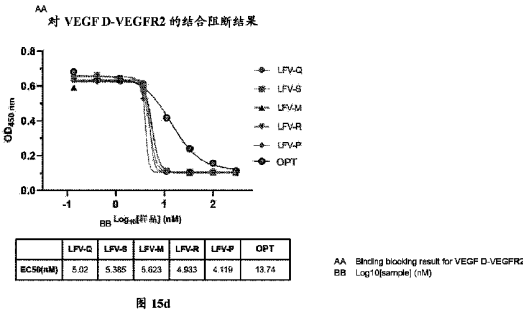
(43)公表日 令和6年11月19日(2024.11.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/71 (2006.01)	C 0 7 K	14/71	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 B 0 6 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 C 0 8 4
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全83頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-531308(P2024-531308)				
(86)(22)出願日	令和3年11月24日(2021.11.24)				
(85)翻訳文提出日	令和6年5月23日(2024.5.23)				
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/132735				
(87)国際公開番号	WO2023/092324				
(87)国際公開日	令和5年6月1日(2023.6.1)				
(81)指定国・地域	AP(BW,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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK ,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,G N,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG), AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,B				
		最終頁に続く			(71)出願人 524195916 スーチョウ ライト フェリー バイオメ ッド. カンパニー, リミティド 中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 0 0 0, スーチョウ, シアンチョン ディ ストリクト, ホアンタイ タウン, チャ ンピン ロード 1 7, ビルディング 1, ルーム 4 0 7 (71)出願人 524195927 ホンコン ライト フェリー バイオメッ ド. リミティド 中華人民共和国, ホンコン, カウルー ン, モン コック, ネイサン ロード 6 7 8, ホア チーアオ コマーシャル セン ター, 1 2 /フロア, ユニット シー 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重特異性リガンド結合分子及びその用途

(57)【要約】

本発明は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCを含む1つ以上の増殖因子に結合することができるリガンド結合分子、並びにリガンド結合分子のグリコシル化修飾型、そのようなリガンド結合分子を含有する融合タンパク質及び組成物、並びにそれらの調製方法及び使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

VEGFR2由来配列を含む単離されたリガンド結合分子であって、前記VEGFR2由来配列は、以下のアミノ酸配列：

- (a) 配列番号2の123位～327位に示されるアミノ酸配列；
- (b) 配列番号2の117位～327位に示されるアミノ酸配列；
- (c) 配列番号2の117位～421位に示されるアミノ酸配列；
- (d) 配列番号2の23位～327位に示されるアミノ酸配列；及び
- (e) 配列番号2の23位～421位に示されるアミノ酸配列；

のいずれかと少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列であり、

前記リガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCに結合することができる、リガンド結合分子。

【請求項 2】

天然VEGFR2と比較して、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCのうちの少なくとも3つに対する結合能力が増強されている、請求項1に記載のリガンド結合分子。

【請求項 3】

前記VEGFR2由来配列が、例えば、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個のアミノ酸が切断された、(a)～(e)のいずれか1つのN末端及び／又はC末端切断断片である、請求項1又は2に記載のリガンド結合分子。

【請求項 4】

前記VEGFR2由来配列が、天然VEGFR2における対応する位置の配列と比較して、1つ以上のアミノ酸の挿入、置換、又は欠失、任意選択で、例えば、NをQ又はAに変異させて、NXT又はNXSTリアミノ酸を排除するためのグリコシル化部位における挿入、欠失、又は置換を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。

【請求項 5】

前記グリコシル化部位が、配列番号2に対応するアミノ酸位46、66、96、143、158、245、及び318からなる群から選択される、請求項4に記載のリガンド結合分子。

【請求項 6】

前記グリコシル化部位における前記置換が、N143A、N143Q、N158A、N158Q、N245Q、及びN318Qから選択される、請求項5に記載のリガンド結合分子。

【請求項 7】

前記VEGFR2由来配列が、配列番号4～15及び18からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、又は前記アミノ酸配列からなる、請求項1～6のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。

【請求項 8】

VEGFR1由来配列又はVEGFR3由来配列を更に含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。

【請求項 9】

前記VEGFR1由来配列が、

(i) 配列番号1の132～230位に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに

(ii) 例えば、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個のアミノ酸が切断された、(i)のアミノ酸配列のN末端及び／又はC末端が切断されたアミノ酸配列

からなる群から選択される、請求項8に記載のリガンド結合分子。

【請求項 10】

VEGFR1由来配列に作動可能に連結された配列番号2の117～327位又は123～327位に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項8又は9に記載のリガンド結合分子。

【請求項11】

配列番号16～17及び19～21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、又は前記アミノ酸配列からなる、請求項10に記載のリガンド結合分子。

【請求項12】

前記VEGFR3由来配列が、

(i) 配列番号3の25～216位に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列、並びに

(ii) 例えば、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個のアミノ酸が切断された、(i)のアミノ酸配列のN末端及び／又はC末端が切断されたアミノ酸配列

からなる群から選択される、請求項8に記載のリガンド結合分子。

【請求項13】

前記VEGFR3由来配列に作動可能に連結された、配列番号2の117～327位、123～327位、又は221～327位に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項8又は12に記載のリガンド結合分子。

【請求項14】

配列番号22～30からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、又は前記アミノ酸配列からなる、請求項13に記載のリガンド結合分子。

【請求項15】

免疫グロブリンのFc領域、好ましくは、ヒトIgG1又はその変異体のFc領域を含み、任意選択で、ヒンジ領域も含む、請求項1～14のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。

【請求項16】

前記免疫グロブリンの前記Fc領域が、リンカーを介して前記VEGFR2由来配列、前記VEGFR1由来配列、又は前記VEGFR3由来配列のC末端に連結されている、請求項15に記載のリガンド結合分子。

【請求項17】

前記Fc領域が、配列番号31のアミノ酸104～330の配列に示される、請求項15又は16に記載のリガンド結合分子。

【請求項18】

配列番号32～59のいずれかの配列を含む、又は前記アミノ酸配列からなる、請求項15～17のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。

【請求項19】

請求項1～18のいずれか一項に記載のリガンド結合分子をコードするポリヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項20】

請求項19に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項21】

請求項19に記載の単離された核酸分子又は請求項20に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項22】

リガンド結合分子を調製する方法であって、

請求項21に記載の宿主細胞を適切な条件下で培養して、前記リガンド結合分子を発現させる工程と、

前記宿主細胞の培養上清から前記リガンド結合分子を単離する工程と、を含む、方法。

【請求項23】

10

20

30

40

50

請求項 1～18 のいずれか 1 つに記載のリガンド結合分子と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 24】

局所投与、硝子体内注射、又は硝子体内インプラント投与のために製剤化された、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

対象における血管新生又は血管新生によって引き起こされる疾患若しくは状態の治療における使用のための、請求項 1～18 のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。

【請求項 26】

血管新生によって引き起こされる眼疾患が、網膜血管新生及び脈絡膜血管新生によって引き起こされる眼疾患を含む、請求項 25 に記載の使用のためのリガンド結合分子。

10

【請求項 27】

前記疾患又は状態が、脈絡膜血管症又は新生血管、網膜血管新生、黄斑血管新生、及び眼底漏出に関連する眼障害からなる群から選択される、請求項 25 に記載の使用のためのリガンド結合分子。

【請求項 28】

前記リガンド結合分子が、硝子体内注射又は硝子体内インプラント投与によって投与される、請求項 25～27 のいずれか一項に記載の使用のためのリガンド結合分子。

【請求項 29】

対象において血管新生又は血管新生によって引き起こされる疾患若しくは状態を予防、阻害又は治療する方法であって、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載のリガンド結合分子又は請求項 23 若しくは 24 に記載の薬学的組成物を、前記対象において血管新生を阻害するのに有効な量で前記対象に投与することを含む、方法。

20

【請求項 30】

容器中に請求項 1～18 のいずれか一項に記載のリガンド結合分子又は請求項 23 若しくは 24 に記載の医薬組成物、を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質の分野に関し、特に、リガンド結合分子、そのようなリガンド結合分子のグリコシル化修飾型、融合タンパク質、及びコンジュゲート、そのような分子をコードする核酸配列、並びにそれらの調製方法及び使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

血管内皮増殖因子（VEGF としても知られている）関連遺伝子ファミリーは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、及び VEGF-E を含む種々の分泌糖タンパク質を包含する。VEGF-A は、広範な血管形成活性を有する 45,000 Da の糖タンパク質であり、その遺伝子は、8 つのエキソン及び 7 つのイントロンから構成される。VEGF-A は、異なるスプライシングパターンに基づいて 5 つの単量体、すなわち、VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF189、及び VEGF206 に分けることができ、その中でも VEGF165 は、VEGF-A の最も重要な相同単量体の 1 つである。

40

【0003】

VEGF-A は、初期血管形成において重要な役割を果たし、全ての血管新生組織において発現することができる。更に、マクロファージ、血小板、樹状細胞（DC）、活性化 T 細胞、網膜色素上皮細胞、網膜中ミュラー細胞、星状細胞、骨芽細胞、気管支及び肺胞上皮細胞、周皮細胞、血管平滑筋細胞、筋線維芽細胞、ケラチノサイト、腎メサンギウム細胞、及び腫瘍細胞などの多くの他の細胞も、低酸素ストレス条件下で VEGF-A を発現することができる。

【0004】

50

VEGF-C及びVEGF-Dは、胚及び出生後のリンパ管形成において重要な役割を果たす。VEGF-C遺伝子がホモ接合性に欠損したマウスは、胚段階で致死性であり、ヘテロ接合性欠損は、出生後マウスにおいてリンパ管発達の欠陥をもたらす。VEGF-C及びVEGF-Dはまた、特に腫瘍増殖などの病理学的段階の間、血管新生において重要な役割を果たし得る。VEGF-Eは、ヒツジOrfウイルスに感染した群から単離され、内皮細胞の増殖及び移動を刺激することができ、血管の透過性も増強することができる (Vladimir Joukov et al., The EMBO Journal 15 (2) : 290-98, Feb 1996)。

【0005】

VEGFリガンドは、複数の異なる受容体を介して（すなわち、リガンド-受容体相互作用を介して）血管形成を媒介する。2つの受容体が、内皮細胞において、特殊な受容体チロシンキナーゼ (RTK) VEGFR-1 (Flt-1) 及び VEGFR-2 (Flk-1) として最初に確認された。後に、それらが成体における種々の造血細胞系統上でも発現されることが確認された。これらの2つの受容体は、7つの免疫グロブリン様構造を有する細胞外領域、膜領域、及びチロシンキナーゼ領域からなり、両方ともRTKタイプIIIに属する膜貫通受容体であり、それらの共通の特徴は、触媒ドメイン内のチロシンキナーゼ挿入領域の存在であり、このチロシンキナーゼの活性は、受容体のリガンドへの結合によって活性化され、受容体リン酸化は、細胞成長及び分化において重要な役割を果たす多くの細胞内酵素反応及び他の反応をもたらすことができる。最近、更なるRTKであるVEGFR3 (Flt-4) が確認され、リンパ管形成に密接に関連することが見出された。異なるVEGFファミリーメンバーは、異なる受容体結合部位を有する。

【0006】

血管形成の阻害は、腫瘍増殖及び眼血管増殖などの血管形成関連疾患に対する有効な治療選択肢である。過去数十年にわたって、VEGF関連のシグナル伝達に関して広範な研究が行われており、ルセンティス (ラニビズマブ)、アイリーア (アフリベルセプト)、アバスチン (ベバシズマブ)、サイラムザ (ラムシルマブ)、インライタ (アキシチニブ)、スチバーガ (レゴラフェニブ)、コメトリク (カボザンチニブ)、OFEV (ニンテダニブ) 及びレンビマ (レンバチニブ) など、治療に使用される多くの薬物が存在する。

【0007】

滲出型加齢黄斑変性 (wAMD) 及び糖尿病性黄斑浮腫 (DME) は、広範囲の患者を襲い、急速に進行し、失明の最も重要な誘因である疾患 (視力喪失) の発症後に深刻な結果を引き起こす。現在の主な治療様式は、VEGF-Aを標的とするものであり、これは、従来の治療手段 (レーザー光凝固など) よりも著しく改善された治療効果を有し、対応する標的薬物 (例えば、ラニビズマブ及びアフリベルセプト) もまた、大きな市場での成功を達成している。しかしながら、VEGF-A単独を標的とすることによっては、依然としてこれらの疾患を完全に克服することができず、例えば、AMD治療後、患者の3分の1しか治療から完全に利益を得ることができない一方で、残りの患者は視力の有意な向上を得られず、患者の3分の1は依然として失明に近い視力を有する (Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, Sadda SR, Zhang K. Seven-Year Outcomes in Ranibizumab-Treated Patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: A multicenter cohort study (SEVEN UP) [J]. Ophthalmology, 2013, 120 (11) : 2292-2299)。現在、市販されている及び臨床試験中のVEGF-Aを標的とする複数の薬物は全て、pM~nMレベルの範囲の親和性 (K_D) で、臨床治療において同様の有効性を示しており、単一の標的VEGF-A療法がその治療有効性の上限に達し得たことを示している。

【0008】

要約すると、過去数十年間にVEGF関連シグナル伝達に関して広範な研究が行われてきたが、血管新生及び腫瘍などの関連疾患における明らかな満たされていない臨床ニーズが依然として存在する。本発明は、この必要性に対する新しい解決策を提示する。本発明

10

20

30

40

50

は、血管新生関連疾患の治療に重要な臨床的意義を有する、VEGF、PLGF、及びPDGFファミリーを標的とすることができる新規分子を提供する。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-A、PDGF-B及びPDGF-Cを含む1つ以上の増殖因子に結合することができるリガンド結合分子（すなわち、多重特異性リガンド結合分子）、並びにそれらのグリコシル化修飾型、そのようなリガンド結合分子を含む組成物、並びにそれらの調製方法及び使用に関する。本発明は更に、インビボ及びインビトロでのリガンド結合分子の効果、特に抗血管形成における使用での効果を検証する。

10

【0010】

いくつかの態様では、本開示は、VEGFR2に由来するアミノ酸配列を含み、天然VEGFR2（例えば、細胞外配列Met1-Glu764などの天然完全VEGFR2細胞外ドメイン）と比較して、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-A、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCのうちの少なくとも1つ、より好ましくは2つ、より好ましくは3つ、より好ましくは4つ、より好ましくは5つ、より好ましくは6つ、最も好ましくは7つに対する結合能力が増強されている、単離されたリガンド結合分子を提供する。VEGFR2由来配列は、以下のアミノ酸配列：

（a）配列番号2の117～218位によって定義されるアミノ酸配列（例えば、LFV-A）；

20

（b）配列番号2の117～327位によって定義されるアミノ酸配列（例えば、LFV-B）；

（c）配列番号2の123～327位によって定義されるアミノ酸配列（例えば、LFV-C、LFV-G、LFV-H、LFV-I、LFV-J、LFV-K、及びLFV-L）；

（d）配列番号2の117～421位によって定義されるアミノ酸配列（例えば、LFV-D）；

（e）配列番号2の23～327位によって定義されるアミノ酸配列（例えば、LFV-E）；並びに

（f）配列番号2の23～421位によって定義されるアミノ酸配列（例えば、LFV-F）；のいずれかと少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列である。

30

【0011】

いくつかの実施形態では、VEGFR2に由来するアミノ酸配列は、例えば、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個のアミノ酸が切断された、（a）～（f）のいずれか1つのN末端及び／又はC末端切断断片である、又はそれからなる。

【0012】

いくつかの実施形態では、VEGFR2に由来するアミノ酸配列は、天然VEGFR2細胞外ドメインにおける対応する位置の配列と比較して、1つ以上のアミノ酸の挿入、置換、又は欠失、例えば、グリコシル化部位における挿入、欠失、又は置換を含む。

【0013】

40

いくつかの実施形態では、グリコシル化を除去するために、特に、例えば、NをQ又はAに変異させることによって、「NXT」及び／又は「NXS」トリアミノ酸などの既知のグリコシル化部位を排除するために、グリコシル化部位で様々な修飾を行うことができる。特定のグリコシル化部位は、例えば、配列番号2のアミノ酸位46、66、96、143、158、245、及び318に対応する位置から選択することができる。いくつかの実施形態では、上記の位置のAsnは、Gln若しくはAla又は他の適切なアミノ酸で置換される。具体的には、グリコシル化部位の置換は、N143A、N143Q、N158A、N158Q、N245Q、及びN318Qから選択することができる。

【0014】

いくつかの実施形態では、VEGFR2に由来するアミノ酸配列は、配列番号4～15

50

及び 18 から選択されるアミノ酸配列を含む、又は該アミノ酸配列からなる。

【0015】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、VEGFR2 に由来するアミノ酸配列に加えて、VEGFR1 に由来するアミノ酸配列を含む。VEGFR1 由来配列は、以下の群：

(i) 配列番号 1 の 132～230 位に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列；並びに

(ii) 例えば、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 個のアミノ酸が切断された、(i) のアミノ酸配列の N 末端及び／又は C 末端が切断されたアミノ酸配列；から選択することができる。

10

【0016】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、VEGFR1 由来配列に作動可能に連結された配列番号 2 の 117～327 位又は 123～327 位に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、リガンド結合分子は、配列番号 16～17 及び 19～21 から選択されるアミノ酸配列を含む、又は該アミノ酸配列からなる。

【0017】

いくつかの他の実施形態では、リガンド結合分子は、VEGFR2 に由来するアミノ酸配列に加えて、VEGFR3 に由来するアミノ酸配列を含む。VEGFR3 由来配列は、以下の群：

20

(i) 配列番号 3 の 25～216 位、25～115 位、47～115 位、154～210 位、248～314 位、又は 25～329 位に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列；並びに

(ii) 例えば、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 個のアミノ酸が切断された、(i) のアミノ酸配列の N 末端及び／又は C 末端が切断されたアミノ酸配列；から選択することができる。

【0018】

いくつかの他の実施形態では、リガンド結合分子は、VEGFR3 由来配列に作動可能に連結された配列番号 2 の 117～327 位、123～327 位、又は 221～312 位に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、リガンド結合分子は、配列番号 22～30 から選択されるアミノ酸配列を含む、又は該アミノ酸配列からなる。

30

【0019】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、IgA、IgM、IgE、IgD、並びに IgG1、IgG2、IgG3、及び IgG4 を含む IgG からなる群から選択される免疫グロブリンの Fc 領域、好ましくはヒト IgG1 又はその変異体の Fc 領域を更に含み、任意選択で、ヒンジ領域も含む。免疫グロブリンのヒンジ領域及び Fc 領域は、リンカー（例えば、GPG）を介して、又はリンカーなしで、VEGFR2 由来配列、VEGFR1 由来配列、又は VEGFR3 由来配列の C 末端に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、Fc 領域又はその変異体は、リン脂質などの高分子化合物を含むポリマー形態で存在する。

40

【0020】

いくつかの実施形態では、Fc 領域は、配列番号 31 のアミノ酸 104～330 の配列に示される。

【0021】

いくつかの特定の実施形態では、本明細書に開示されるリガンド結合分子は、配列番号 32～59 のいずれかの配列を含む、又は該配列からなる。

【0022】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、シグナルペプチドを更に含む。

【0023】

50

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCタンパク質の少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ、より好ましくは少なくとも4つ、より好ましくは少なくとも5つ、より好ましくは少なくとも6つ、より好ましくは少なくとも7つ、より好ましくは少なくとも8つ、より好ましくは9つ全てに結合することができる。好ましくは、リガンド結合分子は複数の標的に結合することができ、すなわち、それらは多重特異性リガンド結合分子である。VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCタンパク質は、ヒト、マウス、ラット又はカニクイザルからのものであり得る、又はそれらに由来し得る。例えば、上記のタンパク質は、プロセシング型又は非プロセシング型、並びにリン酸化型又は非リン酸化型を含む、ヒト起源のものであり得る。

10

【0024】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、SPRによって決定される場合、5 nM以下の K_D で、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、及びPDGF-ABのうちの少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ、最も好ましくは4つ全てに結合することができる。

【0025】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、SPRによって決定される場合、50 pM以下、好ましくは40 pM以下、より好ましくは30 pM以下、より好ましくは20 pM以下、より好ましくは10 pM以下、より好ましくは5 pM以下、より好ましくは4 pM以下、より好ましくは3 pM以下、又はより好ましくは1 pM以下の K_D で、VEGF-A及びVEGF-Cのうちの少なくとも1つに結合することができる。

20

【0026】

いくつかの実施形態は、リガンド結合分子は、SPRによって決定される場合、20 nM以下、好ましくは15 nM以下、より好ましくは10 nM以下、より好ましくは5 nM以下、更により好ましくは3 nM以下の K_D でVEGF-Dに結合することができる。

【0027】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB及びPDGF-CCの少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つ、より好ましくは4つ全てに、SPRによって測定した場合に、50 nM以下、好ましくは40 nM以下、より好ましくは30 nM以下、より好ましくは28 nM以下、より好ましくは26 nM以下、より好ましくは24 nM以下、より好ましくは22 nM以下、より好ましくは20 nM以下、より好ましくは18 nM以下、より好ましくは15 nM以下、更により好ましくは10 nM以下の K_D で結合することができる。

30

【0028】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCタンパク質の少なくとも1つの、それらの対応する受容体への結合を阻害又は遮断することができる。

40

【0029】

いくつかの実施形態では、受容体は、VEGFR-1受容体、VEGFR-2受容体、VEGFR-3受容体、PDGFR- α 受容体、及びPDGFR- β 受容体から選択される。受容体は、それらが生理学及び病理学において機能する結合型に応じて、単量体、ホモ二量体、又は互いの間で形成される任意のヘテロ二量体型で存在し得る。

【0030】

いくつかの態様では、本発明はまた、異種ペプチドに作動可能に連結された上記に開示されたリガンド結合分子を含む、融合タンパク質を提供する。異種ペプチドは、追加のリガンド結合分子、例えば、一般的なヒト受容体タンパク質の細胞外ドメイン（ECD）又はその切断及び組換えペプチド；抗体可変領域断片及びそれらの組み合わせ、例えば、抗

50

体 Fab、単鎖抗体 (scFv)、単ドメイン抗体 (ナノボディ)、ヒト重鎖可変領域単ドメイン抗体 (V_H) ; 活性ポリペプチド及びタンパク質アプタマーから選択することができる。

【0031】

いくつかの実施形態では、異種ペプチドは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC、PDGF-DD、Ang-2、TGF-β、CTGF (結合組織増殖因子)、EGF (上皮増殖因子)、S1P、ガレクチン、デコリン、又は前述のタンパク質の受容体を標的とする異種ペプチドである。

【0032】

いくつかの実施形態では、作動可能な連結は、直接連結又はリンカーを介した連結のいずれかである。

【0033】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、異種ペプチドのN末端又はC末端に直接又はリンカーを介して連結される。例えば、リガンド結合分子は、そのC末端でペプチド結合を介して異種ペプチドのN末端に直接連結され、又はそのN末端でペプチド結合を介して異種ペプチドのC末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリペプチド又は化学基である。

【0034】

いくつかの態様では、本発明はまた、修飾部分、毒素 (例えば、化学療法剤)、検出可能な標識 (例えば、放射性同位体、ランタニド元素、発光標識、蛍光標識、若しくは酵素基質標識)、又は精製部分から選択される少なくとも1つの部分にコンジュゲートされた、上記のリガンド結合分子又は融合タンパク質を含む、コンジュゲートを提供する。例えば、修飾部分はポリエチレングリコール部分であり、任意選択で、ポリエチレングリコール部分は、リガンド結合分子のアミノ末端に結合される。

【0035】

いくつかの態様では、本発明はまた、リガンド結合分子又は融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。核酸分子は、ポリヌクレオチド配列に連結されたプロモーター配列又は他の調節配列を更に含み得る。

【0036】

いくつかの態様では、本発明はまた、核酸分子を含む、ベクターを提供する。ベクターとしては、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、リポソームベクター、及びそれらの任意の組み合わせが挙げられ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ベクターは、複製欠損アデノウイルスベクターであり、核酸分子は、プロモーターに作動可能に連結されており、アデノウイルスポリヌクレオチド配列に隣接している。

【0037】

いくつかの態様では、本発明はまた、上記のポリヌクレオチド又はベクターで形質転換又はトランスフェクトされた、宿主細胞を提供する。宿主細胞は、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞又はヒト細胞などの真核細胞である。

【0038】

いくつかの態様では、本発明はまた、リガンド結合分子を調製する方法であって、以下の工程：

適切な条件下で上記のように宿主細胞を培養して、リガンド結合分子を発現させる工程と、宿主細胞の培養上清からリガンド結合分子を単離する工程と、を含む、方法を提供する。

【0039】

いくつかの態様では、本発明はまた、上記に開示されるリガンド結合分子若しくは融合タンパク質又はリガンド結合分子をコードする核酸分子と、希釈剤又は賦形剤などの薬学的に許容されるアジュバント又は担体とを含む、医薬組成物を提供する。組成物は、局所

10

20

30

40

50

投与又は硝子体内注射又はインプラント（埋め込み）投与のために製剤化され得る。組成物は、固体、ペースト、軟膏、ゲル、液体、エアロゾル、スプレー、ポリマー、フィルム、エマルジョン、又は懸濁液の形態であり得る。

【0040】

いくつかの態様では、本発明はまた、対象における血管新生及び血管新生によって引き起こされる疾患又は状態を予防、阻害及び／又は治療する方法であって、本明細書に開示されるリガンド結合分子又は医薬組成物を、対象における血管新生を阻害するのに有効な量で対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0041】

いくつかの実施形態では、血管新生は、網膜血管新生、及び／又は脈絡膜血管新生である。

10

【0042】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、脈絡膜血管症又は血管新生、網膜血管新生、黄斑血管新生、及び眼底漏出に関連する眼障害から選択される。

【0043】

いくつかの実施形態では、組成物は、対象の眼に局所的に投与され、例えば、組成物は、硝子体内注射、硝子体内インプラントによって、又は局所投与によって投与される。

【0044】

いくつかの態様では、本発明はまた、対象における血管新生及び血管新生によって引き起こされる疾患又は状態を治療するための医薬の製造における、リガンド結合分子又は融合タンパク質の使用を提供する。

20

【0045】

いくつかの態様では、本発明はまた、対象における血管新生及び血管新生によって引き起こされる疾患又は状態の治療に使用するための、リガンド結合分子又は融合タンパク質を提供する。

【0046】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載のリガンド結合分子若しくは融合タンパク質又は医薬組成物、を含むキットを提供する。

【0047】

上記は概要であり、したがって、必要に応じて詳細の簡略化、汎化、及び省略が含まれる。したがって、当業者であれば、概要は例示的なものにすぎず、決して限定することを意図していないことを理解するであろう。本明細書に記載される方法、組成物及び使用、並びに／又は他の主題の他の態様、特徴、及び利点は、本明細書に示される教示において明らかになるであろう。

30

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1a】 VEGFR2 及び VEGFR3 に由来する様々な融合タンパク質リガンド結合分子の VEGF-A165（図1a）、VEGF-C（図1b）、又は VEGF-D（図1c）への結合についての ELISA 結果を示す。

【図1b】 VEGFR2 及び VEGFR3 に由来する様々な融合タンパク質リガンド結合分子の VEGF-A165（図1a）、VEGF-C（図1b）、又は VEGF-D（図1c）への結合についての ELISA 結果を示す。

40

【図1c】 VEGFR2 及び VEGFR3 に由来する様々な融合タンパク質リガンド結合分子の VEGF-A165（図1a）、VEGF-C（図1b）、又は VEGF-D（図1c）への結合についての ELISA 結果を示す。

【0049】

【図2】 VEGFR2 に由来する様々なリガンド結合分子の VEGF-C への結合についての ELISA 結果を示す。

【0050】

【図3a】 それぞれ、VEGFR2-VEGF C 間（図3a）、VEGFR2-VEG

50

F D間（図3b）、VEGFR3-VEGF C間（図4a）、及びVEGFR3-VEGF D間（図4b）の結合に対する種々のリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図3b】それぞれ、VEGFR2-VEGF C間（図3a）、VEGFR2-VEGF D間（図3b）、VEGFR3-VEGF C間（図4a）、及びVEGFR3-VEGF D間（図4b）の結合に対する種々のリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図4a】それぞれ、VEGFR2-VEGF C間（図3a）、VEGFR2-VEGF D間（図3b）、VEGFR3-VEGF C間（図4a）、及びVEGFR3-VEGF D間（図4b）の結合に対する種々のリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図4b】それぞれ、VEGFR2-VEGF C間（図3a）、VEGFR2-VEGF D間（図3b）、VEGFR3-VEGF C間（図4a）、及びVEGFR3-VEGF D間（図4b）の結合に対する種々のリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【0051】

【図5a】VEGFR2に由来する様々なリガンド結合分子の、VEGF-A165（図5a）及びVEGF-A121（図5b）への結合についてのELISA結果を示す。

【図5b】VEGFR2に由来する様々なリガンド結合分子の、VEGF-A165（図5a）及びVEGF-A121（図5b）への結合についてのELISA結果を示す。

【0052】

【図6a】それぞれ、VEGFR2-VEGFA165間（図6a）及びVEGFR2-VEGF-A121間（図6b）の結合に対する様々なリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図6b】それぞれ、VEGFR2-VEGFA165間（図6a）及びVEGFR2-VEGF-A121間（図6b）の結合に対する様々なリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【0053】

【図7】マウスにおけるリガンド結合分子についての薬物動態結果を示す。

【0054】

【図8】ラットCNVモデルにおけるリガンド結合分子の治療効果を示す。

【0055】

【図9a】VEGFA165-VEGFR2（図9a）、VEGFC-VEGFR2（図9b）、VEGFD-VEGFR2（図9c）、及びVEGFD-VEGFR3（図9d）に対するグリコシル化修飾を除去したリガンド結合分子についての遮断ELISAの結果を示す。

【図9b】VEGFA165-VEGFR2（図9a）、VEGFC-VEGFR2（図9b）、VEGFD-VEGFR2（図9c）、及びVEGFD-VEGFR3（図9d）に対するグリコシル化修飾を除去したリガンド結合分子についての遮断ELISAの結果を示す。

【図9c】VEGFA165-VEGFR2（図9a）、VEGFC-VEGFR2（図9b）、VEGFD-VEGFR2（図9c）、及びVEGFD-VEGFR3（図9d）に対するグリコシル化修飾を除去したリガンド結合分子についての遮断ELISAの結果を示す。

【図9d】VEGFA165-VEGFR2（図9a）、VEGFC-VEGFR2（図9b）、VEGFD-VEGFR2（図9c）、及びVEGFD-VEGFR3（図9d）に対するグリコシル化修飾を除去したリガンド結合分子についての遮断ELISAの結果を示す。

【0056】

【図10a】VEGFA165-VEGFR2（図10a）、VEGFA165-VEG

10

20

30

40

50

FR1 (図10b)、VEGFC-VEGFR2 (図10c)、VEGFD-VEGFR2 (図10d)、及びVEGFD-VEGFR3 (図10e) に対するVEGFR1 及び VEGFR2 に由来するリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図10b】VEGFA165-VEGFR2 (図10a)、VEGFA165-VEGFR1 (図10b)、VEGFC-VEGFR2 (図10c)、VEGFD-VEGFR2 (図10d)、及びVEGFD-VEGFR3 (図10e) に対するVEGFR1 及び VEGFR2 に由来するリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図10c】VEGFA165-VEGFR2 (図10a)、VEGFA165-VEGFR1 (図10b)、VEGFC-VEGFR2 (図10c)、VEGFD-VEGFR2 (図10d)、及びVEGFD-VEGFR3 (図10e) に対するVEGFR1 及び VEGFR2 に由来するリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図10d】VEGFA165-VEGFR2 (図10a)、VEGFA165-VEGFR1 (図10b)、VEGFC-VEGFR2 (図10c)、VEGFD-VEGFR2 (図10d)、及びVEGFD-VEGFR3 (図10e) に対するVEGFR1 及び VEGFR2 に由来するリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図10e】VEGFA165-VEGFR2 (図10a)、VEGFA165-VEGFR1 (図10b)、VEGFC-VEGFR2 (図10c)、VEGFD-VEGFR2 (図10d)、及びVEGFD-VEGFR3 (図10e) に対するVEGFR1 及び VEGFR2 に由来するリガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【0057】

【図11a】VEGFR1 及びVEGFR2 に由来するリガンド結合分子のVEGF-B (図11a) 及びPLGF (図11b) への結合についてのELISA結果を示す。

【図11b】VEGFR1 及びVEGFR2 に由来するリガンド結合分子のVEGF-B (図11a) 及びPLGF (図11b) への結合についてのELISA結果を示す。

【0058】

【図12a】VEGFA165-VEGFR2 (図12a)、VEGFC-VEGFR2 (図12b) 及びVEGFD-VEGFR2 (図12c) に対する融合及びグリコシル化修飾リガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図12b】VEGFA165-VEGFR2 (図12a)、VEGFC-VEGFR2 (図12b) 及びVEGFD-VEGFR2 (図12c) に対する融合及びグリコシル化修飾リガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図12c】VEGFA165-VEGFR2 (図12a)、VEGFC-VEGFR2 (図12b) 及びVEGFD-VEGFR2 (図12c) に対する融合及びグリコシル化修飾リガンド結合分子についての遮断ELISA結果を示す。

【0059】

【図13a】VEGF-B (図13a) 及びPLGF (図13b) へのLFV-Qの結合についてのELISA結果を示す。

【図13b】VEGF-B (図13a) 及びPLGF (図13b) へのLFV-Qの結合についてのELISA結果を示す。

【0060】

【図14】グリコシル化部位除去の前後のLFV-Mについての1ステップ精製後のSEC単一ピーク純度の検出結果を示す。

【0061】

【図15a】VEGFA165-VEGFR2 (図15a)、VEGFA165-VEGFR1 (図15b)、VEGFC-VEGFR2 (図15c)、及びVEGFD-VEGFR2 (図15d) に対するLFV-Q、LFV-S、LFV-M、及びLFV-R分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図15b】VEGFA165-VEGFR2 (図15a)、VEGFA165-VEGFR1 (図15b)、VEGFC-VEGFR2 (図15c)、及びVEGFD-VEGFR2 (図15d) に対するLFV-Q、LFV-S、LFV-M、及びLFV-R分子

10

20

30

40

50

についての遮断ELISA結果を示す。

【図15c】VEGFA165-VEGFR2（図15a）、VEGFA165-VEGFR1（図15b）、VEGFC-VEGFR2（図15c）、及びVEGFD-VEGFR2（図15d）に対するLFV-Q、LFV-S、LFV-M、及びLFV-R分子についての遮断ELISA結果を示す。

【図15d】VEGFA165-VEGFR2（図15a）、VEGFA165-VEGFR1（図15b）、VEGFC-VEGFR2（図15c）、及びVEGFD-VEGFR2（図15d）に対するLFV-Q、LFV-S、LFV-M、及びLFV-R分子についての遮断ELISA結果を示す。

【0062】

【図16a】VEGF-B（図16a）及びPLGF（図16b）へのLFV-Q、LFV-S、LFV-M及びLFV-Rの結合についてのELISA結果を示す。

【図16b】VEGF-B（図16a）及びPLGF（図16b）へのLFV-Q、LFV-S、LFV-M及びLFV-Rの結合についてのELISA結果を示す。

【0063】

【図17a】VEGFR2-Fcと比較した、VEGF-A（図17a）、VEGF-C（図17b）及びVEGF-D（図17c）に対するLFV-Q、LFV-B、LFV-R及びLFV-CのELISA結合効力を示す。

【図17b】VEGFR2-Fcと比較した、VEGF-A（図17a）、VEGF-C（図17b）及びVEGF-D（図17c）に対するLFV-Q、LFV-B、LFV-R及びLFV-CのELISA結合効力を示す。

【図17c】VEGFR2-Fcと比較した、VEGF-A（図17a）、VEGF-C（図17b）及びVEGF-D（図17c）に対するLFV-Q、LFV-B、LFV-R及びLFV-CのELISA結合効力を示す。

【0064】

【図18a】HUVEC細胞の増殖に対するLFV-R及びLFV-Qの阻害効果についての実験結果を示す。

【図18b】HUVEC細胞の増殖に対するLFV-R及びLFV-Qの阻害効果についての実験結果を示す。

【0065】

【図19a】ラットにおけるレーザー誘発脈絡膜血管新生に対するLFV-R及びLFV-Qの治療効果についての実験結果を示す。

【図19b】ラットにおけるレーザー誘発脈絡膜血管新生に対するLFV-R及びLFV-Qの治療効果についての実験結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0066】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって共通して理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で引用される全ての特許、特許出願、及び他の刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される定義が、参照により本明細書に組み込まれる特許、特許出願、及び他の刊行物に記載されるものと矛盾する場合、本明細書に記載される定義が優先するものとする。

【0067】

本明細書で使用される場合、「VEGF」という用語は、VEGF糖タンパク質（VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、及びVEGF-E）からなるVEGFファミリーを指す。VEGF-Aは、VEGF-Aの天然タンパク質（プロセシング型又は未プロセシング型）、全長VEGF-A、その断片（例えば、切断型、細胞外／膜貫通ドメイン）、又は変異体（例えば、スプライス変異体、対立遺伝子変異体又は操作された変異体）、及びその修飾型（例えば、グリコシル化）を含む、VEGF-Aの任意の型を包含する。ヒトの体内には、異なるスプライシングパターンに基づいてVEGF-

10

20

30

40

50

Aの5つのアイソフォーム、すなわちVEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF189及びVEGF206が存在し、そのうちVEGF165はVEGF-Aの最も重要な相同単量体である。同様に、VEGF-B、VEGF-C、及びVEGF-Dはまた、それらのそれぞれの天然タンパク質（プロセシング型又は未プロセシング型を含む）、全長若しくは断片（例えば、切断型、細胞外／膜貫通ドメイン）又は変異体（例えば、スプライス変異体、対立遺伝子変異体、又は操作された変異体）及びそれらの修飾型（例えば、グリコシル化）を包含する。

【0068】

本明細書中で使用される場合、「血管内皮増殖因子受容体」又は「VEGF受容体」という用語は、受容体チロシンキナーゼファミリーのメンバーであるVEGFR1、VEGFR2、及びVEGFR3を含む。3つの受容体は、6つ又は7つの免疫グロブリン（Ig）様ドメイン（それぞれD1～D7と呼ばれる）からなる大きな細胞外領域、単一膜貫通（TM）ヘリックス、及びチロシンキナーゼ活性を有する細胞質領域、並びに追加の調節配列を含む。「VEGFR2」、「VEGFR1」、及び「VEGFR3」への言及は、文脈に応じて、本明細書では、その細胞外ドメインの全長又は全部若しくは一部を指し得る。ヒトVEGFR2及びVEGFR3の天然タンパク質の全長アミノ酸配列の例は、それぞれ、配列番号2及び配列番号3である。全てのVEGF-Aアイソフォームは、VEGFR1及びVEGFR2の両方に結合することができ、VEGF-Bは、VEGFR-1に特異的に結合して活性化し、VEGF-Eの特異性は、VEGFR-2に関連する。VEGF-C及びVEGF-Dは、主にVEGFR3に結合することによって作用し、VEGFR2にも結合することができるが、この結合はVEGFR3に対する結合よりも弱い。VEGF-AはVEGFR2にも結合することができるが、この場合でもやはり、この結合はVEGFR1に対する結合よりも弱い。以前は、VEGFR2が複数のVEGF分子に結合することができ、その特異性がVEGFR1より劣ると考えられていたという事実により、アフリベルセプトの開発は主にVEGFR1に基づいていたが、VEGFR2、特にVEGF-C及びVEGF-Dに対するその結合特性は、これまで十分な注目及び探索の的になっていなかった。

【0069】

本明細書で使用される場合、「血小板由来増殖因子」又は「PDGF」という用語は、血管内皮増殖因子のファミリーに属しており、約30kDの相対分子量を有する糖鎖含有ポリペプチド増殖因子である。概して、PDGFは、ジスルフィド結合を介して4つのポリペプチド鎖A、B、C、及びDによって形成されるホモ二量体又はヘテロ二量体分子であり、5つのアイソフォーム、すなわちPDGF-AA、BB、AB、CC、及びDDが存在する。PDGFは、血小板のα-顆粒において最初に発見され、現在、PDGFが、二倍体細胞、例えば、単球、血管平滑筋細胞、内皮細胞、胚細胞、メサングウム細胞（MC）、及び集合管細胞によって産生され得ることが証明されている。PDGFは、周皮細胞の遊走、動員、及び分布を促進し、そのうちPDGF-Bは、身体の発達中の血管成熟及び安定化のための極めて重要な調節遺伝子である。PDGF-A、B、及びCは、リンパ管形成に対してある種の促進効果を有し、特にPDGF-Bは、リンパ管形成に対して強い促進効果を有し、血管形成と特定の関係を有すると考えられる。更に、PDGFは、最も早く発見された結合組織増殖因子であり、内皮細胞、グリア細胞、線維芽細胞、及び血管平滑筋細胞の成長及び分化を促進することができ、したがって、外傷の修復治療において臨床的に使用されている。

【0070】

本明細書で使用される場合、「PDGF-AA」、「PDGF-AB」、「PDGF-BB」、及び「PDGF-CC」という用語は、PDGFの二量体型AA、AB、BB、CC、及びそれらの断片又は変異体を指す。それらは概して、ジスルフィド結合によって固定されたホモ又はヘテロ二量体としてPDGF受容体に結合し、それらの機能を果たす。PDGFのA及びB鎖は、ホモ二量体及びヘテロ二量体の両方を形成することができる。PDGFのC鎖は、主にホモ二量体型で機能する。PDGFは、特定の細胞集団の分裂

及び増殖を刺激する能力を有する重要な分裂促進因子であり、組織の病的線維症において重要な役割を果たすことが示されている。

【0071】

P D G F 受容体は、2つのサブユニット α 及び β から構成され、 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、及び $\beta\beta$ を含む3つの二量体型を有し、これらは全てP D G F分子に結合することができる。 α ユニットは主にP D G FのA鎖、B鎖、及びC鎖を認識し、それによって、 $\alpha\alpha$ 受容体は、P D G F-A A、A B、B B、及びC Cに結合することができる。 β ユニットは主にP D G FのB鎖を認識し、それによって、 $\beta\beta$ 受容体は、主にP D G F-B Bに結合する。 $\alpha\beta$ 受容体は、P D G F-A B及びB Bに結合することができる。P D G F受容体に結合した後、P D G F分子は受容体の二量体化を促進し、これが次にシグナルを下流に伝達して、主に血管平滑筋細胞、線維芽細胞、グリア細胞、及び他の細胞において、細胞増殖の促進及び自己分泌及びパラ分泌様式での細胞走化性の刺激などの効果を生じさせる。

10

【0072】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、2つ以上の目的の生物学的配列が、それらがそれらの意図された様式で機能することを可能にする関係にあるような、2つ以上の目的の生物学的配列の並置（スペーサ又はリンカー又は挿入配列を有するか又は有していない）を指す。ポリペプチドに関して使用される場合、ポリペプチド配列が、連結産物が意図される生物学的機能を有することを可能にするような様式で連結されることを意味することが意図される。例えば、リガンド結合分子は、リガンド結合活性を有する安定な産物を提供するように、免疫グロブリンの定常領域に作動可能に連結され得る。別の例として、リガンド結合分子は、それらの間の挿入配列を介して免疫グロブリンの定常領域に作動可能に連結されてもよく、そのような挿入配列はスペーサであり得る、又はより長い配列を含有し得る。

20

【0073】

本明細書で使用される場合、「融合」又は「融合された」という用語は、アミノ酸配列（例えば、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質）に関して使用される場合、2つ以上のアミノ酸配列の、例えば、化学結合又は組換え手段による、天然に存在しない単一のアミノ酸配列への組み合わせを指す。融合アミノ酸配列は、2つのコードポリヌクレオチド配列の遺伝子組換えによって産生することができ、また組換えポリヌクレオチドを含有する構築物を宿主細胞に導入する方法によって、発現させることができる。

30

【0074】

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、人工的手段によって天然の状態から得られた状態を指す。特定の「単離された」物質又は成分が天然に存在する場合、それは、その天然環境が変化する、又はその物質が天然環境から単離される、又はその両方の理由から可能である。例えば、特定の単離されていないポリヌクレオチド又はポリペプチドは、特定の生きている動物体内に天然に存在し、そのような天然状態から単離された高純度の同じポリヌクレオチド又はポリペプチドは、単離されたポリヌクレオチド又はポリペプチドと呼ばれる。「単離された」という用語は、混合された人工物質又は合成物質も、単離された物質の活性に影響を及ぼさない他の不純な物質も除外しない。

【0075】

「同一性」という用語は、本明細書で使用される場合、配列を整列及び比較することによって決定される、2つ以上のポリペプチド分子又は2つ以上の核酸分子の配列間の関係を指す。「同一性パーセント」は、比較される分子中のアミノ酸又はヌクレオチド間の同一残基のパーセントを意味し、比較される分子の最小のサイズに基づいて計算される。これらの計算のために、整列におけるギャップ（存在する場合）は、好ましくは、特定の数学的モデル又はコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって対処される。整列された核酸又はポリペプチドの同一性を計算するために使用され得る方法としては、Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M. ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Gen

40

50

ome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; 及び Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48: 1073 に記載される方法が挙げられる。
【0076】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」又は「特異的に結合する」という用語は、2つの分子間の非ランダム結合反応、例えば、リガンドとリガンド結合分子との間の反応を指す。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンド結合分子は、 $\leq 10^{-6}$ M (例えば、 $\leq 5 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 4 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 3 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-9}$ M、又は $\leq 10^{-9}$ M) の結合親和性 (K_D 又は K_D と書かれる) でヒト VEGF-A 及び／又はヒト PDGF に特異的に結合する。SPR 実験において本明細書で提供されるように、 K_d は解離定数であり、 K_a は結合定数であり、 K_D は平衡解離定数である (K_d / K_a)。 K_D は、表面プラズモン共鳴法、マイクロスケール熱泳動法、HPLC-MS 法、及びフローサイトメトリー (例えば、FACS) 法を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の日常的な方法を使用して決定することができる。

【0077】

本明細書で使用される「結合を遮断する」能力は、本発明のリガンド結合分子が、2つの分子 (例えば、VEGF-A、C、D と、VEGFR2 との、VEGF-C、D と、VEGFR3 との) 間の結合相互作用を任意の検出可能な程度まで阻害する能力を指す。ある特定の実施形態では、2つの分子間の結合を遮断するリガンド結合分子は、2つの分子間の結合相互作用を少なくとも 85% 又は少なくとも 90% 阻害する。ある特定の実施形態では、阻害は、85% 超又は 90% 超であり得る。

【0078】

本明細書で使用される場合、「有効量／有効な量」という用語は、所望の治療レジメンに従って投与された場合に、妥当な利益／リスク比に見合った何らかの所望の治療効果をもたらすのに有効である、活性化合物、又は活性化合物を含む材料、組成物、若しくは剤形の量に関する。例えば、有効量は、本明細書において、対象における血管新生を阻害するのに有効な量、対象 (例えば、眼) における VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、及び PDGF-CC の少なくとも 1 つを有効に阻害するのに必要な量、又は眼細胞若しくは眼血管における VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3 及び PDGF 受容体ファミリーの少なくとも 1 つの発現を刺激する量を指すために使用される。

【0079】

I. VEGFR2 由来のアミノ酸配列を含むリガンド結合分子

いくつかの態様では、本発明は、1つ以上の VEGF / PDGF 分子に特異的に結合することができる、単離されたリガンド結合分子を提供する。VEGF / PDGF 分子は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及び PDGF-CC からなる群から選択され得る。

【0080】

好ましくは、リガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 及び PDGF-CC のうちの少なくとも 2 つ、より好ましくは少なくとも 3 つ、より好ましくは少なくと

10

20

30

40

50

も4つ、より好ましくは少なくとも5つ、より好ましくは少なくとも6つ、より好ましくは少なくとも7つ、更により好ましくは少なくとも8つに特異的に結合することができる。最も好ましくは、リガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCの全てに対して特異的結合親和性を有する。

【0081】

本明細書で使用される場合、「に特異的に結合する」又は「に対する特異的結合親和性」という表現は、増殖因子に言及する場合、増殖因子の循環活性型への特異的結合だけでなく、増殖因子の他の型への特異的結合も含む。例として、VEGF-Aは複数のアイソフォームを有し、そのいくつかは循環し、他のものは細胞表面上のヘパリン硫酸プロテオグリカンと会合する。VEGF-Aに特異的に結合するリガンド結合分子は、少なくとも1つの循環アイソフォーム、好ましくは全ての循環アイソフォームに結合し、より好ましくは他のアイソフォームにも結合する。したがって、リガンド結合分子のVEGF-Aへの特異的結合への言及は、VEGF-A121、VEGF-A145、VEGF-A165、VEGF-A189、及びVEGF-A206に特異的に結合するそれらの能力を包含する。別の例として、VEGF-Cは、伸長したアミノ末端プロペプチド及びカルボキシ末端プロペプチドを有する前駆体分子として翻訳され、これは切断されて「完全プロセシング」型のVEGF-Cを生じる。VEGF-Cに特異的に結合するリガンド結合分子は、VEGF-Cの完全プロセシング型への結合を包含し、好ましくは、その部分プロセシング型及び非プロセシング型への結合も包含する。

【0082】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、天然VEGFR2に由来する1つ以上のアミノ酸配列を含み、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCの1つ以上に対するその結合親和性は、天然VEGFR2の完全細胞外ドメイン又は対照リガンド結合分子と比較して有意に改善されている。例えば、リガンド結合分子のVEGF-A、VEGF-C、及びVEGF-Dの1つ以上に対する結合親和性は、天然VEGFR2の完全細胞外ドメイン又は対照リガンド結合分子の結合親和性と比較して有意に改善されている。

【0083】

好ましくは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB及びPDGF-CCは、ヒト、マウス及びサルなどの哺乳動物からであり、又はそれらに由来し、より好ましくは、それらは、それぞれヒト天然VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB及びPDGF-CCであり、それらの様々なアイソフォーム、部分プロセシング又は非プロセシングプレプロ型を含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCのうちの1つ以上は、遊離可溶性タンパク質として、又は細胞表面上に発現されるアンカー型で存在する。

【0085】

本発明はまた、リガンド結合分子が、異常に高度に発現された型のVEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB及びPDGF-CCに結合することができ、それによって、そのような異常に高度に発現された増殖因子への結合を介して身体が正常な機能に戻ることを促進することを包含する。当技術分野で知られているように、VEGF/PDGF/PLGF増殖因子のいくつかは病的状態で過剰発現され、これらの増殖因子が体組織において異常な機能を示す原因となる。

【0086】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、好ましくは、約 1 nM 以下（例えば、500 pM、400 pM、300 pM、200 pM、100 pM、50 pM、10 pM、5 pM、1 pM 以下）の K_D でヒト VEGF-A 及び／又はヒト VEGF-C に結合する。リガンド結合分子は、好ましくは、約 10 nM 以下（例えば、5 nM、1 nM、500 pM、400 pM、300 pM、200 pM、100 pM、50 pM、10 pM 以下）の K_D でヒト VEGF-D、ヒト PDGF-AB、及びヒト PDGF-BB の少なくとも 1 つに結合する。リガンド結合分子は、好ましくは、約 50 nM 以下（例えば、30 nM、10 nM、5 nM、1 nM、500 pM、400 pM、300 pM、200 pM、100 pM、50 pM、10 pM 以下）の K_D でヒト PDGF-AA 及び／又はヒト PDGF-CC に結合する。

10

【0087】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、SPR によって決定される場合、50 pM 以下、好ましくは 40 pM 以下、より好ましくは 30 pM 以下、より好ましくは 20 pM 以下、更により好ましくは 10 pM 以下の K_D で VEGF-A 及び VEGF-C の少なくとも 1 つに結合することができる。

【0088】

いくつかの実施形態は、リガンド結合分子は、SPR によって決定される場合、20 nM 以下、好ましくは 15 nM 以下、より好ましくは 10 nM 以下、より好ましくは 5 nM 以下、更により好ましくは 3 nM 以下の K_D で VEGF-D に結合することができる。

【0089】

20

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、1 nM 以下、好ましくは 0.5 nM 以下、より好ましくは 0.4 nM 以下、より好ましくは 0.3 nM 以下、更により好ましくは 0.2 nM 以下の EC_{50} で VEGF-C に結合することができ、ELISA によって決定される場合、1 nM 以下、好ましくは 0.5 nM 以下、より好ましくは 0.4 nM 以下、より好ましくは 0.3 nM 以下、より好ましくは 0.2 nM 以下、更により好ましくは 0.1 nM 以下の EC_{50} で VEGF-A（例えば、VEGF-A165）に結合することができる。

【0090】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 及び PDGF-CC の少なくとも 1 つ、好ましくは少なくとも 2 つ、好ましくは少なくとも 3 つ、より好ましくは 4 つ全てに、SPR によって測定した場合に、50 nM 以下、好ましくは 40 nM 以下、より好ましくは 30 nM 以下、より好ましくは 28 nM 以下、より好ましくは 26 nM 以下、より好ましくは 24 nM 以下、より好ましくは 22 nM 以下、より好ましくは 20 nM 以下、より好ましくは 18 nM 以下、より好ましくは 15 nM 以下、更により好ましくは 10 nM 以下の K_D で結合することができる。

30

【0091】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるリガンド結合分子は、以下から選択される、1 つ以上の増殖因子と受容体との間の結合：

(a) VEGF-A と、VEGFR-1、VEGFR-2、又は PDGFR- α との間の結合；

40

(b) VEGF-B、PLGF と、VEGFR-1 との間の結合；

(c) VEGF-C と、VEGFR-2 又は VEGFR-3 との間の結合；

(d) VEGF-D と、VEGFR-2 又は VEGFR-3 との間の結合；

(e) PDGF-A と、PDGFR- α との間の結合；

(f) PDGF-B と、PDGFR- α 又は PDGFR- β との間の結合；

(g) PDGF-C と、PDGFR- α との間の結合；

(h) PDGF-D と PDGFR- β との間の結合；を遮断することができる。

【0092】

任意選択で、リガンド結合分子は、以下から選択される 1 つ以上の増殖因子と受容体との結合：

50

(a) VEGF-A、B、C、Dのいずれか1つと、PDGFR- α 又はPDGFR- β との結合；

(b) PDGF-A、B、C、Dのいずれか1つと、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- α 、及びPDGFR- β のいずれか1つとの結合；を遮断することができる。

【0093】

実施例において検証されるように、本明細書に開示されるリガンド結合分子は、天然VEGFR2分子又は対照リガンド結合分子と比較して、VEGF-C又はVEGF-DのVEGFR-2又はVEGFR-3への結合を、より低いEC₅₀（例えば、1 nM未満、0.5 nM未満、0.4 nM未満）で遮断することができる。

10

【0094】

当技術分野で知られているように、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- α 、及びPDGFR- β のいずれか1つ以上は、ホモ二量体型又は任意のヘテロ二量体型のVEGF/PDGF増殖因子に結合することができ、それによって活性化される。ヒトVEGFR-2を例にとると、その対応して形成される二量体型としては、ヒトVEGFR2-ヒトVEGFR2、ヒトVEGFR2-ヒトVEGFR1、ヒトVEGFR2-ヒトVEGFR3、ヒトVEGFR2-ヒトPDGFR α 、及びヒトVEGFR2-ヒトPDGFR β 二量体が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、増殖因子と受容体との間の結合を遮断することへの本明細書における言及は、増殖因子と様々な型（例えば、単量体、ホモ二量体又はヘテロ二量体）の受容体との間の結合を遮断することを包含する。

20

【0095】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、VEGFR2（特にVEGFR2の細胞外領域）に由来する1つ以上のアミノ酸配列を含み、VEGFR2に由来するアミノ酸配列は、VEGFR2の断片又はそれに対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列である。具体的には、VEGFR2の断片は、以下：

(a) 配列番号2の20～116位によって定義されるアミノ酸配列、又は配列番号2の46～110位によって定義されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の117～218位によって定義されるアミノ酸配列、又は配列番号2の141～207位によって定義されるアミノ酸配列；

30

(c) 配列番号2の219～327位によって定義されるアミノ酸配列、又は配列番号2の224～320位によって定義されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号2の328～421位によって定義されるアミノ酸配列、又は配列番号2の328～414位によって定義されるアミノ酸配列；及び

(e) (a)、(b)、(c)又は(d)のN末端若しくはC末端切断又は伸長断片（例えば、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個以下のアミノ酸が切断又は伸長されている）から選択することができる。

【0096】

リガンド結合分子は、VEGFR2細胞外領域に由来する2つ以上のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、VEGFR2細胞外領域に由来するアミノ酸配列は、VEGFR2（好ましくはヒトVEGFR2）細胞外領域の断片である。VEGFR2細胞外領域に由来する2つ以上のアミノ酸配列は、直接若しくはスペーサを介して互いに連結することができる、又は、リガンド結合分子が二本鎖二量体である場合、それらは2つの別々の鎖上にあり得る。

40

【0097】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、(b)のN末端切断断片、例えば、配列番号2の123～218位によって定義されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、(b)及び(c)の両方のアミノ酸配列、例えば、(c)のアミノ酸配列に直接連結された(b)のアミノ酸配列、すなわち、配列番号2の117～327位によって定義されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リガンド

50

結合分子は、(b)のN末端切断断片及び(c)のアミノ酸配列の両方、例えば、(c)のアミノ酸配列に直接連結された(b)のN末端切断断片、すなわち、配列番号2の123～327位によって定義されるアミノ酸配列を含む。

【0098】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるリガンド結合分子は、配列番号2の20～116位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の117～218位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の219～327位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の328～421位に示されるアミノ酸配列、又は上記配列と少なくとも80%、若しくは少なくとも85%、若しくは少なくとも90%、若しくは少なくとも92%、若しくは少なくとも95%、若しくは少なくとも96%、若しくは少なくとも97%、若しくは少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0099】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるリガンド結合分子は、配列番号2の117～327位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の23～327位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の117～421位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の23～421位に示されるアミノ酸配列、又は上記配列と少なくとも80%、若しくは少なくとも85%、若しくは少なくとも90%、若しくは少なくとも92%、若しくは少なくとも95%、若しくは少なくとも96%、若しくは少なくとも97%、若しくは少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、同一性を有するアミノ酸配列は、配列番号2の20～116位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の117～218位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の219～327位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の328～421位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の117～327位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の23～327位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の117～421位に示されるアミノ酸配列、又は配列番号2の23～421位に示されるアミノ酸配列のN末端及び／若しくはC末端切断及び／若しくは伸長断片である。好ましくは、切断又は伸長は、40個以下のアミノ酸、例えば、30個以下のアミノ酸、20個以下のアミノ酸、15個以下のアミノ酸、10個以下のアミノ酸、8個以下のアミノ酸、6個以下のアミノ酸、5個以下のアミノ酸、4個以下のアミノ酸、3個以下のアミノ酸、2個以下のアミノ酸、又は1個以下のアミノ酸である。いくつかの特定の実施形態では、本明細書に記載されるリガンド結合分子は、配列番号2の123～218位に示されるアミノ酸配列又は配列番号2の123～327位に示されるアミノ酸配列を含む。

20

30

【0101】

いくつかの実施形態では、同一性を有するアミノ酸配列は、配列番号2の20～116位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の117～218位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の219～327位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の328～421位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の117～327位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の23～327位に示されるアミノ酸配列、配列番号2の117～421位に示されるアミノ酸配列、又は配列番号2の23～421位に示されるアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換、挿入、又は欠失などの1つ以上のアミノ酸修飾を含有する。アミノ酸修飾は、グリコシル化部位を排除するための、例えば、N-グリコシル化部位又はO-グリコシル化部位を排除するための、グリコシル化部位での変異であり得る。いくつかの実施形態は、修飾は、配列番号2の位置Asn46、Asn66、Asn96、Asn143、Asn158、Asn245、及びAsn318のうちの1つ以上における変異である。

40

【0102】

II. VEGFR2及び他の受容体に由来するアミノ酸配列を含むリガンド結合分子

いくつかの態様では、本発明のリガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、及びPDGF-CCのうちの少なくとも1つへの結合又は遮断を改善する、VEGF

50

R 2 に由来するアミノ酸配列に加えて、他の受容体に由来するアミノ酸配列を含む。他の受容体は、他の受容体チロシンキナーゼ、例えば、VEGFR-1、VEGFR-3、PDGFR- α 、及び／又はヒトPDGFR- β であり得る。

【0103】

いくつかの実施形態では、本開示のリガンド結合分子は、VEGFR 2 に由来する 1 つ以上のアミノ酸配列、及び VEGFR 3、例えば、ヒト VEGFR 3 に由来する 1 つ以上のアミノ酸配列、具体的には VEGFR 3 の細胞外領域を含む。具体的には、VEGFR 2 由来のアミノ酸配列は、VEGFR 3 由来のアミノ酸配列に作動可能に連結されている。作動可能な連結は、互いに直接的な連結であっても、スペーサを介した連結であってもよい。

10

【0104】

いくつかの実施形態では、VEGFR 3 に由来するアミノ酸配列は、VEGFR 3 の断片又はそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列である。具体的には、VEGFR 3 の断片は、配列番号 3 の 25 ~ 115 位によって定義されるアミノ酸配列；配列番号 3 の 154 ~ 210 位によって定義されるアミノ酸配列；配列番号 3 の 248 ~ 314 位によって定義されるアミノ酸配列；配列番号 3 の 25 ~ 210 位によって定義されるアミノ酸配列；配列番号 3 の 154 ~ 314 位によって定義されるアミノ酸配列；並びに上記のいずれかの N 末端若しくは C 末端切断及び／又は伸長断片（例えば、40、30、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 個以下のアミノ酸が切断又は伸長されている）から選択することができる。

20

【0105】

リガンド結合分子は、VEGFR 3、好ましくは、ヒト VEGFR 3 の細胞外領域に由来する 2 つ以上のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、VEGFR 3 の細胞外領域に由来するアミノ酸配列は、ヒト VEGFR 3 の細胞外領域の断片である。VEGFR 3 の細胞外領域に由来するアミノ酸配列を 2 つ以上含む場合、アミノ酸配列は互いに直接連結されていても、スペーサを介して連結されていてもよく、あるいは、リガンド結合分子が二本鎖二量体である場合、それらは 2 つの別々の鎖上にあり得る。

【0106】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるリガンド結合分子は、配列番号 3 の 25 ~ 210 位に示されるアミノ酸配列、配列番号 3 の 25 ~ 314 位に示されるアミノ酸配列、又は上記配列と少なくとも 80 %、若しくは少なくとも 85 %、若しくは少なくとも 90 %、若しくは少なくとも 92 %、若しくは少なくとも 95 %、若しくは少なくとも 96 %、若しくは少なくとも 97 %、若しくは少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0107】

いくつかの実施形態では、同一性を有するアミノ酸配列は、配列番号 3 の 25 ~ 210 位に示されるアミノ酸配列又は配列番号 3 の 25 ~ 314 位に示されるアミノ酸配列の N 末端又は C 末端切断断片である。例えば、切断は、40 個以下のアミノ酸、例えば、30 個以下のアミノ酸、20 個以下のアミノ酸、15 個以下のアミノ酸、10 個以下のアミノ酸、8 個以下のアミノ酸、6 個以下のアミノ酸、5 個以下のアミノ酸、4 個以下のアミノ酸、3 個以下のアミノ酸、2 個以下のアミノ酸、又は 1 個以下のアミノ酸である。いくつかの特定の実施形態では、本明細書に記載されるリガンド結合分子は、配列番号 3 の 47 ~ 210 位に示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0108】

いくつかの実施形態では、同一性を有するアミノ酸配列は、配列番号 3 の 25 ~ 210 位に示されるアミノ酸配列又は配列番号 3 の 25 ~ 314 位に示されるアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換、挿入、又は欠失などの 1 つ以上のアミノ酸修飾を含む。

【0109】

当技術分野で知られているように、スペーサは様々な形態でされてもよい。いくつかの

50

実施形態では、スペーサは、1～100個のアミノ酸、好ましくは1～50個のアミノ酸の長さを有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、スペーサは、天然のVEGFR-2又はVEGFR-3における対応する位置の連結配列（すなわち、断片が由来する配列において断片に隣接する配列）に由来する。いくつかの実施形態では、スペーサは、天然ヒトVEGFR-2又はヒトVEGFR-3における断片に隣接する天然ペプチド配列又はその一部分と少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも92%、又は少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0110】

あるいは、スペーサは使用されてもよくされなくてもよく、(G4S)_n、AAA、又は他の短いペプチド配列などの当技術分野で一般に使用されるリンカー配列であり得る。当業者によって理解されるように、スペーサは、より広い範囲のアミノ酸配列を有し得る。

【0111】

いくつかの特定の実施形態では、ヒトVEGFR3由来のアミノ酸配列は、スペーサを介してヒトVEGFR2由来のアミノ酸配列に連結されており、ヒトVEGFR3由来のアミノ酸配列は、配列番号3の25～210位によって定義されるアミノ酸配列であり、ヒトVEGFR2由来のアミノ酸配列は、配列番号2の219～327位によって定義されるアミノ酸配列であり、スペーサは、配列番号3の211～231位又は配列番号2の211～220位によって定義されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも92%、又は少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。ヒトVEGFR3に由来するアミノ酸配列は、ヒトVEGFR2に由来するアミノ酸配列のN末端又はC末端にあり得る。

【0112】

いくつかの実施形態では、本開示のリガンド結合分子は、VEGFR2に由来する1つ以上のアミノ酸配列及びVEGFR1、例えば、ヒトVEGFR1に由来する1つ以上のアミノ酸配列、特にVEGFR1の細胞外領域を含む。具体的には、その中のVEGFR2由来のアミノ酸配列は、VEGFR1由来のアミノ酸配列に作動可能に連結されている。作動可能な連結は、互いに直接的な連結であっても、スペーサを介した連結であってもよい。

【0113】

いくつかの実施形態では、VEGFR1に由来するアミノ酸配列は、VEGFR1の断片又はそれに対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列である。具体的には、VEGFR1の断片は、配列番号1の132～230位によって定義されるアミノ酸配列、並びにそのN末端及び／又はC末端切断及び／又は伸長断片（例えば、40、30、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個以下のアミノ酸が切断又は伸長されている）から選択することができる。

【0114】

いくつかの実施形態では、同一性を有するアミノ酸配列は、配列番号1の132～230位に示されるアミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換、挿入、又は欠失などの1つ以上のアミノ酸修飾を含有する。

【0115】

いくつかの態様では、リガンド結合分子は、VEGFR2に由来する1つ以上のアミノ酸配列及びVEGFR1に由来する1つ以上のアミノ酸配列を含む。具体的には、VEGFR2由来のアミノ酸配列は、VEGFR1由来のアミノ酸配列に作動可能に連結されている。作動可能な連結は、互いに直接的な連結であつても、スペーサを介した連結であつてもよい。いくつかの実施形態では、VEGFR1に由来するアミノ酸配列は、VEGFR1の断片又はそれに対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、V E G F R 1 の断片は、配列番号 1 の 1 3 2 ~ 2 3 0 位に示されるアミノ酸配列、又はその N 末端及び／若しくは C 末端切断及び／若しくは伸長断片から選択される。

【0116】

I I I . F c 領域及び任意選択で、シグナルペプチドを含むリガンド結合分子

本発明のリガンド結合分子は、単量体（すなわち、単鎖）、二量体（すなわち、二本鎖）、又は多量体であり得る。二量体又は多量体構造では、リガンド結合分子の各鎖は、互いに共有結合又は非共有結合している。いくつかの実施形態では、連結は、リガンド結合分子の V E G F R - 2 由来配列間で生じる。

【0117】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるリガンド結合分子は、ヒト I g G の定常領域などの免疫グロブリン定常領域を更に含むものであり、より具体的には、ヒンジ領域と、F c 領域、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 の F c 領域配列とを含み得る。免疫グロブリン定常領域は、リンカーを介して V E G F R 1 及び／又は V E G F R 2 及び／又は V E G F R 3 に由来する配列に連結することができる。当技術分野において知られているように、F c 領域は、ジスルフィド結合を介して抗体の第 2 の重鎖の第 2 及び第 3 の定常ドメインに結合した抗体の第 1 の重鎖の第 2 及び第 3 の定常ドメインからなる抗体の部分の指し、任意選択で、F c 領域は、ヒンジ領域の全部又は一部を更に含む。本明細書における F c 領域は、野生型 F c 領域及び複数の目的のために使用される異なる変異を有するその変異体を含む。変異体は、F c 領域において、置換などの 1 つ以上のアミノ酸残基修飾を含有し得る。

【0118】

ある特定の実施形態では、F c 領域変異体は、新生児 F c 受容体（F c R n）への p H 依存性結合を改善する 1 つ以上のアミノ酸置換を含有する。そのような変異体は、酸性 p H で F c R n に結合し、リソソーム内での分解から逃れ、その後、移動して細胞外に放出されることを可能にするので、薬物動態学的半減期が延長され得る。F c R n に対する結合親和性を改善するために抗体分子を操作する方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Vaughn, D. et al., Structure, 6 (1): 63-73, 1998; Kontermann, R. et al., Antibody Engineering, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, Springer, 2010; Yeung, Y. et al., Cancer Research, 70: 3269-3277 (2010); 及び Hinton, P. et al., J. Immunology, 176: 346-356 (2006) を参照されたい。

【0119】

ある特定の実施形態では、F c 領域変異体は、例えば、C 1 q 結合を改善又は減少させることによって、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を変化させる、又は補体依存性細胞傷害（CDC）を変化させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含有する。

【0120】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるリガンド結合分子は、アミノ酸残基 228 が改変されている、例えば、Ser 228 Pro（S 228 P、鎖交換を防止又は低減し得る）、及び／又はアミノ酸残基 235 が改変されている、例えば、Leu 235 Glu（L 235 E、F c 受容体相互作用を改変し得る）、ヒト I g G 4 の定常領域を含む。

【0121】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンド結合分子は、ヘテロ二量体化を容易にする及び／又は促進するために、F c 領域の界面に 1 つ以上のアミノ酸置換を含む。これらの修飾は、第 1 の F c ポリペプチドへの隆起／ノブの導入、及び第 2 の F c ポリペプチドへの空洞／ホールの導入を含み、第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドの相互作用を促進してヘテロ二量体又は複合体を形成するように、隆起を空洞内に配置することがで

きる。これらの修飾を有するタンパク質分子を生成する方法は、例えば、米国特許第 5, 731, 168 号に記載されているように、当技術分野で既知である。

【0122】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンド結合分子は、配列番号 31 の Asp104-Lys330 に示される、ヒト IgG1 の天然Fc配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるリガンド結合分子は、配列番号 31 の 104~330 位のアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、又は少なくとも 85%、又は少なくとも 90%、又は少なくとも 92%、又は少なくとも 95%、又は少なくとも 96%、又は少なくとも 97%、又は少なくとも 98%、又は少なくとも 99% の同一性を有する、又は 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0123】

いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、細胞からの分泌及び精製を容易にするために、アミノ末端にシグナルペプチドを更に含む。

【0124】

IV. リガンド結合分子の特性

本開示では、VEGFR2 に由来する 1 つ以上のアミノ酸配列（及び／又は他の受容体に由来するアミノ酸配列）を含むリガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-C、及び VEGF-D に対して、特に VEGF-C 及び VEGF-D に対して結合及び遮断能力を有することが見出された。いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-C、及び VEGF-D に対して有意に改善された結合又は遮断能力を有し、そのうち、VEGF-A に対する結合又は遮断能力は、ペバシズマブ（アバスチン）の能力よりも優れており、アフリベルセプト（アイリーア）の能力に近い又はそれよりも優れており、VEGF-C 及び VEGF-D の両方に対する結合又は遮断能力は、対照としての OPT の能力よりも有意に優れている。リガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、及び PDGF ファミリー分子を遮断することによって血管新生を効果的に阻害することができ、それによって、様々な疾患、特に眼疾患又は腫瘍疾患の治療において役割を果たす。

20

【0125】

本発明では、リガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-C、及び VEGF-D のそれらの受容体への結合を遮断し、PDGF 分子にも結合することが見出された。実施例において検証されるように、

30

1) L F V-B の VEGF-C への結合の K_D は、対照物質 OPT より 5.6 倍強く、L F V-E の K_D は、OPT よりわずかに優れていた。VEGF-C 遮断実験において、Biacore によって決定される場合、L F V-B の EC_{50} は、OPT よりも 1.4~2.2 倍強力であり（それぞれ、VEGFR2 及び VEGFR3 の VEGF-C への結合に対する遮断実験）、L F V-C の EC_{50} は、OPT よりも 1.3~2.4 倍強力であり、L F V-E の EC_{50} は、OPT よりも 1.57~2.2 倍強力であったが、対照としてのアバスチン及びアイリーアは、それを遮断することができなかった。

【0126】

2) L F V-B の VEGF-D への結合の K_D は、OPT よりも 7.8 倍強く、L F V-E の K_D は、OPT よりもわずかに優れていた。VEGF-D 遮断実験において、Biacore によって決定される場合、L F V-B の EC_{50} は、OPT よりも 4.7~7.4 倍強力であり（それぞれ、VEGFR2 及び VEGFR3 の VEGF-D への結合に対する遮断実験）、L F V-C の EC_{50} は、OPT よりも 4.6~5.9 倍強力であり、L F V-E の EC_{50} は、OPT よりも 4.8~3.8 倍強力であったが、対照としてのアバスチン及びアイリーアは、それを遮断することができなかった。

40

【0127】

3) L F V-B の VEGF-A への結合の K_D は 9.3 pM であり、これはアイリーアに近い又は類似していた。VEGF-A165-VEGFR2 遮断 ELISA 実験において、L F V-B の EC_{50} は 4.67 nM であり、これはアバスチン (6.68 nM)

50

とアイリーア（3.2 nM）との間であり、LFV-CのEC₅₀は4.57 nMであり、これはLFV-Bに近かった；VEGF-A121-VEGFR2遮断ELISA実験において、Biacoreによって決定される場合、LFV-BのEC₅₀は7.63 nMであり、これはアバスチン（22.37 nM）及びアイリーア（9.55 nM）よりも優れており、LFV-Cは9.35 nMのEC₅₀を有し、これはアイリーアに近く、アバスチンよりも優れていた。

【0128】

4) AMDのマウスインビボ眼科実験において、LFV-B及びLFV-Cもまた、対照薬物アイリーアと比較して、より良好な改善傾向を示した。

【0129】

更に、本発明では、VEGFR1由来の1つ以上のアミノ酸配列に作動可能に連結されたVEGFR2由来の1つ以上のアミノ酸配列を含む新規なリガンド結合分子（例えば、LFV-M、LFV-N、LFV-Q、LFV-R、及びLFV-S）が発見された。いくつかの実施形態では、リガンド結合分子は、VEGF-C及びVEGF-Dに対する結合又は遮断能力をうまく保持し、またVEGF-B及びPLGFに対する結合能力を有しながら、VEGF-Aに対する更に改善された結合又は遮断能力を有する。実施例において検証されるように、

1) VEGF-A165-VEGFR2遮断ELISA実験において、LFV-M及びLFV-NのEC₅₀は、それぞれ1.60及び1.87 nMであり、これは、VEGFR1に融合されていない元の分子LFV-C（3.18 nM）よりも優れており、また対照薬物アイリーア（2.23 nM）及びアバスチン（4.58 nM）よりも優れていた。VEGF-A165-VEGFR1遮断ELISA実験において、LFV-M及びLFV-NのEC₅₀は、それぞれ3.14及び3.30 nMであり、これは、アイリーア（4.64 nM）及びアバスチン（7.31 nM）よりも優れていた。

【0130】

2) VEGF-C-VEGFR2遮断ELISA実験において、LFV-M及びLFV-NのEC₅₀は、それぞれ27.6及び27.3 nMであり、これは、LFV-C（26.2 nM）に近く、対照物質OPT（32.1 nM）よりもわずかに優れていた。

【0131】

3) VEGF-D-VEGFR2遮断ELISA実験において、LFV-M及びLFV-NのEC₅₀はそれぞれ2.17及び1.79 nMであり、これはLFV-C（2.30 nM）に近く、対照物質OPT（24.59 nM）よりも有意に優れていた。VEGF-D-VEGFR3遮断ELISA実験において、LFV-M及びLFV-NのEC₅₀は、それぞれ、2.74及び2.31 nMであり、これは、LFV-C（2.62 nM）に近く、対照物質OPT（25.22 nM）よりも有意に優れていた。

【0132】

4) 更に、VEGF-B及びPLGFへの結合についてのELISA実験において、LFV-M及びLFV-Nはまたより良好な結合能力を示したが、LFV-Cは極端に弱い結合を示した。

【0133】

更に、本発明において、LFV-MからN-グリコシル化除去の後、得られた分子LFV-Rは、実施例において検証されるように、VEGFファミリー分子に対する更に最適化された遮断効力、並びにVEGF-B及びPLGF分子に対する結合効力を有することが見出された。

(1) VEGF A165-VEGFR2結合を遮断することについてのELISA実験において、LFV-RのEC₅₀は1.901 nMであり、これはLFV-M（2.645 nM）よりも優れており、対照薬物アイリーア（3.937 nM）よりも優れていた。VEGF A165-VEGFR1結合を遮断することについてのELISA実験において、LFV-RのEC₅₀は、6.972 nMであり、これは、LFV-M（7.797 nM）よりも優れており、対照薬物アイリーア（6.959 nM）に近かった。

【0134】

(2) VEGF-D-VEGFR2結合を遮断することについてのELISA実験において、LFV-Rは4.933 nMのEC₅₀を有し、LFV-Mの5.623 nMより優れていた。

【0135】

(3) VEGF-Bに対する結合実験において、LFV-RのEC₅₀は125.6 ng/mlであり、これはLFV-Mの181.7 ng/mlより優れていた。

【0136】

(4) PLGFへの結合実験において、LFV-RのEC₅₀は32.01 ng/mlであり、LFV-Mの43.85 ng/mlよりも優れていた。

10

【0137】

V. ポリヌクレオチド、ベクター、及び宿主細胞

いくつかの態様では、本発明はまた、このようなリガンド結合分子をコードする、ポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは、リガンド結合分子を発現させるために使用することができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはまた、ポリペプチドリガンド結合分子のインビボ発現を達成するために、活性型の治療剤として使用され得る。

【0138】

ある特定の実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、以下のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つをコードするヌクレオチド配列、及び／又はそれに対して少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%）の配列同一性を有するヌクレオチド配列、及び／又は縮重置換のみを有するその変異体を含む：

20

(a) 配列番号2の117位～218位に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号2の117～327位又は123～327位に示されるアミノ酸配列；

(c) 配列番号2の117位～421位に示されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号2の23位～327位に示されるアミノ酸配列；及び

(e) 配列番号2の23～421位に示されるアミノ酸配列。

【0139】

任意選択で、ポリヌクレオチドは、以下のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つをコードするヌクレオチド配列、及び／又はそれに対して少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%）の配列同一性を有するヌクレオチド配列、及び／又は縮重置換のみを有するその変異体を更に含む：

30

(i) 配列番号3の25～115位又は47～115位に示されるアミノ酸配列；

(ii) 配列番号3の154位～210位に示されるアミノ酸配列；

(iii) 配列番号3の248位～314位に示されるアミノ酸配列；及び

(iv) 配列番号1の132位～230位に示されるアミノ酸配列。

【0140】

リガンド結合分子をコードするポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の従来の手順を用いて容易に単離され、配列決定される。ポリヌクレオチドは、合成的方法によっても得ることができる。好ましくは、ポリヌクレオチドは、真核生物宿主細胞、特に哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化される。

40

【0141】

リガンド結合分子をコードするポリヌクレオチドは、公知の組換え技術を使用して、更なるクローニング（DNAの増幅）又は発現のためにベクターに挿入され得る。ベクター成分としては、典型的には、シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1α）、及び転写終結配列の1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。

【0142】

50

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で提供されるリガンド結合分子をコードするポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドに作動可能に連結された少なくとも1つのプロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1 α ）と、少なくとも1つの選択マーカールを含む、ベクター（例えば、発現ベクター）を提供する。ベクターの例としては、レトロウイルス（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（例えば、単純疱疹ウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス（例えば、SV40）、 λ ファージ及びM13ファージ、リボソーム、プラスミドpcDNA3.3、pMD18-T、Positivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDuO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLEXA、pACT2.2、pCMV-SCRIP.TRTM、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bosなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0143】

リガンド結合分子をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターは、クローニング又は遺伝子発現のために宿主細胞に導入することができる。本明細書におけるベクターにおいてDNAをクローニング又は発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的のための適切な原核生物としては、真正細菌、例えば、グラム陰性細菌又はグラム陽性細菌、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核微生物は、提供されるベクターに適したクローニング宿主又は発現宿主である。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 又は一般的なパン酵母は、下等真核生物宿主微生物の中で最も一般的に使用される。しかしながら、多くの他の属、種、及び株が一般に利用可能であり、本明細書において有用である。

20

【0144】

本明細書で提供されるリガンド結合分子の発現に適した宿主細胞は、植物細胞及び昆虫細胞を含む無脊椎動物細胞などの多細胞生物に由来することもできる。多数のバキュロウイルス株及び変異体並びに対応する許容昆虫宿主細胞が同定されている。しかしながら、脊椎動物細胞が最も関心を集めており、培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は日常的な手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株 (COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚腎臓株（懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた293又は293細胞、Graham et al. 36:59 (1977)）；ベビーハムスター腎細胞 (BHK、ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巢細胞／-DHFR (CHO、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞 (HELA, ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞 (MDCK, ATCC CCL 34)；バッファローラット肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065)；マウス乳腺腫瘍 (MMT 060562, ATCC CCL 51)；TR1細胞 (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及びヒト肝癌株 (Hep G2) が挙げられる。いくつかの好ましい実施形態では、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞である。いくつかの他の好ましい実施形態では、宿主細胞は、他の哺乳動物細胞株、例えば、ヒト細胞株である。

30

40

【0145】

50

宿主細胞は、リガンド結合分子を産生するための上記の発現ベクター又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に修飾された従来の栄養培地中で培養される。

【0146】

本明細書で提供されるリガンド結合分子を産生するために使用される宿主細胞は、種々の培地中で培養され得る。Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地 (Minimal Essential Medium: MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、及びダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM, Sigma) などの市販の培地が、宿主細胞の培養に適している。加えて、Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980)、米国特許第4,767,704号、同第4,657,866号、同第4,927,762号、同第4,560,655号、同第5,122,469号、国際公開第90/03430号、同第87/00195号、又は米国特許 Re. 30985 に記載される培地のいずれもが、宿主細胞のための培養培地として使用され得る。これらの培地のいずれも、必要に応じて、ホルモン及び／又は他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、又は上皮増殖因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩）、緩衝液（例えば、HEPES）、ヌクレオチド（例えば、アデノシン及びチミジン）、抗生物質（例えば、GENTAMICIN（商標）薬物）、微量元素（通常、マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物として定義される）、並びにグルコース又は等価なエネルギー源を補充され得る。任意の他の必要な補充物もまた、当業者に公知である適切な濃度で含まれ得る。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞で以前に使用されたものであり、当業者には明らかであろう。

【0147】

組換え技術を使用する場合、リガンド結合分子は、細胞内で、細胞膜周辺腔において産生することができる、又は培地中に直接分泌させることができる。リガンド結合分子が細胞内で産生される場合、第1の工程として、宿主細胞又は溶解された断片由来の粒子状破片が、例えば、遠心分離又は限外濾過によって除去される。細胞破片は、遠心分離によって除去することができる。リガンド結合分子が培地中に分泌される場合、このような発現系からの上清は、概して、市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えば、Amicon又はMillipore Pellicon 限外濾過ユニットを使用して最初に濃縮される。PMSEなどのプロテアーゼ阻害剤は、タンパク質分解を阻害するために前述の工程のいずれかに含まれ得、抗生物質は、偶発的な夾雑物の増殖を防止するために含まれ得る。

【0148】

細胞から調製されたリガンド結合分子は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿、塩析、及び親和性クロマトグラフィーを用いて精製することができる、親和性クロマトグラフィーが好ましい精製技術である。

【0149】

ある特定の実施形態では、固相上に固定化されたタンパク質Aは、リガンド結合分子の免疫親和性精製のために使用される。親和性リガンドとしてのタンパク質Aの適性は、リガンド結合分子中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。タンパク質Aは、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、又は $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体を精製するために使用することができる (Lindmark et al., Meth. 62: 1-13 (1983))。親和性リガンドが結合されるマトリックスは、最も多くの場合にはアガロースであるが、他のマトリックスもまた使用され得る。機械的に安定なマトリックス（例えば、制御細孔ガラス又はポリ（スチレンジビニル）ベンゼン）は、アガロースを用いて達成され得るものよりも速い流速及び短い処理時間を可能にする。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカゲルでのクロマトグラフィー、ヘパリンS

EPHAROSE（商標）でのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）でのクロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などのタンパク質精製のための他の技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

【0150】

VI. コンジュゲート

いくつかの態様では、本発明はまた、リガンド結合分子及びそれにコンジュゲートされた部分を含む、コンジュゲートを提供する。コンジュゲート部分は、リガンド結合分子に結合することができるものである。様々なコンジュゲート部分が、本明細書で提供されるリガンド結合分子に連結され得ることが企図される（例えば、「Conjugate Vaccines」, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)を参照されたい）。これらのコンジュゲート部分は、他の方法の中でも特に、共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合、複合体形成、会合、ブレンド、又は付加によってリガンド結合分子に連結され得る。

10

【0151】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示されるリガンド結合分子は、1つ以上のコンジュゲート部分への結合に利用され得る特異的部位を含有するように操作され得る。例えば、このような部位は、コンジュゲート部分への共有結合を容易にするために、1つ以上の反応性アミノ酸残基、例えば、システイン残基及びヒスチジン残基を含み得る。

20

【0152】

ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、コンジュゲート部分をリガンド結合分子に連結するリンカーを含む。いくつかの他の実施形態では、本明細書に記載のリガンド結合分子は、そのC末端のペプチド結合を介してコンジュゲート部分のN末端アミノ酸に直接結合している、又はそのN末端のペプチド結合を介してコンジュゲート部分のC末端アミノ酸に直接結合している。そのリガンド結合分子はまた、化学結合（アミド結合が挙げられるが、これに限定されない）を介してコンジュゲート部分に連結されて、ポリペプチド鎖を形成することができる。ある特定の実施形態では、リガンド結合分子は、間接的に又は第2のコンジュゲート部分を介してのいずれかで、第1のコンジュゲート部分に連結することができる。例えば、リガンド結合分子をビオチンにコンジュゲートさせ、次いで、アビジンにコンジュゲートされた第2のコンジュゲート部分に間接的にコンジュゲートさせることができる。コンジュゲート部分は、クリアランス修飾モジュール、毒素（例えば、化学療法剤）、検出可能な標識（例えば、放射性同位体、ランタニド元素、発光標識、蛍光標識、又は酵素基質標識）、又は精製部分であり得る。

30

【0153】

「毒素」は、細胞に有害である、又は細胞を損傷若しくは死滅させることができる任意の剤であり得る。毒素の例としては、パクリタキセル、シトカラシンB、グラミシジンB、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ビンクリスチン、MMAE、MMAF、DM1、ビンブラスチン、コルチシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアンスラシンジオン、ミトザントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン及びその類似体、代謝拮抗薬（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、及びロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ミトマイシンC及びシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシンとして知られていた）及びアドリアマイシン）、抗菌剤（例えば、アクチノマイシン（以前は

40

50

ダクチノマイシンとして知られていた)、ブレオマイシン、ミトラマイシン及びアントラマイシン(AMC)、抗有糸分裂剤(例えば、ビンクリスチン及びビンブラスチン)、トポイソメラーゼ阻害剤、並びにチューブリン結合剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0154】

検出可能な標識の例としては、蛍光標識(例えば、ルシフェリン、ローダミン、ダンシル、フィコエリトリン、又はテキサスレッド)、酵素基質標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、又は β -D-ガラクトシダーゼ)、放射性同位体(例えば、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、及び ^{32}P 、他のランタニド元素)、発光標識、発色団部分、ジゴキシゲニン、ビオチン/アビジン、DNA分子又は検出用の金を挙げるができる。

10

【0155】

ある特定の実施形態では、コンジュゲート部分は、リガンド結合分子の半減期を増加させるのに役立つクリアランス調節剤であり得る。例示的な例としては、水溶性ポリマー、例えば、PEG、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマーなどが挙げられる。ポリマーは、任意の分子量であり得、分岐又は非分岐であり得る。リガンド結合分子に結合されるポリマーの数は変化し得、2つ以上のポリマーが結合される場合、それらは同じ分子であっても、異なる分子であってもよい。いくつかの特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンド結合分子は、少なくとも1つのポリエチレングリコール部分にコンジュゲートされ、ポリエチレングリコール部分は、リガンド結合分子のアミノ末端に結合することができる。

20

【0156】

ある特定の実施形態では、コンジュゲート部分は、磁気ビーズなどの精製部分であり得る。

【0157】

VII. 医薬組成物

いくつかの態様では、本発明は、薬学的に許容される担体と共に製剤化された本発明のリガンド結合分子を含む、医薬組成物などの組成物を提供する。そのような組成物は、本発明の少なくとも1つのリガンド結合分子、融合タンパク質、又はコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、硝子体内注射に適した製剤である。

30

【0158】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」としては、任意の及び全ての生理学的に適合性かつ薬学的に許容される液体担体、ゲル担体若しくは固体担体、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張剤、緩衝液、抗酸化剤、麻酔剤、懸濁剤/分散剤、金属イオン封鎖剤若しくはキレート剤、希釈剤、アジュバント、賦形剤若しくは非毒性補助物質、当該分野で公知の他の成分、又はこれらの種々の組み合わせなどが挙げられる。担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、経皮、硝子体内注射又はインプラント投与などに適し得る。投与経路に応じて、活性化化合物、すなわち本発明の成分は、酸の作用及び化合物を不活性化し得る他の天然条件から化合物を保護するための材料でコーティングされ得る。

40

【0159】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤を更に含み得る。薬学的に許容される抗酸化剤の例としては、(1)水溶性抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど、(2)油溶性抗酸化剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -ト

50

コフェロールなど、及び（３）金属キレート剤、例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸など、が挙げられる。

【０１６０】

本発明の医薬組成物において使用され得る適切な水性及び非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの適切な混合物、植物油、例えば、オリーブ油、並びに注射可能な有機エステル、例えば、オレイン酸エチルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、コーティング材料（例えば、レシチン）の使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。

【０１６１】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤などの補助剤を含有し得る。微生物の存在の防止は、滅菌方法、並びにパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの様々な抗菌剤及び抗真菌剤の包含の両方によって確実にすることができる。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを組成物中に含めることが望ましい場合もある。加えて、注射可能な医薬形態は、吸収を遅延させる剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの包含によってより持続的に吸収させることができる。

【０１６２】

医薬組成物は、固体、ペースト、軟膏、ゲル、液体、エアロゾル、スプレー、ポリマー、フィルム、エマルジョン、又は懸濁液の形態であり得る。

【０１６３】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、注射可能な組成物に製剤化される。注射可能な医薬組成物は、任意の従来形態、例えば、液体溶液、懸濁液、エマルジョン、又は液体溶液、懸濁液、若しくはエマルジョンを生成するために適切な固体形態で調製され得る。注射のための調製物としては、注射の準備ができていない滅菌及び／又は非発熱性溶液、皮下錠剤を含む、使用直前に溶媒と混合する準備ができていない凍結乾燥粉末などの滅菌乾燥可溶性製品、注射の準備ができていない滅菌懸濁液、使用前にビヒクルと組み合わせる準備ができていない滅菌乾燥不溶性製品、並びに滅菌及び／又は非発熱性エマルジョンが挙げられ得る。溶液は、水性又は非水性のいずれかであり得る。

【０１６４】

薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液又は分散液、及び滅菌注射溶液又は分散液の即席調製のための滅菌粉末が含まれる。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体及び剤の使用は、当該分野で公知である。任意の従来媒体又は剤が活性化合物と不適合でない限り、本発明の医薬組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性化合物もまた、組成物に組み込むことができる。

【０１６５】

医薬組成物は、概して、製造及び貯蔵の条件下で無菌かつ安定である必要がある。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は高薬物濃度に適した他の秩序構造として製剤化され得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの適切な混合物を含有する溶媒又は分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散剤の場合には必要な粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、ポリオール（マンニトール、ソルビトールなど）、又は塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましい。注射可能な組成物は、吸収を遅延させる剤（例えば、モノステアレート及びゼラチン）を組成物中に含めることによって持続的に吸収させることができる。

【０１６６】

滅菌注射溶液は、必要量の活性化合物を、上記に列挙した成分の１つ又は組み合わせと共に適切な溶媒に組み込み、必要に応じて、続いて、得られた混合物を濾過滅菌することによって調製することができる。典型的には、分散液は、活性化合物を、塩基性分散媒及

10

20

30

40

50

び上に列挙した物質からの他の所望の成分を含有する滅菌担体に組み込むことによって調製することができる。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥及び冷凍乾燥（凍結乾燥）であり、活性成分及び任意の更なる必要な成分の粉末が、予め滅菌濾過された溶液から得られる。

【0167】

単一剤形を調製するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、治療される対象及び特定の投与様式に応じて変化する。単一剤形を調製するために担体と組み合わせることができる活性成分の量は、概ね、治療効果をもたらす組成物の量である。典型的には、100%基準で、この量は、薬学的に許容される担体と組み合わせて、活性成分の約0.01%～約99%、好ましくは活性成分の約0.1%～約70%、最も好ましくは活性成分の約1%～約30%の範囲である。

10

【0168】

投与レジメンは、最適な所望の奏功（例えば、治療奏功）を提供するように調整され得る。例えば、単回ボラスを投与することができ、いくつかの分割用量を経時的に投与することができ、又は治療状況の緊急性によって示されるように、用量を比例的に減少若しくは増加させることができる。

【0169】

投与の容易さ及び投与量の均一性のために、医薬組成物を単位剤形に製剤化することが特に有利である。本明細書で使用される単位剤形は、治療される対象のための単位用量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、所望の医薬担体と共同して所望の治療効果を生じるのに適した所定量の活性化合物を含有する。本開示の単位剤形の仕様は、以下の因子：（a）活性化合物の固有の特徴及び達成される特定の治療効果、並びに（b）個体の治療のためにそのような活性化合物を製剤化する技術分野に固有の感度限界、によって規定され、直接左右される。

20

【0170】

リガンド結合分子の投与について、投与量は、宿主体重に基づいて、約0.0001～100mg/kg、より通常的には0.01～5mg/kgの範囲である。例えば、投与量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重、若しくは10mg/kg体重であり得、又は1～10mg/kgの範囲であり得る。例示的な治療レジメンは、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1ヶ月に1回、3ヶ月に1回、又は3～6ヶ月に1回の投与を含む。

30

【0171】

任意選択で、リガンド結合分子は、徐放性製剤として投与され得、この場合、必要とされる投与の頻度は少なくなる。投与量及び頻度は、患者において投与される物質の半減期に応じて変化する。投与量及び投与頻度は、治療が予防的であるか治療的であるかに応じて変化し得る。予防用途では、比較的低い投与量が、長期間にわたって比較的低頻度の間隔で投与される。一部の患者は、残りの生涯にわたって治療を受け続ける。治療用途では、疾患の進行が減速又は停止するまで、好ましくは患者が疾患症状の部分的又は完全な緩和を示すまで、比較的短い時間間隔で比較的高用量が必要とされる場合がある。その後、患者に予防レジメンを施すことができる。

40

【0172】

本発明の医薬組成物中の活性成分及び小分子の実際の投与量レベルは、特定の患者、組成物、及び投与様式について、患者に対して毒性であることなく所望の治療奏功を達成するのに有効である活性成分の量を得るために変動させることができる。選択される投与量レベルは、使用される本発明の特定の組み合わせ、又はそのエステル、塩、若しくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用される特定の化合物の排出速度、治療期間、使用される特定の組み合わせと組み合わせて使用される他の薬物、化合物及び／又は材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全身健康状態、及び過去の病歴、並びに医療分野で周知の同様の因子を含む、様々な薬物動態因子に応じて異なる。

【0173】

50

V I I I . リガンド結合分子を使用する方法

いくつかの態様では、本発明は、対象における血管新生及び血管新生によって引き起こされる疾患又は状態を阻害、予防、又は治療する方法であって、本明細書に記載のリガンド結合分子、コンジュゲート、又はその医薬組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。血管新生には、網膜血管新生及び／又は脈絡膜血管新生が含まれる。疾患又は状態としては、ポリープ状脈絡膜血管症、網膜血管新生形成、及び眼底漏出に関連する眼障害が挙げられる。

【0174】

いくつかの実施形態では、眼障害は、加齢黄斑変性、糖尿病性眼障害、ポリープ状脈絡膜血管症、眼底線維性障害、網膜静脈閉塞症関連疾患、未熟児網膜症、及び黄斑部毛細血管拡張症からなる群から選択される。好ましくは、本明細書に記載されるリガンド結合分子を含む医薬組成物は、点眼剤によって、硝子体内注射によって、又は硝子体内インプラントによって対象の眼に局所投与される。

【0175】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるリガンド結合分子、コンジュゲート、又はその医薬組成物は、単回用量又は複数回用量で投与することができる。好ましくは、他の標的治療剤と一緒に投与することなく、単回投与によって所望の治療効果を達成することができる。

【0176】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるリガンド結合分子、コンジュゲート、又はその医薬組成物は、単独で、又は1つ以上の追加の治療手段若しくは治療剤と組み合わせて投与することができる。例えば、本明細書に開示されるリガンド結合分子、そのコンジュゲート、又は医薬組成物は、化学療法剤などの追加の治療剤又は他の治療方法と組み合わせて施すことができる。例えば、眼疾患の治療実施では、他の治療方法としては、レーザー光凝固、硝子体切除などが挙げられる。

【0177】

これらの実施形態のいくつかでは、1つ以上の追加の治療剤と組み合わせて投与される、本明細書に開示されるリガンド結合分子、コンジュゲート、又はその医薬組成物は、1つ以上の追加の治療剤と同時に又は連続して又は交互に投与され得る。別の治療剤と「組み合わせて」投与されるリガンド結合分子は、その剤と同時に、又はその剤と同じ組成物で投与される必要はない。別の剤の前又は後に投与されるリガンド結合分子は、リガンド結合分子及び第2の剤が異なる経路を介して投与される場合であっても、この句が本明細書で使用される場合、その剤と「組み合わせて」投与されるとみなされる。可能な場合、本明細書に開示されるリガンド結合分子と組み合わせて投与される追加の治療剤は、追加の治療剤の製品情報シートに列挙されるスケジュールに従って、又は米医薬品便覧（Physicians' Desk Reference, 57th Ed. Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002)）に従って、又は当技術分野で周知のプロトコルに従って投与される。

【0178】

いくつかの態様では、本発明はまた、リガンド結合分子、コンジュゲート、又はその医薬組成物、を含むキットを提供する。

【0179】

I X . 発明の利点

血管形成の阻害は、腫瘍増殖及び眼血管増殖などの血管形成関連疾患に対する有効な治療選択肢である。過去数十年にわたって、VEGF関連シグナル伝達に関する広範な研究が行われており、治療に使用される多くの薬物が存在している。単一標的療法の限界を打破するために、PDGF-BB及びVEGF-Aの両方を標的とすることに大きな期待が寄せられている。PDGF-BBの阻害は、周皮細胞のアポトーシスをもたらし得、それ

によって、抗 VEGF-A 治療に対する薬物耐性を打破する。加えて、PDGF-BB は、組織における線維性病変に密接に関連し、眼底線維症は、次に、AMD の後期発症形態であり、失明の原因であり、VEGF-A 療法の最終的な失敗の主な理由でもある (Rofagha S. et al. (2013), J. Ophthalmology. 120 (11): 2292-2299) (Rosenfeld P. J. et al. (2011), Ophthalmology. 118 (3): 523-530)。PDGF 標的療法の中でより注目すべきは、Novartis によって導入された PDGF-BB アンタゴニストである E10030、及び AbbVie によって開発された二重特異性抗体である ABBV642 であり、前者は、AMD についての第 I 相及び第 II 相臨床試験においてラニズマブ単独の使用よりも有効な効力を達成し、眼底線維症に対するより顕著な改善効果を提供した。更に、E10030 は、より大規模な第 III 相臨床試験において単一の VEGF-A 標的化療法に対して比較優位性を実証していないが、線維症に対する有効な介入効果により、線維症に対するその治療方向についての試験が依然として行われている。

10

【0180】

別の製品、OPT-302 が、Opthea によって開発された。OPT-302 は、VEGF-C 及び VEGF-D の両方を標的としており、VEGF-A を標的とする製品と組み合わせて注射により使用される場合、VEGF-A 単独を標的とするよりも有意に広い奏功を有する有意に良好な治療効果を明確に実証し、それによって、nAMD などの疾患の治療を第 2 世代に導入する。更に、この療法はまた、アジア人集団において非常に蔓延しているポリプ状脈絡膜血管症 (PCV) を有する患者において好ましい治療効果をもたらした。滲出型黄斑変性症のサブタイプとして、PCV は、VEGF-A 標的化療法に対して、効果的かつ広範囲に奏功せず、アジア地域で高い発生率を有する点で滲出型黄斑変性症とはいくらか異なり (Imamura Y. et al. (2010), Surv. Ophthalmol. 55 (6): 501-515)、PCV は中国で新たに AMD と診断された患者の 33% (Lande A. et al. (2010), Prog Retin Eye Res. 29 (1): 19-29) 及び日本で 54.7% の割合を占め (Maruko I. et al. (2007), Am J Ophthalmol. 144: 15-22)、現在、アジア地域におけるより大きな人口ベースにより、PCV に対する非常に大きな治療ギャップが存在する。

20

30

【0181】

しかしながら、この療法は組み合わせ療法であり、2 つの薬剤、すなわち、VEGF-A 標的薬及び OPT-302 の硝子体への同時注入を必要とし、より高い治療コストをもたらし、同時に、この療法はまた、毎月の眼を通じた注入を必要とし、これは治療コストを上昇させるだけでなく、不便さ及び不十分な患者コンプライアンスもまたもたらし、ひいては、注入によって引き起こされる眼内感染などの事故のリスクを増大させる。加えて、この療法は、VEGF-A、VEGF-C、及び VEGF-D の全てを、それらの全てに対してより高い親和性 (10 pM 以下のレベルまで) で標的化する必要があるが、これもまた、現在普及しているモノクローナル抗体技術 (抗体は、概して、1 つの標的部位のみに、典型的には約 100 pM の親和性で結合する) を使用するそれらの代替物の開発を妨げる。

40

【0182】

本発明者らは、驚くべきことに、VEGFR2 に由来する特定のアミノ酸配列 (例えば、配列番号 2 の 123~327 位又は 117~327 位) を含むリガンド結合分子が、VEGF-C 又は VEGF-D に対して OPT よりも良好な結合能力を有することを見出した。更なる試験のために、VEGFR2 からの異なる断片を含む種々の VEGF Trap 分子を構築し、発現させ、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D などに対するそれらの結合及び遮断能力を試験し、詳細に特徴付けた。

【0183】

VEGFR2 に由来するアミノ酸配列、特に配列番号 2 の 123~327 位又は 117

50

～327位に示されるアミノ酸配列を含むリガンド結合分子は、VEGF-C又はVEGF-Dに対してOPT又は完全VEGFR2細胞外ドメインよりも結合及び遮断能力を有意に示し、VEGF-Aに対して有意に良好な結合及び遮断能力も有することが見出された。

【0184】

一方、本発明者らは更に、予想外にも、VEGFR2由来のアミノ酸配列、特に配列番号2の117～327位又は123～327位に示されるアミノ酸配列を含むリガンド結合分子が、結合に関与する主要ドメインであるPDGF-AA、AB、BB、及びCCなどのPDGFファミリー増殖因子に対してもある一定の結合能力を有し、PDGFへの結合に関して天然VEGFR2の完全細胞外ドメインの組換え分子よりも優れていることを特徴付けた。PDGFファミリー分子の高発現は、VEGF-A標的化療法に対する不十分な奏功の理由の1つであると考えられるので、PDGFファミリーを同時に標的化する、耐性の発生及び治療後の眼底線維症は、特に糖尿病によって引き起こされる眼底病変に対して、より多くの患者に利益をもたらすことができることが可能であり、PDGF-AA、PDGF-AB、及びPDGF-BBは、そのような眼底病変において多く発現されることが報告された。結果として、本明細書のリガンド結合分子は、糖尿病によって引き起こされる眼底病変を治療する可能性を有する。

10

【0185】

更に、OPT分子と比較して、VEGFR2に由来するアミノ酸配列、特に配列番号2の117位～327位又は123位～327位に示されるアミノ酸配列を含むリガンド結合分子は、HEK293細胞及びCHO細胞からの発現及び精製プロセス中に、有意に良好な初期モノマー純度及び有意に高い最終収率の両方を示し、これは、それらがより低い生産コスト及び投薬コストをもたらすことを意味する。

20

【0186】

更に、VEGFR1に由来する1つ以上のアミノ酸配列に作動可能に連結されたVEGFR2に由来する1つ以上のアミノ酸配列を含む新規リガンド結合分子、及びそのグリコシル化修飾型（例えば、LFV-M、LFV-N、LFV-Q、LFV-R（LFV-RのHPLC-SEC純度はLFV-Mより高い）、LFV-S）も提供され、これらは、VEGF-C及びVEGF-Dに対する結合及び遮断能力をうまく保持しながら、VEGF-Aに対する最適化された結合及び遮断能力を有する。特に、それらは、VEGFA-VEGFR1に対する遮断能力を有することが見出され、VEGFA-VEGFR1及びVEGFA-VEGFR2の両方に対するそれらの遮断能力は、対照薬物のアイリーア及びアバスチンよりも優れており、加えて、それらは、VEGF-B及びPLGFに対する結合能力も示す。

30

【0187】

このようにして、本発明のリガンド結合分子を用いることにより、VEGF-A、VEGF-C、及びVEGF-Dを遮断することができ、該分子は、VEGF-B、PLGF、及びPDGFファミリー分子にも結合することができ、これは、満たされていない臨床ニーズを満たし、優れた治療効果を達成するのに役立つだけでなく、2つ以上の薬物を並行して使用する高コストの問題も解決する。同時に、リガンド結合分子は、VEGF-A、VEGF-C、及びVEGF-Dの全てに対してより高い親和性及び遮断能力を有し、例えば、LFV-B及びLFV-Cは、VEGF-C及びVEGF-Dに対してOPTよりも強い親和性を有し、VEGF-Aに対するそれらの親和性及び遮断能力はまた、アバスチンよりも有意に優れ、アフリベルセプトに近い又はそれよりも優れており、これは、注射間隔の延長及び注射頻度の低減を実現するのに役立ち、それによって、治療コストを更に低減し、頻繁な注射に関連する複数の欠点に対処する。

40

【0188】

VEGF-A標的化に明確に奏功しない治療方法における空位を満たし、高い親和性によって注射頻度を減少させ、ひいては、最適な治療効果を得ながら、患者の負担を有意に低下させ、治療の不便さを減少させ、コンプライアンスを改善し、注射によって引き起こ

50

される眼内感染などのリスクを減少させるために、本明細書のリガンド結合分子又はそれを含む医薬組成物の使用によって、多剤組み合わせを単一薬物で置き換えることが可能になる。

【0189】

本発明の配列の概要

【表1-1】

配列番号1	ヒトVEGFR-1の全長アミノ酸配列
	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPESLSKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPE
	MVSKESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTG
	RPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIG
	LLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPD
	EKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVK
	HRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFFSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIKDVTEEDAGNY
	TILLSIKQSNVFKNLATLIVNVKPKIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKFWFHPCN
	HNHSEARCDFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNK
	VGTVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKLSCVTNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQ
	KMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTACRARNVYTGEELQKKEITIRDQEAPYLLRNLSDHTVAIS
	SSTTLDCHANGVPEPQITWFKNNHKIQQEPGILGPGSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVES
	SAYLTVQGTSDKSNLELITLTCTCVAATLFWLLTLFIRKMKRSSEIKTDYLSIIMDPDEVPLDEQC
	ERLPYDASKWEFARERLKLGLKSLGRGAFGKVQASAFGIKKSPTCRTVAVKMLKEGATASEYKAL
	MTELKILTHIGHHLNVVNLLGACTKQGGPLMVIVEYCKYGNLSNYLKSQRDLFFLNKDAALHMEPK
	KEKMEPGLEQGKKPRLDSVTSSSEFASSGFQEDKSLSDVEEEEDSDGFYKEPITMEDLISYSFQV
	ARGMEFLSSRKCIHRDLAARNILLSENNVMKICDFGLARDIYKNPDYVRKGDTRLPLKWMAPESIFD
	KIYSTKSDVWSYGVLLWEIFSLGGSPYPGVQMDDEDFCSRLREGMRMRAPYSTPEIYQIMLDCWH
	RDPKERPRFAELVEKLGDLLQANVQQDGKDYIPINAILTGNSGFTYSTPAFSEDDFFKESISAPKFNS
	GSSDDVRYVNAFKFMSLERIKTFEELLPNATSMFDDYQGDSSTLLASPMKLRFTWTDSPKPKASLKI
	DLRVTSKSKESGLSDVSRPSFCHSSCGHVSEGKRRFTYDHAELERKIACCSPPPDYNSVVLYSTP
	PI

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】
(上記表の続き)

配列番号 2	ヒト VEGFR-2 の全長アミノ酸配列
	MQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSE QRVEVTECSDFLCKTLTIPIK VIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKN KTVVIPCLGSGISNLSVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIV VVVG YRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSKSHQHKKLVNRDLKTQSGSEMK KFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYP PPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSESDTGNVTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPV DSYQYGTQTTLCTVYAIPPPHHIHWYVQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKN QFALIEGKNKT VSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDMPQTEQESVSLWCTA DRSTFENLTWYKLGQPLPIHVGELPTPVCKNLDLWKLNATMFSNSTNDILMELKNASLQDQGDYVCL AQDRKTKKRHCVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPQIMWFKDNETLVEDSGIVL KDGNRNLTIIRVRKEDGLYTCQACSVLGC AKVEAFFIIEGAQEKTNLEIILVGTAVIAMFFWLLLVIILRTV KRANGGELKTGYLSIVMDPDELPLDEHCERLPYDASKWEFPRDRLKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKT ATCRTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIGHHLNVVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLS KRNEFVPYKTKGARFRQGDYVGAIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDVEEEEAPEDLYKDFTL EHLICYSFQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARLPLKWM APETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEEFCRRLKEGTRMRAPDYTPPEMYQTMLDCW HGEPQRPTFSELVEHLGNLLQANAQQDGKDYIVLPISSETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEEEVCDPKFHYD NTAGISQYLQNSKRKSRPVSVKTFEDIPLEEPEVKVIPDDNQTDSGMVLASEELKTLEDRTKLSPSFGGMVP SKSRESVASEGSNQTSQGYHSDDTDTTVYSSEEAEALLKLEIGVQTGSTAQILQPDSGTTLSPPV

10

【表 1 - 3】
(上記表の続き)

配列番号 3	ヒト VEGFR-3 の全長アミノ酸配列
	MQRGAALCLRLWLCGLLDGLVSGYSMTPTLNTTEESHVIDTGDSLISCRGQHPLEWAWPGAQEAATG DKDSEDGTGVVRDCEGTDARPYCKVLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFIN KPDTLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTW GDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQAERGKWVP ERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRESTEIVHENPFISVEWLKGPILAEATAGDELVK LPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSPHALVLKEVTEASTGYTLALWNSAAGLRRNISLELVVNPPQI HEKEASSPSIYSRHSRQALTCTAYGVPLPLSIQWHWRPWT PCKMFAQRSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTT QDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKT VSKLVIQNANVSAMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTIPDGFTIESKPS EELLEGQPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASLEEVAPGARHAT LSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKYLSVQALEAPRLTQNLTDLLVNVSDSLEMQLVAGAH APSIWVYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSSASVAVEGSEDKGSME IVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADIKTYLSIIMDPGEVPLEEQCEYLSYDASQWEFPRERLHLG RVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDT VAVKMLKEGATASEHRALMSELKILIHIGHHLNVVNLLGACTKP QGPLMVIVEFCKYGNLSNFLRAKRD AFSPCAEKSPEQRGRFRAMVELARLDRRRPGSSDRVLFAFRFSKTEG GARRASPDQEAEDLWLSPLTMEDLVCSYFQVARGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSVDVVKICDFGLARD IYKDPDYVRKGSARLPLKWMAPESIFDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVQINEEFQQLRDGT RMRAPELATPAIRRIMLNCWSGDPKARPAFSELVEILGDLQGRGLQEEEEVCMAPRSSQSSEEGSFSQVST MALHIAQADAEDSPPSLQRHSLAARYYNWVSFPGCLARGAETRGSSRMKTFFEEFMTPTTYKGSVDNQT DSGMVLASEEFEQIESRHRQESGFSCKPGQNVAVTRAHPDSQGRRRRPERGARGGQVFYNSEYGELSEPS EEDHCSPSARVTFFTDNSY
配列番号 4	LFV-A Trap ポリペプチド YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKT VVIPCLGSGISNLSVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIP SYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVV

20

30

40

50

【表 1 - 4】

(上記表の続き)

配列番号5 LFV-B Trapポリペプチド	
YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKK GFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEK	
配列番号6 LFV-C Trapポリペプチド	
SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSY YMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFV RVHEK	10
配列番号7 LFV-D Trapポリペプチド	
YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKK GFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVL TIMEVSRDGTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPP	20
配列番号8 LFV-E Trapポリペプチド	
GLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDGLFCKTLT IPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLN VSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGRIYD VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号9 LFV-F Trapポリペプチド	
GLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDGLFCKTLT IPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLN VSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGRIYD VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLG YPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDGTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPP	30
配列番号10 LFV-G Trapポリペプチド	
SPFIASVSDQHGVVYITENKAKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSY MISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVR VHEK	40

【表 1 - 5】

(上記表の続き)

配列番号 11 LFV-H Trapポリペプチド	
SPFIASVSDQHGVVYITENKKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号 12 LFV-I Trapポリペプチド	
SPFIASVSDQHGVVYITENKKNKTVVIPCLGSISNLAVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	10
配列番号 13 LFV-J Trapポリペプチド	
SPFIASVSDQHGVVYITENKKNKTVVIPCLGSISNLQVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号 14 LFV-K Trapポリペプチド	
SPFIASVSDQHGVVYITENKKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	20
配列番号 15 LFV-L Trapポリペプチド	
SPFIASVSDQHGVVYITENKKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKQSTFVRVHEK	
配列番号 16 LFV-M Trapポリペプチド	
GRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIIGGGSGGSPFIASVSDQHGVVYITENKKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	30
配列番号 17 LFV-N Trapポリペプチド	
SPFIASVSDQHGVVYITENKKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTII	40

【表 1 - 6】

(上記表の続き)

配列番号18 LFV-P Trapポリペプチド	
YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKK GFTIPSYMISYAGMVFCFAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVQLCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEK	
配列番号19 LFV-Q Trapポリペプチド	10
YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKK GFTIPSYMISYAGMVFCFAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVQLCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEKGGGGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKR IIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQNTII	
配列番号20 LFV-R Trapポリペプチド	20
GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKR IIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQNTII GGGGSGGSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSIS NLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCFAKINDESYQSIMYIVVVVGYR IYDVVLSPSHGIELSVGEKLVQLCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEK	
配列番号21 LFV-S Trapポリペプチド	30
YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKK GFTIPSYMISYAGMVFCFAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEKGGGGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKR IIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQNTII	
配列番号22 LFV-001 Trapポリペプチド	40
YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHPLAWPGAEAPATGDKDSEDGTVVRDCEGTDA RPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW VPCLVSIPGLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWDGQDFLSNP FLVHITGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEK	

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

(上記表の続き)

配列番号23 LFV-010 Trapポリペプチド	
YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA R PYCKVLLLHEVHAQDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW VPCLVSIPLGNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP FLVHITGNELYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKT QSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号24 LFV-002 Trapポリペプチド	10
YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA R PYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW VPCLVSIPLGNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP FLVHIGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQS GSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号25 LFV-003 Trapポリペプチド	20
YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA R PYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW VPCLVSIPLGNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP FLVHIGGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号26 LFV-004 Trapポリペプチド	
YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA R PYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW VPCLVSIPLGNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP FIVHVTGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号27 LFV-005 Trapポリペプチド	30
YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA R PYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW VPCLVSIPLGNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP FIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号28 LFV-006 Trapポリペプチド	40
YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA R PYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW VPCLVSIPLGNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNM YIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	

【表 1 - 8】

(上記表の続き)

配列番号29 LFV-007 Trapポリペプチド	
YSMTPTLTNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGVVRDCEGTDA RPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW VPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWDGQDQFLSIMY IVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNVDGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQS GSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号30 LFV-008 Trapポリペプチド	10
YSMTPTLTNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGVVRDCEGTDA RPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW VPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWDGQDQFLSAM YIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNVDGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
配列番号31 ヒトIgG1定常領域ドメイン(Fc及びヒンジ領域を含む)のアミノ酸配列	20
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	
配列番号32 LFV-A組換え受容体分子	30
YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSGISNLNVSCLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKK GFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	
配列番号33 LFV-B組換え受容体分子	40
YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSGISNLNVSCLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKK GFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LVNVDGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEKGPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

(上記表の続き)

配列番号34 LFV-C組換え受容体分子 SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVDPGNRISWDSKKGFTIPS YMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNVID FNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFV RVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
配列番号35 LFV-D組換え受容体分子 YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVDPGNRISWDSK GFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LVNVIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVL TIMEVSEKDTGNYTVILTNPISKEKQSHVSVLVVYVPPGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	20
配列番号36 LFV-E組換え受容体分子 GLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSEQRVEVTECS DGLFCKTLT IPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVVYQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLN VSLCARYPEKRFVDPGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYD VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNVIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	30

40

50

【表 1 - 10】

(上記表の続き)

配列番号37 LFV-F組換え受容体分子 GLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDGLFCKTLT IPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVVYQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLN VSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYD VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLG YPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSEKDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLLVVVPPGPG DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号38 LFV-G組換え受容体分子 SPFIASVSDQHGVVYITENKAKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSY MISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDF NWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVR VHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号39 LFV-H組換え受容体分子 SPFIASVSDQHGVVYITENKQKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSY YMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGID FNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFV RVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号40 LFV-I組換え受容体分子 SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLAVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSY MISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDF NWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVR VHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

(上記表の続き)

配列番号41 LFV-J組換え受容体分子	10
SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLQVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPS YMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNIGID FNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFV RVHEKGPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
配列番号42 LFV-K組換え受容体分子	20
SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPS YMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLQCTARTELVNIGID FNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFV RVHEKGPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
配列番号43 LFV-L組換え受容体分子	30
SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPS YMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNIGID FNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKQSTFV RVHEKGPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
配列番号44 LFV-M組換え受容体分子	40
GRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIGGGGSGGSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSIS NLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYR YDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNIGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKF LSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 2】

(上記表の続き)

配列番号45 LFV-N組換え受容体分子 SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPS YMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGID FNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFV RVHEKGGGGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWSR KGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYTHRQTNTIIGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	配列番号46 LFV-O組換え受容体分子 SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPS YMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGID FNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFV RVHEKGGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGRPFVEMYS EIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATV NGHLYKTNLYTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLV VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
配列番号47 LFV-P組換え受容体分子 YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKG FTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLQCTARTE LVNGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK KNSTFVRVHEKGGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 3】

(上記表の続き)

配列番号48 LFV-Q組換え受容体分子

YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKK
 GFTIPSYMISYAGMVFCFAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVQCTARTE
 LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK
 KNSTFVRVHEKGGGGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKR
 IIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK

10

配列番号49 LFV-R組換え受容体分子

GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEI
 GLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIGGGGSGGSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSIS
 NLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCFAKINDESYQSIMYIVVVVGYR
 IYDVVLSPSHGIELSVGEKLVQCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKF
 LSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

20

配列番号50 LFV-S組換え受容体分子

YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKK
 GFTIPSYMISYAGMVFCFAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTE
 LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTK
 KNSTFVRVHEKGGGGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKR
 IIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK

30

40

【表 1 - 1 4】

(上記表の続き)

配列番号51 LFV-001組換え受容体分子

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA
 RPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW
 VPCLVSIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP
 FLVHITGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ
 SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号52 LFV-010組換え受容体分子

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA
 RPYCKVLLLHEVHAQDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW
 VPCLVSIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP
 FLVHITGNELYDVVLSPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKT
 QSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

20

配列番号53 LFV-002組換え受容体分子

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA
 RPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW
 VPCLVSIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP
 FLVHIGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQS
 GSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK

30

40

【表 1 - 1 5】

(上記表の続き)

配列番号54 LFV-003組換え受容体分子

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA
 RPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW
 VPCLVSIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP
 FLVHIGGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ
 SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号55 LFV-004組換え受容体分子

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA
 RPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW
 VPCLVSIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP
 FIVHVTGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ
 SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

20

配列番号56 LFV-005組換え受容体分子

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA
 RPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW
 VPCLVSIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQDFLSNP
 FIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ
 SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

30

40

【表 1 - 16】

(上記表の続き)

配列番号57 LFV-006組換え受容体分子

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA
 RPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW
 VPCLVSIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQD FLSNM
 YIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ
 SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号58 LFV-007組換え受容体分子

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA
 RPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW
 VPCLVSIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQD FLSIMY
 IVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQS
 GSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK

20

配列番号59 LFV-008組換え受容体分子

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDA
 RPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMW
 VPCLVSIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETT WGDQD FLSAM
 YIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQ
 SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

30

40

【実施例】

【0190】

ここで、具体的な実施例と合わせて本発明を更に説明する。これらの実施例は、本発明の例示にすぎず、本発明の範囲を限定する意図のものではないことを理解されたい。以下の実施例において具体的な条件が示されていない実験方法は、概して、従来の条件に従う、又は製造業者によって推奨される条件に従う。他に示されない限り、全ての百分率及び部は重量で与えられる。

【0191】

実施例1-組換え受容体分子の設計及び発現

50

最初に、以下の表 1 A に示すように、V E G F R 2 に由来する異なる配列を含む様々な T r a p ポリペプチドを構築した。T r a p ポリペプチドのいくつかは、V E G F R 1 又は V E G F R 3 に由来する断片を含む。これらの断片は、リンカーを介して互いに作動可能に連結され得た。本明細書で使用される変異部位の番号付け、例えば、N 1 4 3 A、N 1 5 8 Q、N 3 1 8 Q などは、全て配列番号 2 の対応する位置に対するものであった。

【 0 1 9 2 】

【表 2】

表 1 A.

Trapポリペプチド命名法	配列の説明	配列番号
LFV-A	配列番号2のアミノ酸117～218	4
LFV-B	配列番号2のアミノ酸117～327	5
LFV-C	配列番号2のアミノ酸123～327	6
LFV-D	配列番号2のアミノ酸117～421	7
LFV-E	配列番号2のアミノ酸23～327	8
LFV-F	配列番号2のアミノ酸23～421	9
LFV-G	N143A変異を有するLFV-C	10
LFV-H	N143Q変異を有するLFV-C	11
LFV-I	N158A変異を有するLFV-C	12
LFV-J	N158Q変異を有するLFV-C	13
LFV-K	N245Q変異を有するLFV-C	14
LFV-L	N318Q変異を有するLFV-C	15
LFV-M	LFV-CのN末端に作動可能に連結されたVEGFR1のアミノ酸132～230	16
LFV-N	LFV-CのC末端に作動可能に連結されたVEGFR1のアミノ酸132～230	17
LFV-O	LFV-Cに作動可能に連結されたVEGFR1(132～230)-VEGFR2 (225～327)	46
LFV-P	N245Q変異を有するLFV-B	18
LFV-Q	LFV-Pに作動可能に連結されたVEGFR1のアミノ酸132～230	19
LFV-R	N245Q変異を有するLFV-M	20
LFV-S	LFV-Bに作動可能に連結されたVEGFR1のアミノ酸132～230	21
LFV-001又はV0	配列番号2のアミノ酸221～327に作動可能に連結されたVEGFR3の アミノ酸25～216	22

上記の設計された T r a p ポリペプチドの各々は、短い人工リンカー配列 G l y - P r o - G l y (G P G) を介してヒト免疫グロブリン I g G 1 の定常領域 (F c 及びヒンジ領域に融合される) に連結され得、それによって一緒に構築され得る。遺伝子合成、ベクター構築及び抽出の後、上記配列の各々を H E K 2 9 3 又は C H O 細胞 (G i b c o L i f e から購入) に一過性にトランスフェクトし、次いで、得られた混合物を、タンパク質 A を用いた親和性クロマトグラフィー及びモレキュラーシーブを用いた更なる精製を使用して精製した (これらのうち、L F V - D、L F V - F、及び L F V - 0 0 1 / V 0 分子は、タンパク質 A を用いた 1 ステップ精製後に、モレキュラーシーブを用いた更なる精製をすることなく純度要件を満たしていた)。切断 V E G F R 2 及び F c の得られた融合ポリペプチドは、本明細書で組換え受容体分子又はリガンド結合分子とも称した。

【0193】

アイリーア、アバスチン、R3A、及びOPTを対照として使用した。アイリーアは、国際公開第0075319号に開示されている配列に従って使用した。R3Aは、ヒト免疫グロブリンIgG1の定常領域に連結されたVEGFR3のアミノ酸25～329（Fc及びヒンジ領域に融合されている）を使用することによって構築された。OPTを、国際公開第2015／123715（A1）号に記載されるように構築し（これは、VEGFR3のアミノ酸47～314を含むアミノ酸25～329を使用し、国際公開第2015／123715（A1）号に記載されるように104～106位でグリコシル化修飾を受けて、N-D-T配列を非Q-D-T配列に修飾する）、次いで、得られた配列をヒト免疫グロブリンIgG1の定常領域（Fc領域及びヒンジ領域に融合される）に連結し、そのように構築された分子を本明細書でOPTと呼ぶようにした。

10

【0194】

様々な組換え受容体分子の発現及び精製プロファイルを以下の表1Bに示した。

【0195】

【表3】

表1B

Trap分子	タンパク質Aを用いた1ステップ親和性 クロマトグラフィー精製後のSEC単一ピーク純度	モレキュラーシーブを用いた更なる精製後の SEC単一ピーク純度
LFV-A	80%	97.8%
LFV-B	83.5%	96.6%
LFV-C	80%	99.4%
LFV-D	97.2%	/
LFV-E	87%	99.7%
LFV-F	98.5%	/
LFV-Q	66.4%	99.9%
LFV-M	52.1%	99.7%
LFV-P	83.8%	96.7%
LFV-R	78.7%	99.6%
LFV-S	85.4%	95%
R3A	69%	95%
OPT	66%	96%
LFV-001/V0	99.6%	/

20

30

実施例2-VEGFR2及びVEGFR3由来の組換え受容体分子の構築、産生、及び結合試験

40

2.1 組換え受容体分子の構築及び発現

ヒトにおいてより良好な結合能力を有する新規の受容体結合trapタンパク質を構築するために、ヒトVEGFR3由来の断片（配列番号3の25位～216位）及びヒトVEGFR2由来の断片（配列番号2の221位～327位）を構成要素として使用し、それらの間に一連のリンカー配列を設計した（以下の表2Aに示す）。

【0196】

具体的には、LFV-001又はV0については、天然VEGFR3中の配列（配列番号3の217～227位）を使用した。LFV-010については、LFV-001で用いた配列を更にVEGFR3のC末端側に少し伸長させた配列を用いた。LFV-002については、LFV-001に基づいてリンカー配列からThrを除去して長さに柔軟性

50

を導入し、LFV-003については、このThrをGlyで置換して、より大きな柔軟性を骨格構造のねじれに導入した。一方、LFV-004~008では、LFV-001で使用されたVEGFR3由来のリンカー配列を、VEGFR2の対応する領域中のリンカー配列に対して一連の変異に供し（以下の表1に示す）、中でもLFV-008では、VEGFR2由来のIleを、側鎖間の立体衝突を低減するために、より小さい側鎖を有する同じ極性のAlaに変異させた。対照trapタンパク質として、配列番号2の117~327に示されるVEGFR2断片のみを含むLFV-B、及び配列番号3の25~329に示されるVEGFR3断片のみを含むR3Aを設計した。

【0197】

【表4】

表2A

Trapポリペプチド命名法	配列の説明	介在リンカー配列	配列番号
LFV-001/V0	配列番号3の25~216位+配列番号2の221~327位	SNPFLVHITG	22
LFV-010/V0-4	配列番号3の25~216位+配列番号2の221~327位	SNPFLVHITGNELYD	23
LFV-002/V0_2	配列番号3の25~216位+配列番号2の221~327位	SNPFLVHI-G	24
LFV-003/V0_3	配列番号3の25~216位+配列番号2の221~327位	SNPFLVHIGG	25
LFV-004/V1	配列番号3の25~216位+配列番号2の221~327位	SNPFIVHVTG	26
LFV-005/V2	配列番号3の25~216位+配列番号2の221~327位	SNPFIVVVVG	27
LFV-006/V3	配列番号3の25~216位+配列番号2の221~327位	SNMYIVVVVG	28
LFV-007/V4	配列番号3の25~216位+配列番号2の221~327位	SIMYIVVVVG	29
LFV-008/V5	配列番号3の25~216位+配列番号2の221~327位	SAMYIVVVVG	30

上記のtrapポリペプチドの各々は、短い人工リンカー配列Gly-Pro-Gly (GPG)を介してヒトIgG1免疫グロブリンの定常領域 (Fc及びヒンジ領域に融合される) に連結され得、それによって一緒に構築され得る。遺伝子合成、ベクター構築及び抽出の後、上記配列の各々を (Gibco Life製の) HEK293細胞に一過性にトランスフェクトし、次いで、得られた混合物をタンパク質A親和性溶出による1ステップ精製に供して、以下、組換え受容体分子と呼ぶ融合タンパク質を得、それらの発現特徴を以下の表2Bに示した。

10

20

30

40

50

【表 5】
表 2 B

Trapポリペプチド	一過性に形質転換されたHEK293からの収量 (mg/L)	SEC単一ピーク純度
LFV-001/V0	23.6	99.60%
LFV-010/V0-4	127	95.40%
LFV-002/V0_2	11	93.40%
LFV-003/V0_3	63.9	86.80%
LFV-004/V1	74.5	85.90%
LFV-005/V2	52.9	78.20%
LFV-006/V3	11.8	40.00%
LFV-007/V4	2.5	50.60%
LFV-008/V5	9.1	48.70%
/	/	/
LFV-B	38	82.70%
R3A	11	69.00%

2.2 EGF-A、VEGF-C、及びVEGF-Dへの結合試験

VEGF-A165、VEGF-C、及びVEGF-Dポリペプチド分子は、ACRO Biosystems Inc. から購入した。PBS中で調製した100~300 ng/ウェルのVEGF分子を使用して、4℃で一晩コーティングし、翌日、プレートをPBSで洗浄し、1%BSA溶液を添加して室温で2時間遮断し、その後、プレートを再びPBSで洗浄した。実施例1で発現させることによって得られた組換え受容体分子を、PBT溶液(0.05%Tween-20を含むPBS溶液に溶解した0.5%BSA)で高濃度から低濃度に勾配希釈した後、各ウェルに添加し、室温、300 rpmで1.5時間インキュベートした後、プレートをPBST溶液(0.05%Tween-20を含むPBS)で3回洗浄した。PBTで希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートしたヤギ抗ヒトFc二次抗体を添加し、室温、300 rpmで1時間インキュベートした後、プレートをPBST溶液で3回洗浄した。次いで、TMBを添加して発色させ、5%塩酸溶液で終了し、最後にマイクロプレートリーダーを用いて450 nmでのOD値を読み取った。

【0198】

結果を図1に示し、様々な組換えリガンド結合分子が、VEGF-A(VEGF-A165によって代表される)、VEGF-C、及びVEGF-Dに対する結合能力を示した。また、予想外なことに、対照としてのLFV-B分子は、VEGF-C及びVEGF-Dに対してR3Aよりも強い結合能力を示すことも見出された。

【0199】

実施例3-組換え受容体分子のVEGF-Cへの結合

PBS中で調製した100 ng/ウェルのVEGF-Cを使用して、4℃で一晩コーティングし、翌日、プレートをPBSで洗浄し、1%BSA溶液を添加して室温で2時間遮断し、その後、プレートをPBSで再び洗浄した。実施例1における発現によって得られた組換え受容体分子を、高濃度から低濃度まで勾配希釈した後に各ウェルに添加し、室温及び300 rpmで1.5時間インキュベートし、続いて、プレートをPBST溶液で3回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートしたヤギ抗ヒトFc二次抗体を添加し、続いて、室温及び300 rpmで1時間インキュベートした。その後、プレートをPBST溶液で3回洗浄し、次いで、TMBを添加して発色させ、5%塩酸溶液で終

了し、最後にマイクロプレートリーダーを使用して450nmでのOD値を読み取った。

【0200】

図2に示すように、関連する組換え受容体分子は、VEGF-Cに対して良好な結合能力を有し、中でも、LFV-B及びその切断型LFV-Cは、VEGF-Cに対して最適な結合能力を有し、これはOPTの結合能力より優れていた。LFV-EもOPTに近い結合能力を有していた。それらの結合EC₅₀値を以下の表3に示した。

【0201】

【表6】

表3

	R3A	LFV-E	LFV-D	LFV-B	LFV-C	LFV-A	OPT	LFV-F	V0
EC ₅₀ (ng/ml)	161.6	85.19	191.7	16.24	24.16	/	54.59	916	398.5
EC ₅₀ (nM)	1.35	0.71	1.6	0.16	0.24	/	0.45	6.5	3.3

10

実施例4-VEGF-C及びVEGF-DのVEGFR2への結合に対する組換え受容体分子の遮断実験

500ng/ウェルのVEGFR2-Fc(Met1-Glu764)を使用して、4℃で一晩コーティングし、翌日、プレートをPBSで洗浄し、次いで、BSA溶液を添加して室温で2時間遮断した。遮断期間中、各組換え受容体分子を高濃度から低濃度まで連続希釈し、100ng/ウェルのVEGF-C又はVEGF-D(両方ともHisタグで標識)と均等に混合し、室温で30分間インキュベートした。続いて、VEGFR2-Fcプレートを洗浄し、組換え受容体分子とVEGF-C及びVEGF-Dとのインキュベーション溶液をその中に添加して、室温で1時間インキュベーションし、結合させた。プレートをPBSTで洗浄し、次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗ポリヒスチジン二次抗体を添加して、室温で1時間インキュベーションし、結合させた。次いで、プレートをPBSTで洗浄し、TMBを添加して発色させ、5%塩酸溶液で終了し、最後に、マイクロプレートリーダーを使用して450nmでのOD値を読み取った。

20

【0202】

図3に示されるように、関連する組換え受容体分子はある一定の遮断能力を有し、中でもLFV-B及びその切断型LFV-C並びにLFV-Eは最良の遮断能力を有し、全てOPTよりも優れていた。V0分子もまた、VEGF-Cに対するより良好な遮断能力を有していた。VEGF-C及びVEGF-DのVEGFR2への結合に対する各組換え受容体分子の遮断EC₅₀値を、それぞれ以下の表4及び表5に示した。

30

【0203】

【表7】

表4.VEGFR2-VEGFC結合に対する遮断EC₅₀値

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	OPT	LFV-C	LFV-E	V0	R3A	アイリーア	アバステン
EC ₅₀ (ng/ml)	/	58280	24008	2085	3567	2252	2275	3593	7808	/	/
EC ₅₀ (nM)	/	485.7	170.6	20.85	29.7	22.52	18.96	29.9	65.1	/	/

40

50

【表 8】

表 5. VEGFR2-VEGFD 結合に対する遮断 EC₅₀ 値

	LEV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	OPT	LFV-C	LFV-E	V0	R3A	アイリーア	アバスチン
EC ₅₀ (ng/ml)	/	920.4	521.6	26.78	241.3	34.02	50.54	1542	532.2	/	/
EC ₅₀ (nM)	/	7.7	3.7	0.27	2.01	0.34	0.42	12.85	4.4	/	/

10

実施例 5-VEGF-C 及び VEGF-D の VEGFR3 への結合に対する組換え受容体分子の遮断実験

500 ng/ウェルの VEGFR3-Fc (Tyr25-Ile776) を使用して、4℃で一晩コーティングし、翌日、プレートを PBS で洗浄し、次いで、BSA 溶液を添加して室温で 2 時間遮断した。遮断期間中、各組換え受容体分子を高濃度から低濃度まで連続希釈し、10 ng/ウェルの VEGF-C 又は 500 ng/ウェルの VEGF-D (両方とも His タグで標識) と均等に混合し、室温で 30 分間インキュベーションした。その後、VEGFR3-Fc プレートを洗浄し、その中にインキュベーション溶液を添加して、室温で 1 時間インキュベーション及び結合させ、その後、プレートを PBST で洗浄し、次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗ポリヒスチジン二次抗体を添加して、室温で 1 時間インキュベーション及び結合させた。プレートを PBST で洗浄し、次いで、TMB を添加して発色させ、5% 塩酸溶液で終了し、最後にマイクロプレートリーダーを使用して 450 nm での OD 値を読み取った。

20

【0204】

結果を図 4 に示し、遮断結果は、VEGFR2 遮断実験の結果と本質的に一致することが分かった。VEGF-C 及び VEGF-D の VEGFR3 への結合に対する各分子の遮断 EC₅₀ 値を、それぞれ以下の表 6 及び表 7 に示した。

【0205】

【表 9】

表 6. VEGFR3-VEGFC に対する遮断 EC₅₀ 値

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	OPT	LFV-C	LFV-E	V0	R3A	アイリーア	アバスチン
EC ₅₀ (ng/ml)	/	4323	2915	114.6	300.4	106.1	135.8	188.6	560.7	/	/
EC ₅₀ (nM)	/	36.03	20.72	1.15	2.5	1.06	1.13	1.57	4.67	/	/

30

【表 10】

表 7. VEGFR3-VEGFD に対する遮断 EC₅₀ 値

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	OPT	LFV-C	LFV-E	V0	R3A	アイリーア	アバスチン
EC ₅₀ (ng/ml)	/	10049	3440	122.3	688.1	124.6	179.5	2438	2447	/	/
EC ₅₀ (nM)	/	83.74	24.45	1.22	5.73	1.25	1.5	20.32	20.39	/	/

40

実施例 6-組換え受容体分子の VEGF-A への結合

50 ng/ウェルの VEGF-A165 又は VEGF-A121 (ACROBiosy

50

s t e m s I n c . から購入) を使用して、4℃で一晩コーティングし、翌日、プレートをPBSで洗浄し、室温で2時間遮断した。プレートを再びPBSで洗浄し、組換え受容体分子を、高濃度から低濃度まで連続希釈した後に各ウェルに添加し、室温で1.5時間インキュベーションした。続いて、プレートをPBST溶液で3回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトFc二次抗体を添加し、続いて、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBST溶液で3回洗浄し、次いで、TMBを添加して発色させ、5%塩酸溶液で終了し、最後にマイクロプレートリーダーを使用して450nmでのOD値を読み取った。

【0206】

図5に示されるように、LFV-A、LFV-D、及びLFV-Fを除く、全てのVEGFR2関連組換え受容体分子は、より良好なVEGF-A結合能力を有することが分かった。LFV-B及びその切断型LFV-Cは、最適なVEGF-A結合能力を有し、これはアイリーアよりも優れていたが、LFV-Eは、アイリーアに近いVEGF-A結合能力を有していた。VEGF-A165及びVEGF-A121に対する結合EC₅₀値を、それぞれ以下の表8及び表9に示した。

【0207】

【表11】

表8. VEGF-A165への結合EC₅₀

	LFV-C	LFV-E	LFV-B	LFV-D	LFV-F	アイリーア
EC ₅₀ (ng/ml)	12.61	21.19	9.268	476.1	983.4	17.39
EC ₅₀ (nM)	0.126	0.177	0.093	3.97	6.99	0.174

【表12】

表9. VEGF-A121への結合EC₅₀

	LFV-C	LFV-E	LFV-B	LFV-D	LFV-F	アイリーア
EC ₅₀ (ng/ml)	47.59	72.1	31.14	/	/	71.89
EC ₅₀ (nM)	0.476	0.601	0.311	/	/	0.719

実施例7-VEGF-AのVEGFR2への結合に対する組換え受容体分子の遮断実験
500ng/ウェルのVEGFR2-Fcを使用して、4℃で一晩コーティングし、翌日、プレートをPBSで洗浄し、次いで、BSA溶液を添加して室温で2時間遮断した。遮断期間中、各組換え受容体分子を高濃度から低濃度まで連続希釈し、次いで、60ng/ウェルのVEGF-A165又は120ng/ウェルのVEGF-A121(両方ともHisタグで標識)と均等に混合し、室温で30分間インキュベーションした。VEGFR2-Fcプレートを洗浄し、その中にインキュベーション溶液を添加し、室温で1時間インキュベーション及び結合させた。その後、プレートをPBSTで洗浄し、次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗ポリヒスチジン二次抗体を添加し、室温で1時間インキュベーション及び結合させた。その後、プレートをPBSTで洗浄し、TMBを添加して発色させ、5%塩酸溶液で終了した。最後に、マイクロプレートリーダーを用いて450nmでのOD値を読み取った。

【0208】

結果を図6に示し、LFV-B及びその切断型LFV-Cは、より良好な遮断能力を有し、ベバシズマブより優れた、アイリーアに近いレベルに達していた。VEGF-A165及びVEGF-A121のVEGFR2への結合に対する遮断EC₅₀値を、それぞれ以下の表10及び表11に示した。

【0209】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表 1 0. VEGF-A 1 6 5 の VEGFR 2 への結合に対する遮断 EC₅₀

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	LFV-C	LFV-E	アイリニア	アバスチン
EC ₅₀ (ng/ml)	/	/	/	467. 1	456. 8	1111	319. 5	1002
EC ₅₀ (nM)	/	/	/	4. 67	4. 57	9. 26	3. 2	6. 68

【表 1 4】

表 1 1. VEGF-A 1 2 1 の VEGFR 2 への結合に対する遮断 EC₅₀

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	LFV-C	LFV-E	アイリニア	アバスチン
EC ₅₀ (ng/ml)	/	/	/	762. 8	935	1278	954. 9	3356
EC ₅₀ (nM)	/	/	/	7. 63	9. 35	10. 65	9. 55	22. 37

実施例 8 - VEGF-A、VEGF-C、及び VEGF-D に対する結合親和性についての検出実験

Biacore T200 装置での表面プラズモン共鳴法を使用して、親和性を検出した。組換え受容体分子（LFV-B、LFV-E を含み、対照として OPT を含む）をタンパク質 A チップによって捕捉し、1×HBS-E P をランニング緩衝液として使用し、様々な濃度の抗原を 30 μ l / 分の速度で流した。

【0 2 1 0】

検出結果を以下の表 1 2 に示した。LFV-B は、VEGF-C 及び VEGF-D に対して OPT よりも有意に良好な親和性を有し、VEGF-A に対するその親和性もより強く、9. 3 p M に達することが分かった。LFV-E は、VEGF-C 及び VEGF-D に対する親和性が OPT よりもわずかに優れており、K a 値が相対的に低いことにより、LFV-E は、見かけの親和性値が LFV-B と比較して有意に低い、K d 値にあまり差がないため、遮断実験において類似した遮断効力を示した。したがって、OPT の相対的に低い遮断効力は、その相対的に有意に低い K d 値によって説明され得た。

【0 2 1 1】

【表 1 5】

表 1 2 A

	VEGF-A			VEGF-C			VEGF-D		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
LFV-B	1. 13E+07	1. 05E-04	9. 30E-12	4. 32E+06	3. 88E-05	8. 97E-12	1. 51E+04	3. 44E-05	2. 28E-09
LFV-E	2. 99E+06	1. 23E-04	4. 10E-11	9. 38E+05	3. 80E-05	4. 05E-11	5855	8. 67E-05	1. 48E-08
OPT	N/A			3. 29E+06	1. 67E-04	5. 07E-11	1. 74E+04	3. 11E-04	1. 79E-08
VO	2. 822E+06	0. 001524	5. 4E-10	N/A			N/A		

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表 1 2 B.

	VEGF-A			VEGF-C			VEGF-D		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
完全VEGFR2 細胞外ドメイン	3. 727E+	4. 316E	1. 158E	2. 706E+	4. 521E	1. 671E	3. 208E+	6. 728E	2. 098E
	4	-4	-8	4	-4	-8	4	-4	-8

【0 2 1 2】

実施例 9 - P D G Fファミリー分子への結合についての検出実験

本実施例では、V E G F R 2 及びその関連する切断 t r a p 分子の P D G Fファミリー分子への結合も試験した。簡単に述べると、L F V - B、L F V - E、及び V E G F R 2 - F c (V E G F R 2 : M e t 1 - G l u 7 6 4 の完全細胞外ドメイン配列を使用) の P D G Fファミリー分子への結合を、表面プラズモン共鳴法を使用して調べた。それにもかかわらず、予備検出実験において、P D G Fファミリー分子 (R & D S y s t e m s I n c . から購入) は、チップ内で非特異的結合を生成する傾向があり、測定値の偽上昇をもたらし、その結果、検出を完了することができないことが見出された。したがって、P D G F - A A、P D G F - A B、P D G F - B B、及び P D G F - C C 分子を、C M 5 チップ上でのカップリング反応を介して別々に装填し、その後、組換え受容体分子を流入させることにより、親和性決定に対する非特異的結合の影響を効果的に排除した。

【0 2 1 3】

関連する検出結果を以下の表 1 3 に示し、V E G F R 2 の完全細胞外ドメインは、全ての P D G F 分子に対してある特定の結合能力を有するが、L F V - C 及び L F V - B は、P D G Fファミリー分子に対して有意に良好な結合能力を有することが分かり、これは、予想外に、P D G F への結合を担う主要セグメントとしてそれらを特徴付けた。したがって、結合を介して P D G Fファミリー分子を遮断することによって、それらはより強力な治療効果を発揮し、より多くの患者に利益をもたらす得る。L F V - E は、P D G F に対する結合能力が L F V - B 及び L F V - C に近かった。

【0 2 1 4】

【表 1 7】

表 1 3

	LFV-B			LFV-E			LFV-C			VEGFR2-Fc		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
PDGF -AA	5. 79E +03	1. 53E -04	2. 63E -08	1. 40E +05	1. 34E -04	9. 58E -10	3. 42E +04	6. 64E -04	1. 94E -08	-	-	3. 113E -08
PDGF -AB	1. 21E +05	1. 92E -04	1. 59E -09	4. 68E +04	2. 01E -04	4. 29E -09	2. 90E +04	8. 60E -04	2. 96E -08	-	-	3. 506E -08
PDGF -BB	4. 82E +05	4. 70E -04	9. 76E -09	5. 83E +04	3. 11E -04	5. 33E -09	2. 67E +04	5. 51E -04	2. 01E -08	-	-	1. 410E -08
PDGF -CC	-	-	2. 23E -08	-	-	4. 61E -08	-	-	6. 00E -08	-	-	7. 364E -08

実施例 1 0 - マウスにおけるインビボ薬物動態実験

C 5 7 B L / 6 マウスを各群 6 匹ずつ 3 群に分け、各群に尾静脈を介して L F V - B、L F V - E、対照物質 O P T をそれぞれ 4 m g / K g で注射した。注射から 1 時間、2 時間、1 2 時間、2 4 時間、7 2 時間 (3 日)、1 6 8 時間 (7 日)、3 3 6 時間 (1 4 日

）、及び504時間（21日）後に血液を採取し、遠心分離により血清を得た。目的の分子を、抗ヒトFc抗体を用いた捕捉ELISA法を使用して定量化し、薬物動態計算を、WinNonlin（PhoenixTM、バージョン8.0）及び他の関連ソフトウェアを使用して行った。得られたPKデータを図7及び以下の表14に示した。

【表18】

表14

群	$T_{1/2}$ (hr)	AUC_{0-384h} (hr*ng/mL)
G1:OPT	147.79	154722.19
G2:LFV-B	176.09	106657.38
G3:LFV-E	104.22	205515.11

10

3つの分子がインビボで類似のPK特徴を有し、LFV-Eが相対的に最高の血清濃度を有し、LFV-Bが相対的に良好な半減期を有することが分かった。

【0215】

実施例11—ラットにおけるレーザー誘発脈絡膜血管新生に対する治療実験

Brown Norwayラットに麻酔をかけた後、レーザー光凝固装置を用いて視神経乳頭の周囲に光凝固を行ったところ、気泡の出現によりブルッフ膜が破壊されたことが示された。光凝固の12日後に動物のグループ分けを行い、次いで、グループ分けの2日後に、4μlの体積及び40μg/眼の投与量で、眼内注射によって薬物を投与した。投与後10日目又は14日目に、蛍光眼底血管造影検査及び眼底撮影を行った。各群について4グレード蛍光スポットの数を計数し、続いて、統計解析を行った。

20

【0216】

図8に示されるように、LFV-B及びLFV-Cは、PBS及びアイリーア対照群と比較して、4グレードスポットにおいて軽減傾向を示したことが分かった。

【0217】

実施例12—グリコシル化修飾の設計及び検出

LFV-EにおけるN-グリコシル化部位(Asn46、Asn66、Asn96)及びLFV-B、LFV-C内のN-グリコシル化部位(Asn143、Asn158、Asn245、Asn318)を点変異に供して、N-グリコシル化を除去し、Asnを優先的にGln又はAlaに変異させた。

30

【0218】

点変異によって設計された配列を、遺伝子合成、ベクター構築、抽出、並びに細胞トランスフェクション、発現、及び精製に供した。VEGFR2/R1-VEGFA、VEGFR2/R3-VEGFC、VEGFR2/R3-VEGFD結合を遮断するそれらの能力をELISAによって検出し、変異していない元の分子と比較し、発現レベル及び単一ピーク純度と組み合わせて包括的な評価に供した。このようにして、いくつかの変異体を選択した。HEK293細胞をトランスフェクション、発現、及び精製のために使用し、その後、PK検出のためのインビボ実験をマウスにおいて行い、得られた結果を、変異していない元の分子の結果と比較した。上記のグリコシル化修飾組換えタンパク質はまた、異種ペプチドでの組換えにも使用され、関連するELISA実験、細胞実験、及び動物実験が、更なる最適化された選択のために行われた。

40

【0219】

LFV-Cの4つのN-グリコシル化部位(Asn143、Asn158、Asn245、及びAsn318)を点変異に供し、それらの変異設計並びに発現及び精製プロファイルを以下の表15に示した。

50

【表 1 9】

表 1 5

Trap 分子	変異	タンパク質A1ステップ親和性クロマトグラフィー 精製後		モレキュラーシーブ二次精製後	
		収率 (mg/L)	SEC単一ピーク純度	収率 (mg/L)	SEC単一ピーク純度
LFV-G	N143→A	30.7	41%	/	/
LFV-H	N143→Q	32.8	48.7%	2	91.8%
LFV-I	N158→A	14.1	21.2%	/	/
LFV-J	N158→Q	17.3	42.5%	0.33	97.1%
LFV-K	N245→Q	28	81.4%	7.3	99.4%
LFV-L	N318→Q	54	76.6%	17.4	98.7%

10

【0220】

次に、上記実施例に記載の条件に従って、非変異LFV-Cと比較した、異なる濃度のLFV-H、LFV-J、LFV-K、及びLFV-Lの、VEGF-A165、VEGF-C、及びVEGF-Dの受容体への結合に対する遮断能力を、ELISAによって検出した。VEGF-A165-VEGFR1遮断ELISAに使用した実験条件は以下の通りであった。200 ng/ウェルのVEGFR1-Fc (Met1-Asn756) を使用して、4℃で一晩コーティングし、翌日、プレートをPBSで洗浄し、次いで、BSA溶液を添加して室温で2時間遮断した。遮断期間中、各組換え受容体分子を高濃度から低濃度まで連続希釈した後、40 ng/ウェルのVEGF-A165 (Hisタグで標識) と均等に混合し、室温で30分間インキュベーションした。VEGFR1-Fcプレートを洗浄し、その中にインキュベーション溶液を添加して室温で1時間インキュベーション及び結合させ、次いで、プレートをPBSTで洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗ポリヒスチジン二次抗体を添加して室温で1時間インキュベーション及び結合させた。その後、プレートをPBSTで洗浄し、TMBを添加して発色させ、5%塩酸溶液で終了し、最後にマイクロプレートリーダーを用いて450 nmでのOD値を読み取った。

20

30

【0221】

検出結果は図9に示されており、LFV-K分子は、グリコシル化操作なしの分子と比較して、VEGF-A、VEGF-C及びVEGF-Dの受容体への結合に対して優れた遮断能力を有し、それによって、薬物開発のための比較的大きな可能性をもたらすことが分かった。

【0222】

実施例13-新規なVEGFR2-VEGFR1融合タンパク質の設計

VEGF-Aの受容体への結合に対する組換え受容体分子の遮断能力を更に増強するために、VEGFR1の132位～230位の領域、又はVEGFR1の132位～230位の領域とVEGFR2の225位～327位の領域との組み合わせ形態を、LFV-B若しくはLFV-C分子、又はそれらのグリコシル化修飾分子に含め、一過性トランスフェクション並びに発現及び精製をCHO細胞において行った。次に、ELISAを用いてVEGFR2/R1-VEGFA、VEGFR2/R3-VEGFC、及びVEGFR2/R3-VEGFDに対するそれらの遮断能力を検出し、実施例8及び9に記載のシステムを用いてVEGF及びPDGFファミリー分子に対するそれらの遮断能力を検出して、それらが、VEGF-C、VEGF-D及びPDGFファミリー分子の受容体への結合に対するより良好な遮断能力を保持しながら、VEGF-Aの受容体への結合に対する増強された遮断能力を有し、VEGF-B及びPLGFに対する結合能力を有するかどうかを調査した。更に、Biacoreを使用して、PDGFファミリー分子に対するそれらの

40

50

結合能力を検出し、細胞又は動物実験を好ましい融合タンパク質に対して行った。

【0223】

1つの実験において、VEGFR1の132～230位の領域を、LFV-C分子のN末端及びC末端にそれぞれ連結した。VEGFR1の132～230位の領域とVEGFR2の225～327位の領域との組み合わせ型を、連結のために使用されるGSリンカーを用いてLFV-C分子に構築した。このようにして、構築された分子、LFV-M、LFV-N、及びLFV-Oの全配列を、それぞれ配列番号16、配列番号17、及び配列番号46に示し、そのうち、LFV-Mは、VEGFR1の132～230位の領域がLFV-CのN末端に構築された形態であり、LFV-Nは、VEGFR1の132～230位の領域がLFV-CのC末端に構築された形態であり、LFV-Oは、VEGFR1(132～230)-VEGFR2(225～327)とLFV-Cとの組換え形態であった。更に、CHO細胞におけるそれらの発現及び精製プロファイルを表16に示した。

10

【表20】

表16

Trap分子	タンパク質A1ステップ親和性クロマトグラフィー精製後		モレキュラーシーブ二次精製後	
	収率(mg/L)	SEC単一ピーク純度	収率(mg/L)	SEC単一ピーク純度
LFV-M	135.8	52.1%	39.5	99.7%
LFV-N	101.6	55.8%	31.8	99.7%
LFV-O	65	不十分	/	/

20

次いで、上記実施例に記載の条件に従って、ELISAを使用して、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-Dに対するそれらの遮断能力を検出した。結果を図10に示し、LFV-M及びLFV-Nは、VEGF-C、VEGF-Dの受容体への結合に対して、LFV-Cと一致するか又はわずかに優れた遮断能力を有し、それらはまた、VEGF-Aの受容体への結合に対して、LFV-Cと比較して有意に改善された遮断能力を有することを示した。特に、VEGFA-VEGFR1遮断実験において、LFV-M及びLFV-Nは、アイリーアよりも優れた遮断能力を示した。

30

【0224】

VEGF-B及びPLGFの結合能力を検出した：PBS中で調製した200ng/ウェルのVEGF-B又はPLGF(両方ともACROBiosystems Inc.から購入)を4℃で一晩コーティングに使用し、翌日、プレートをPBSで洗浄し、1%BSA溶液を添加して室温で2時間遮断し、その後、プレートをPBSで再度洗浄した。組換え受容体分子を高濃度から低濃度まで連続希釈した後に各ウェルに添加し、室温及び300rpmで1.5時間インキュベーションし、続いて、プレートをPBST溶液で3回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトFc二次抗体を添加し、続いて、室温及び300rpmで1時間インキュベーションした。その後、プレートをPBST溶液で3回洗浄し、次いで、TMBを添加して発色させ、5%塩酸溶液で終了し、最後にマイクロプレートリーダーを使用して450nmでのOD値を読み取った。

40

【0225】

図11に示されるように、LFV-M及びLFV-Nの両方が、VEGF-B及びPLGFへのある程度の結合を示した。

【0226】

実施例14-VEGFR2配列及びVEGFR1配列のグリコシル化修飾融合タンパク質の設計及び試験

LFV-K分子及びLFV-L分子において使用されるグリコシル化修飾型を、LFV-B分子、又はその切断型若しくは伸長型に導入し、得られた配列を、VEGFR1の132位～230位の領域と組み換えて、新しい融合タンパク質を生成した。融合タンパク

50

質を発現させ、精製し、分子レベル及び細胞レベルでの特性解析並びに動物実験に供して、より強力な治療用分子を得た。

【0227】

1つの実験では、L F V - Pと名付けられたN 2 4 5 Q変異を有するL F V - B分子を対照として使用し、L F V - PをV E G F R 1の1 3 2 ~ 2 3 0領域と組み合わせて、L F V - Qと名付けられた新しい融合タンパク質を生成した。L F V - Pの配列を配列番号1 8に示し、L F V - Qの配列を配列番号1 9に示した。L F V - P及びL F V - Qを発現及び精製した後、上記実施例に記載の条件を用いて、V E G F - A、V E G F - C、及びV E G F - Dの受容体への結合を遮断するそれらの能力、並びにV E G F - B及びP L G Fに結合するそれらの能力をE L I S Aによって検出した。

10

【0228】

V E G F - A、V E G F - C及びV E G F - DのV E G F R 2への結合に対する遮断結果は図1 2に示されており、グリコシル化修飾後、L F V - Pは、L F V - Bと比較して、V E G F - A、V E G F - C、及びV E G F - Dの受容体への結合を遮断する優れた能力を有することが分かった。V E G F R 1の1 3 2 ~ 2 3 0領域との融合後、L F V - Qは、V E G F - Aの受容体への結合を遮断する最適な能力を有していた。V E G F - B及びP L G Fへの結合結果を図1 3に示し、これは、V E G F R 1の1 3 2 ~ 2 3 0領域との融合後、L F V - QもV E G F - B及びP L G Fへのより良好な結合能力を有することを示した。

20

【0229】

実施例1 5 - L F V - QのP D G Fファミリー分子への結合についての検出実験

表面プラズモン共鳴法を用いて、L F V - Q分子のP D G Fファミリー分子への結合を検出し、具体的な実施工程は、上記実施例9に記載のものと一貫していた。具体的には、P D G F分子のチップへの非特異的結合を除去するために、カップリング反応によってP D G Fを装填し、続いて、検出される融合タンパク質分子を流入させた。

【0230】

関連する検出結果を表1 7に示した。

【表21】

表1 7

	LFV-Q		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
PDGF-AA	4. 26E+04	4. 42E-04	1. 04E-08
PDGF-AB	2. 96E+04	3. 62E-03	1. 22E-07
PDGF-BB	2. 48E+04	1. 70E-03	6. 85E-08
PDGF-CC	2. 16E+04	12. 14E-03	9. 93E-08

30

L F V - Qは、全てのP D G Fファミリー分子への明確な結合能力を有することが分かった。

40

【0231】

実施例1 6 - L F V - M及びL F V - Qのグリコシル化変異体に関する更なる試験

上記のように、L F V - Qは、V E G F R 2に由来する配列1 1 7 ~ 3 2 7のN 2 4 5位における脱グリコシル化型、すなわち、N 2 4 5がQに変異した型を使用して生成された。グリコシル化を更に調査するために、L F V - M内のN 2 4 5位もQに変異させてグリコシル化を除去し、得られた新しい分子をL F V - Rと名付け、その配列を配列番号2 0に示した。一方、グリコシル化前後の機能比較のために、L F V - QのQ 2 4 5 L F V - QのQ位をNに復帰変異させ、得られた分子をL F V - Sと名付けた。

【0232】

最初に、L F V - R及びL F V - Sを一過性トランスフェクション、発現、及び精製に

50

供し、このプロセス中に、N245位のグリコシル化を除去していないLFV-Mと比較して、N245グリコシル化を除去したLFV-Rは、予想外に、CHO細胞への一過性トランスフェクション及びタンパク質Aを用いた1ステップ精製後に52.1%から78.7%へのSEC単一ピーク純度の上昇を示すことが見出された(図14に示される)。加えて、LFV-Rは、後の段階での水晶体内注入を容易にするために、モレキュラーシーブによる二次精製後にPBS中で濃縮され、最大19.2mg/mlの濃度で依然として良好な溶解度を示すことが見出され、これは、LFV-Rのより良好な下流開発可能性を反映していた。

【0233】

VEGFR2/VEGFR1とVEGF-Aとの間、VEGFR2とVEGF-Cとの間、及びVEGFR2とVEGF-Dとの間の結合に対するこれらの分子の遮断能力を、ELISAを使用して更に検出し、結果を図15に示した。LFV-Rは、VEGFR2とVEGF-Aとの間の結合に対して最適な遮断能力を有し、対照薬物アイリニアよりも有意に良好であることが示された。更に、VEGFR2のVEGF-C及びVEGF-Dへの結合に対するこれらの4つの分子の遮断能力は比較的近く、特にVEGF-Dに対して、それらの遮断能力は対照物質OPTよりも有意に良好であった。

【0234】

加えて、PLGF及びVEGF-Bに対するそれらの結合能力も検出し、結果を図16に示し、これは、LFV-RがPLGF及びVEGF-Bに対して相対的に最適な結合能力を有することを示した。

【0235】

実施例17-LFV-R、LFV-Q、LFV-B、LFV-Cなどの、VEGFファミリー分子に対するELISA結合実験

LFV-R、LFV-Q、LFV-B、及びLFV-C分子のVEGF-Aへの結合を、ELISA法を使用して検出する一方、完全細胞外ドメインを有するVEGFR2-Fc及びアイリニアを対照として使用した。実験結果を図17aに示し、これは、LFV-Rが、対照薬物アイリニアよりも高い、VEGF-Aに対する明らかに最適な結合能力を有することを示した。全ての4つの分子、LFV-R、LFV-Q、LFV-B、及びLFV-Cは、完全細胞外ドメインを有するVEGFR2-Fcよりも有意に高いVEGF-Aに対する結合能力を有していた。

【0236】

LFV-R、LFV-Q、LFV-B、及びLFV-C分子のVEGF-Cへの結合を、ELISA法を用いて検出する一方、完全細胞外ドメインを有するVEGFR2-Fc及びOPTを対照として用いた。実験結果を図17bに示し、これは、LFV-R及びLFV-Qが、LFV-Bの結合能力と同様の、対照物質OPTよりも高い結合能力を有することを示した。全ての4つの分子、LFV-R、LFV-Q、LFV-B、及びLFV-Cは、完全細胞外ドメインを有するVEGFR2-Fcよりも有意に高いVEGF-Cに対する結合能力を有していた。

【0237】

LFV-R、LFV-Q、LFV-B、及びLFV-C分子のVEGF-Dへの結合を、ELISA法を使用して検出し、一方、完全細胞外ドメインを有するVEGFR2-Fc及びOPTを対照として使用した。実験結果を図17cに示し、これは、LFV-R及びLFV-QがLFV-B結合能力と同様の、対照物質OPTよりも有意に高い結合能力を有することを示した。全ての4つの分子、LFV-R、LFV-Q、LFV-B、及びLFV-Cは、完全細胞外ドメインを有するVEGFR2-Fcよりも有意に高いVEGF-Dに対する結合能力を有した。

【0238】

実施例18-LFV-RのPDGFファミリー分子への結合についての検出実験

LFV-RのPDGFファミリー分子への結合は、上記実施例9に記載されたものと一貫する特定の実施工程を用いて、表面プラズモン共鳴法を使用して検出した。PDGF分

10

20

30

40

50

子のチップへの非特異的結合を除去するために、PDGFをカップリング反応によって装填し、続いて、検出する融合タンパク質分子を流入させた。関連する検出結果を以下の表18に示した。

【表22】

表18

抗体 抗原	LFV-R		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
PDGF-AA	2190	0.001108	5.059E-7
PDGF-AB	1.570E+4	0.001439	9.166E-8
PDGF-BB	5.119E+4	2.224E-4	4.345E-9
PDGF-CC	9382	8.467E-4	9.025E-8

10

【0239】

LFV-Rは、PDGF-AA、AB、BB、及びCCの全てに対して明確な結合能力を有することが分かった。

【0240】

実施例19-HUVECに対する細胞増殖阻害の検出実験

VEGF-A+VEGF-C分子の1:1混合物を使用して、HUVEC細胞の増殖を刺激する一方、異なる濃度のLFV-R、アイリニア、及びOPT分子を添加した。細胞を72時間培養した後、MTSを発色観察に使用して、細胞増殖に対する異なる薬物の阻害効力を検出した。図18aに示すように、LFV-Rのみが有意な阻害効力を示し、約3μg/mlの濃度で完全な阻害効果を達成したのに対し、OPTは阻害効果を示さず、アイリニアは超高濃度(30μg/ml超)でのみ完全に阻害効力を示したことが分かった。

20

【0241】

更に、現在有望な治療アプローチとして、HUVECに対する増殖阻害検出のためにアイリニアとOPTとを一緒に混合し(1:1混合物)、LFV-R及びLFV-Qを混合物と比較した。図18bに示すように、OPTと混合されたアイリニアは、それらを別々に使用した場合と比較して、HUVEC細胞の増殖を完全に阻害することができた。更に、LFV-Rは、アイリニア+OPT及びLFV-Qよりも良好なIC₅₀を有していただけでなく、アイリニア+OPT及びLFV-Qと比較して、より低い濃度で有意に高い阻害効力も示し、これは、硝子体内投与後の濃度減衰期間中であっても持続的な阻害効力を維持するのに有益であり、それによって治療利益を改善し、注射間隔を延長する。

30

【0242】

実施例20-ラットにおけるレーザー誘発脈絡膜血管新生に対する治療実験

24匹のBrown-Norwayラットを、体重に基づいて各群6匹の動物ずつ、無作為に4つの群に分け、半分が雄及び半分が雌であり、それぞれモデル対照群、LFV-R群、LFV-Q群及びアイリニア群であった。まず、ラットの両側眼底にレーザーモデリングを行った後、モデリング3日目に0.9%塩化ナトリウム、LFV-R、LFV-Q、又はアイリニアをそれぞれ4μL/眼の投与量で両眼の硝子体に単回注入した。全ての群の投与濃度は10mg/mLであり、投与量は40μg/眼であり、投与日を実験1日目と定義した。実験中、各群の生存ラットの状態を毎日観察した。モデリング前及び投与後18日目に眼底撮影及び蛍光眼底血管造影検査を行い、各群における血管新生増殖及び漏出プロファイルを観察し、各群の薬効を比較した。

40

【0243】

図19に示されるように、LFV-R、LFV-Q、及びアイリニアの3つの治療群は全て、モデル対照群と比較してより低い4グレードスポット割合及び蛍光漏出面積を示し、LFV-R及びLFV-Q治療群における4グレード蛍光スポット割合から、対照群及

50

びアイリーア群と比較して有意に統計的差異が明らかになった。

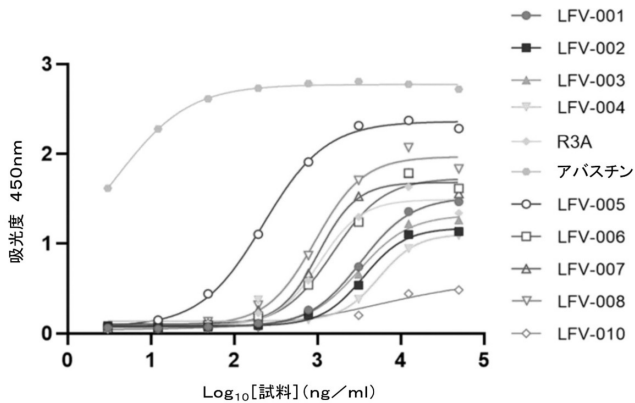
【 0 2 4 4 】

当業者であれば更に、本発明が、その趣旨又は中心的属性から逸脱することなく、他の特定の形態で具現化され得ることを理解するであろう。本発明の前述の説明は、その例示的な実施形態のみを開示しているため、他の変形形態が本発明の範囲内にあると認識されることを理解されたい。したがって、本発明は、本明細書で詳細に説明された特定の実施形態に限定されない。むしろ、本発明の範囲及び内容を示すものとして添付の特許請求の範囲を参照すべきである。

【 図 面 】

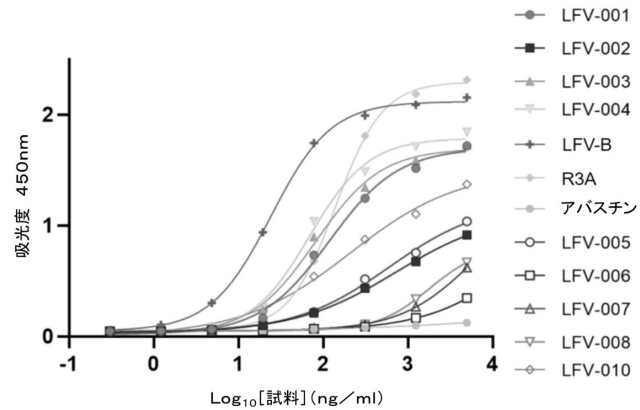
【 図 1 a 】

VEGF-A165への結合についてのELISA結果



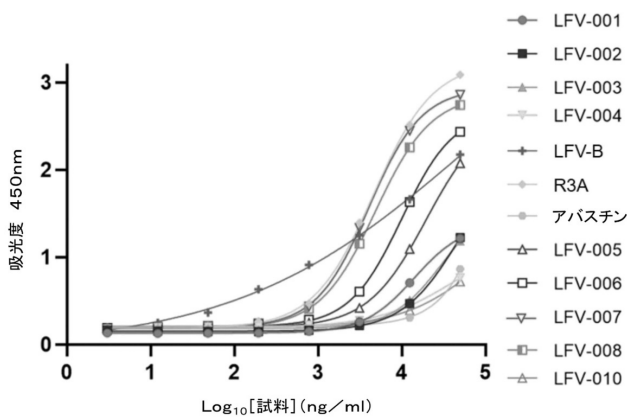
【 図 1 b 】

VEGF-Cへの結合についてのELISA結果



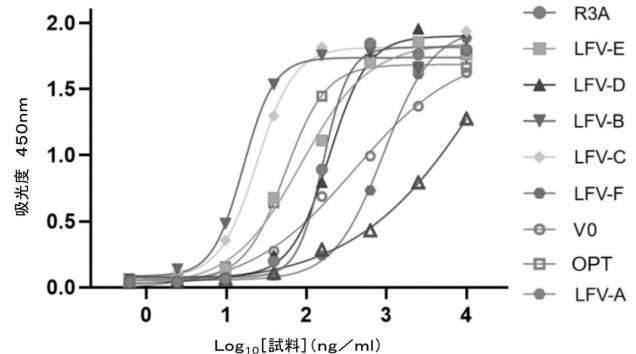
【 図 1 c 】

VEGF-Dへの結合についてのELISA結果



【 図 2 】

VEGF-Cへの結合についてのELISA結果



10

20

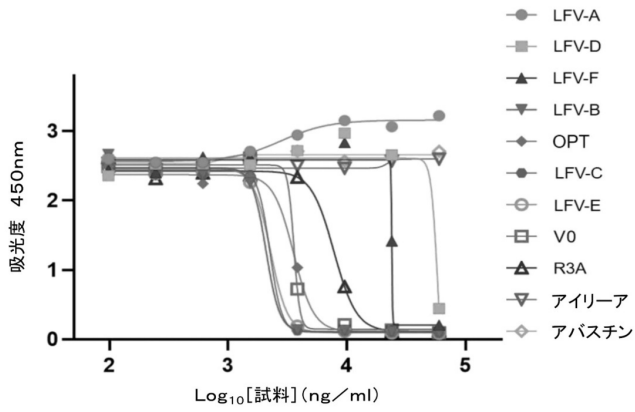
30

40

50

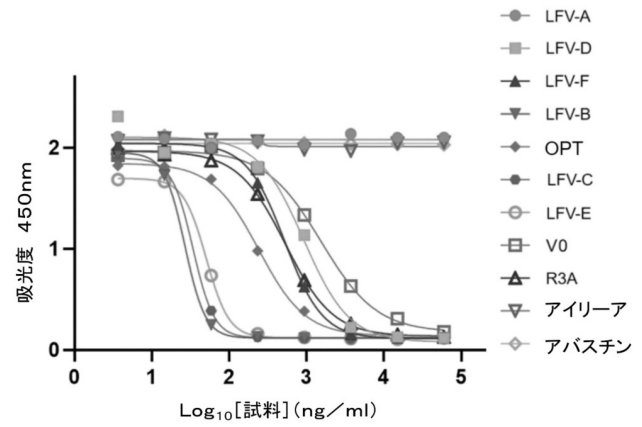
【図 3 a】

VEGFR2-VEGF Cに対する遮断ELISA結果



【図 3 b】

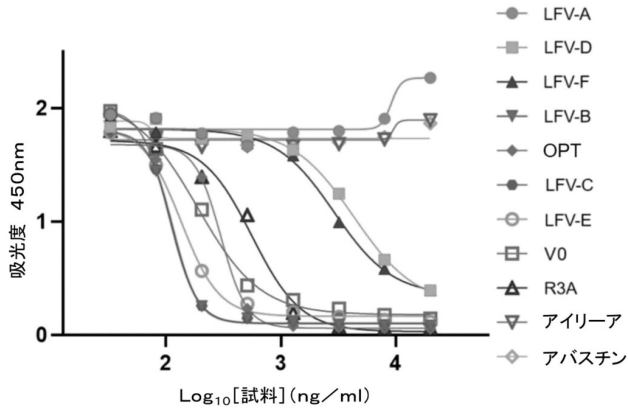
VEGFR2-VEGF Dに対する遮断ELISA結果



10

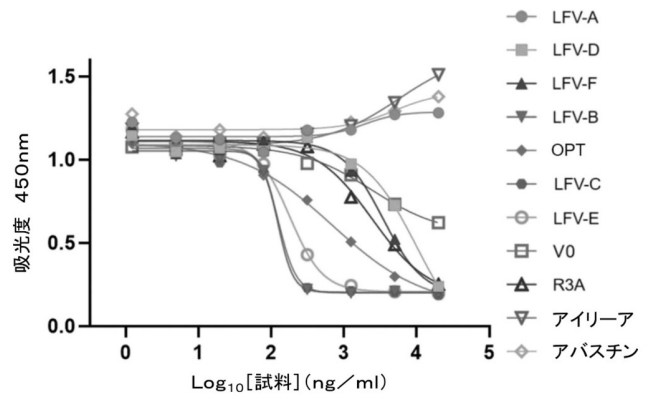
【図 4 a】

VEGFR3-VEGF Cに対する遮断ELISA結果



【図 4 b】

VEGFR3-VEGF Dに対する遮断ELISA結果



20

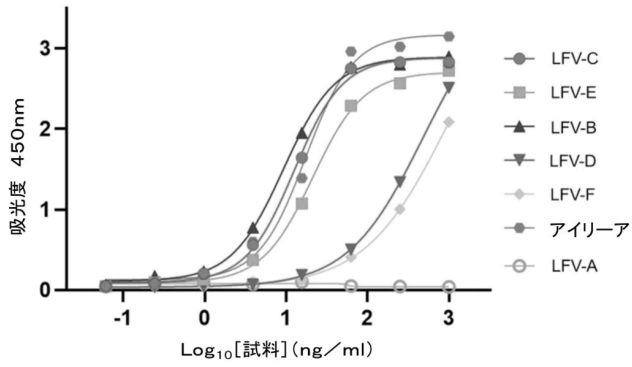
30

40

50

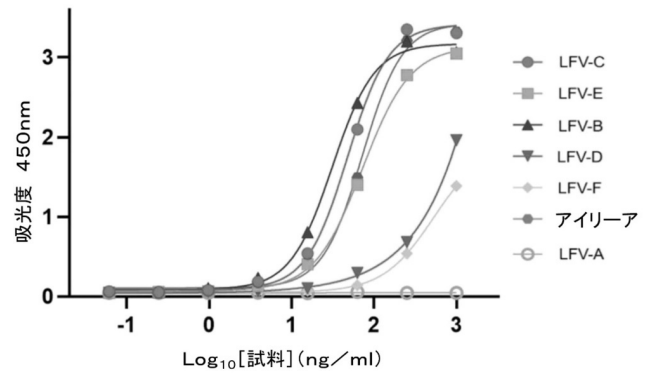
【図 5 a】

VEGF-A165への結合についてのELISA結果



【図 5 b】

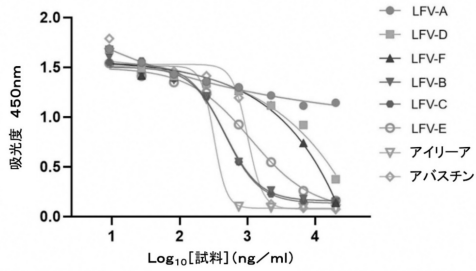
VEGF-A121への結合についてのELISA結果



10

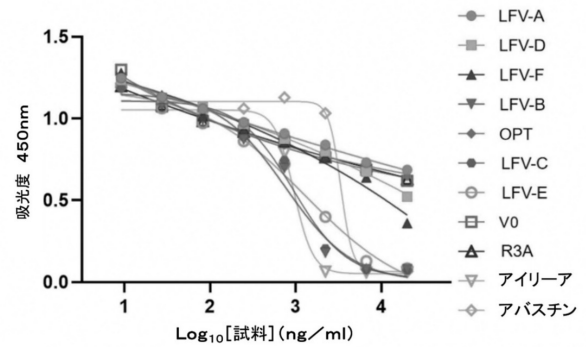
【図 6 a】

VEGF-A165のVEGFR2への結合に対する遮断結果



【図 6 b】

VEGF-A121のVEGFR2への結合に対する遮断結果



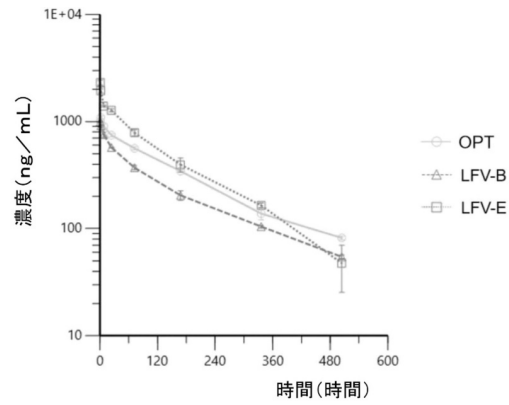
20

30

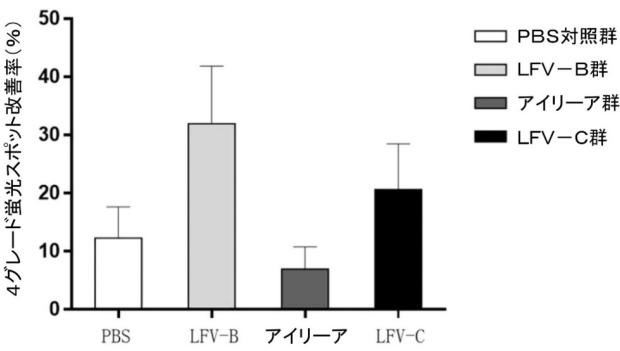
40

50

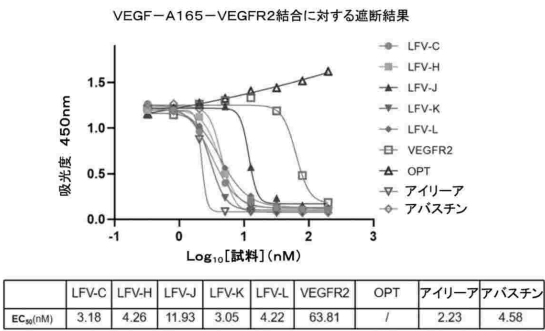
【図 7】



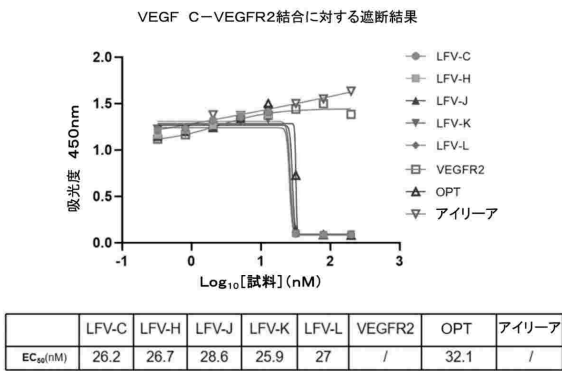
【図 8】



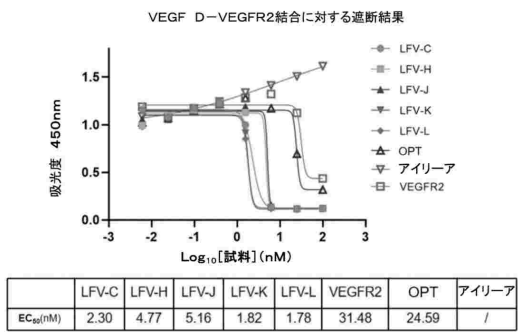
【図 9 a】



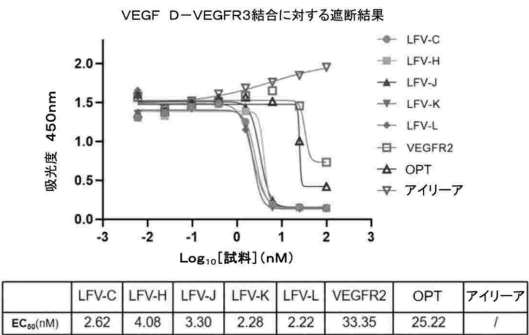
【図 9 b】



【図 9 c】



【図 9 d】



10

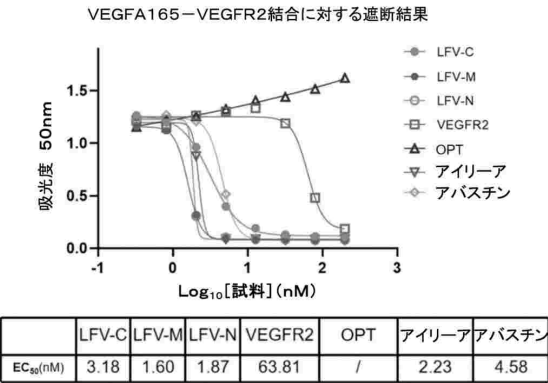
20

30

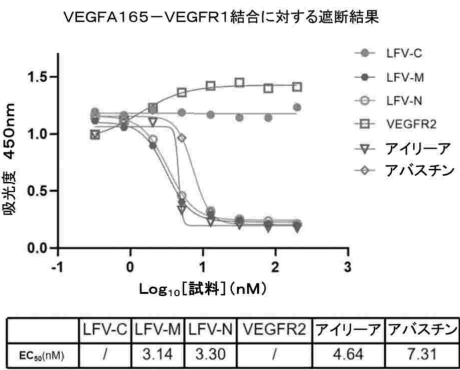
40

50

【図 10 a】

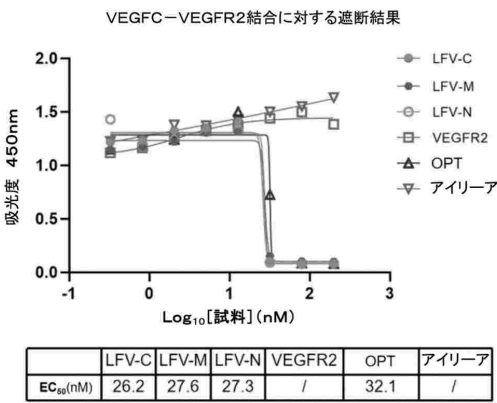


【図 10 b】

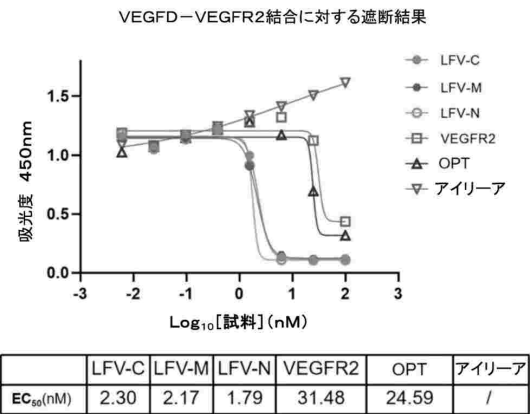


10

【図 10 c】



【図 10 d】



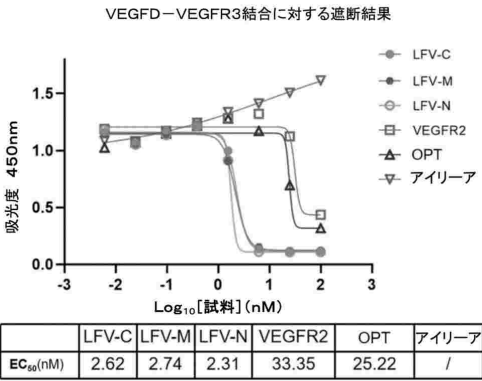
20

30

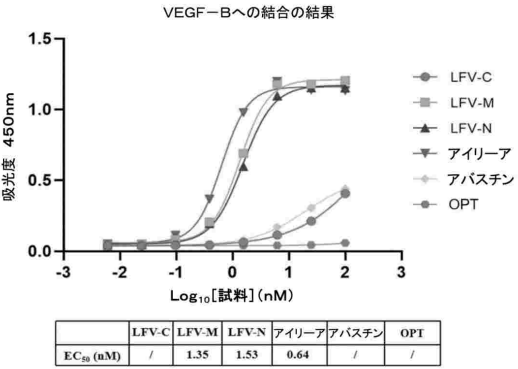
40

50

【図 1 0 e】

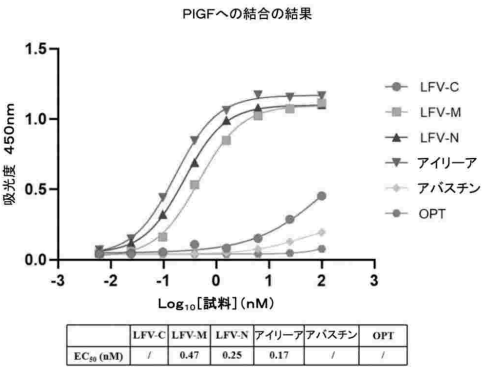


【図 1 1 a】

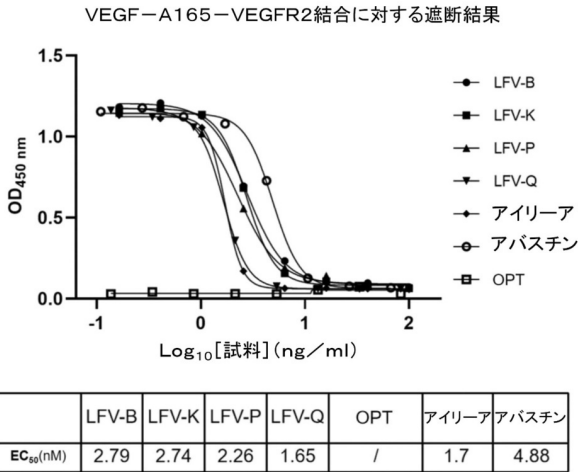


10

【図 1 1 b】



【図 1 2 a】



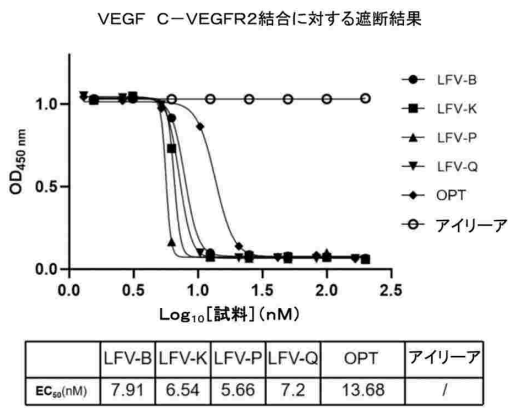
20

30

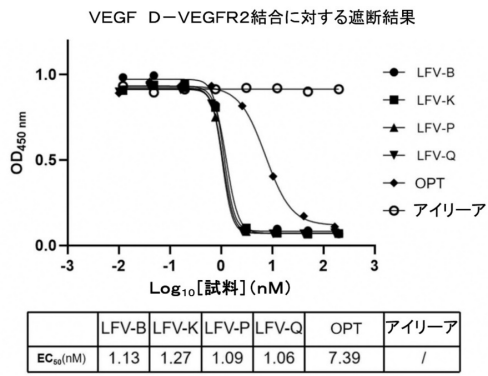
40

50

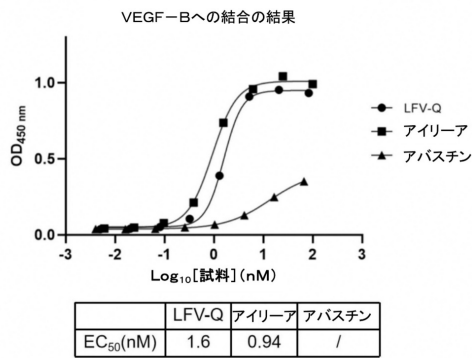
【図 1 2 b】



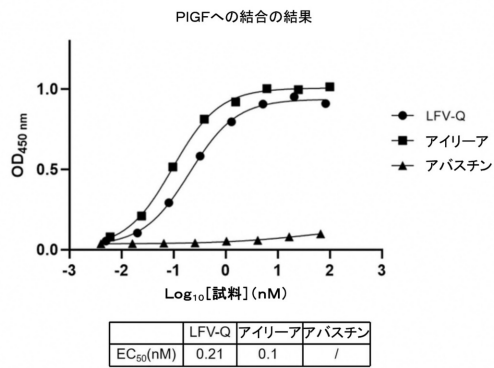
【図 1 2 c】



【図 1 3 a】



【図 1 3 b】



10

20

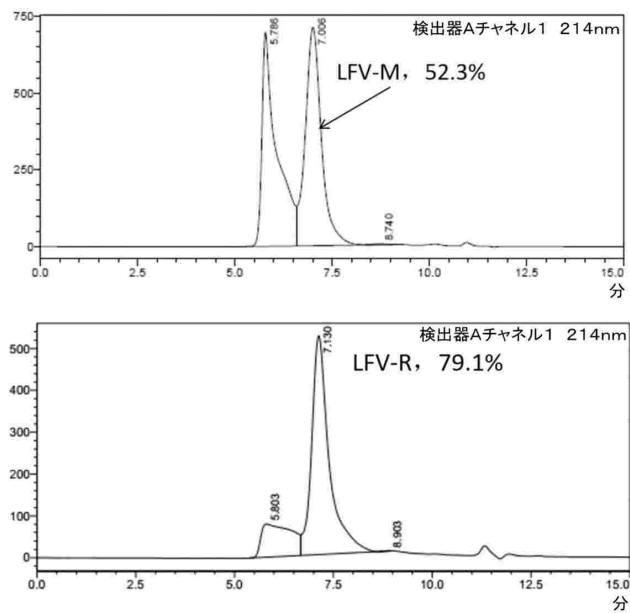
30

40

50

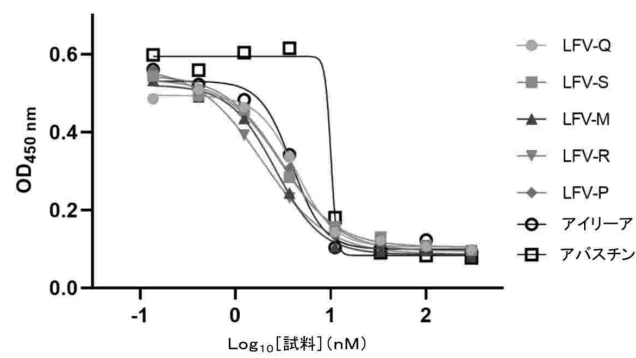
【図 1 4】

タンパク質Aを用いた1ステップ精製後のLFV-M及びLFV-RのSEC検出データ



【図 1 5 a】

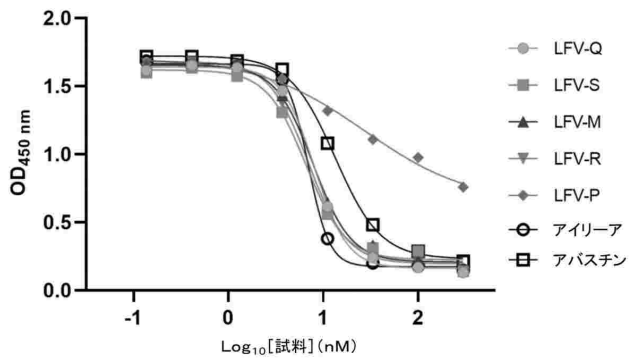
VEGF-A165-VEGFR2結合に対する遮断結果



	LFV-Q	LFV-S	LFV-M	LFV-R	LFV-P	アイリニア	アバスチン
EC50(nM)	4.323	3.025	2.645	1.901	3.096	3.937	10.04

【図 1 5 b】

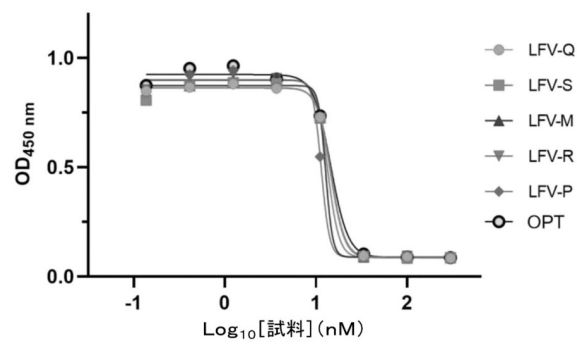
VEGF-A165-VEGFR1結合に対する遮断結果



	LFV-Q	LFV-S	LFV-M	LFV-R	LFV-P	アイリニア	アバスチン
EC50(nM)	8.105	6.588	7.797	6.972	27.16	6.959	13.35

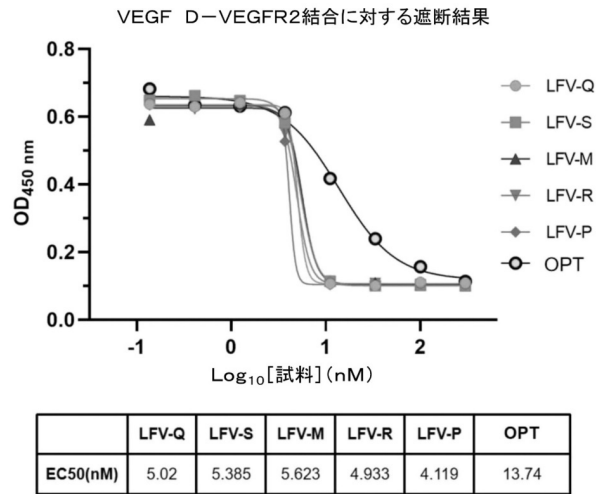
【図 1 5 c】

VEGF C-VEGFR2結合に対する遮断結果

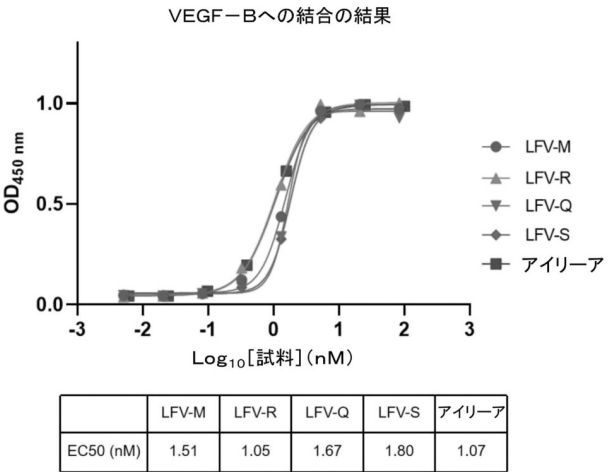


	LFV-Q	LFV-S	LFV-M	LFV-R	LFV-P	OPT
EC50(nM)	14.59	14.45	12.76	13.37	11.43	14.54

【図 1 5 d】

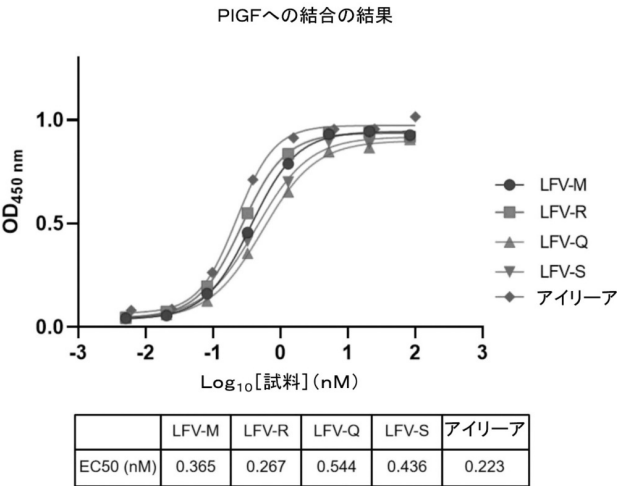


【図 1 6 a】

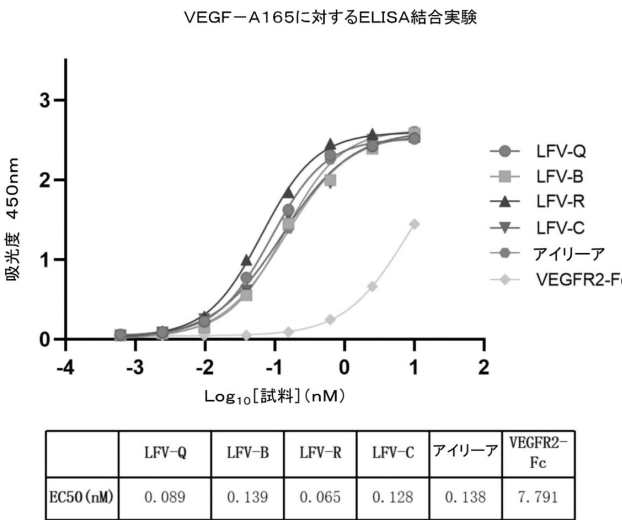


10

【図 1 6 b】



【図 1 7 a】



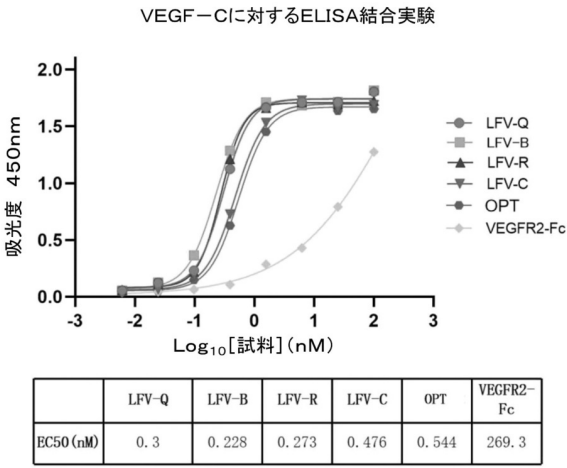
20

30

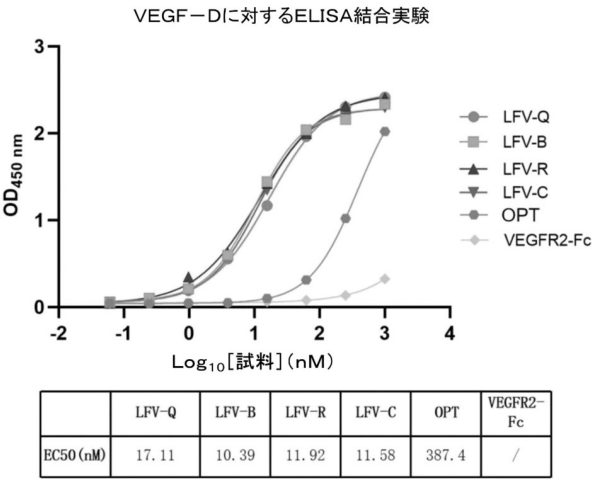
40

50

【図 1 7 b】

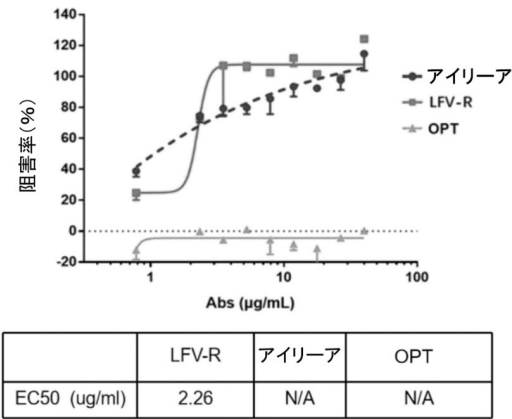


【図 1 7 c】

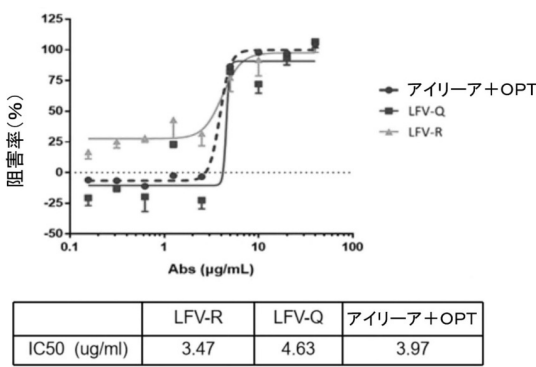


10

【図 1 8 a】



【図 1 8 b】



20

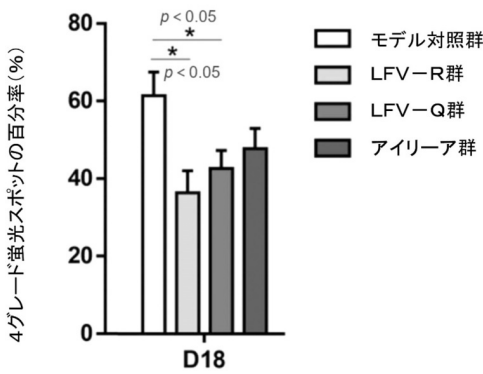
30

40

50

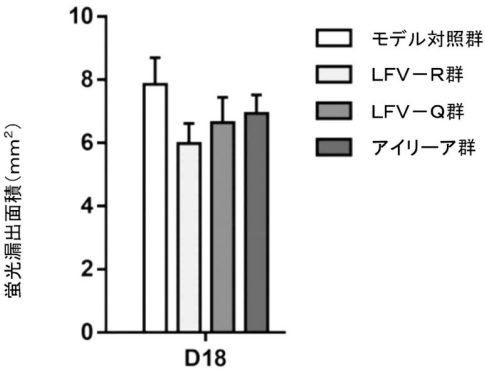
【図 19 a】

投与18日目の4グレード蛍光スポットの百分率の分析結果



【図 19 b】

投与18日目の蛍光漏出面積の分析結果



【配列表】

2024543158000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2021/132735
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/71(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 血管内皮生长因子, 受体, 域, 免疫球蛋白, 样, vascular endothelial growth factor, receptor, VEGF, VEGFR, domain, immunoglobulin, ig, like, 本申请的SEQ ID NOs: 2, 4-15, 18, 32-59		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Sandra Markovic-Mueller, et al. "Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracellular Domain in Complex with VEGF-A" <i>Structure</i> , Vol. 25, 07 February 2017 (2017-02-07), entire document, and in particular, p. 341, right-hand column, lines 27-30, p. 342, right-hand column, paragraph 3, p. 343, right-hand column, last paragraph, and abstract	1-17 (in part), 18, 19-30 (in part)
Y	Veli-Matti Leppänen, et al. "Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2" <i>PNAS</i> , Vol. 107, No. 6, 09 February 2010 (2010-02-09), entire document, and in particular, p. 2425, right-hand column, paragraph 3, p. 2426, left-hand column, paragraph 1, right-hand column, paragraph 2, and abstract	1-17 (in part), 18, 19-30 (in part)
☐ 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 "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 07 December 2021		Date of mailing of the international search report 23 March 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2021/132735
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: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/132735

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.: 1-17和19-30
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:
 - [1] Claims 1-17 and 19-30 relate to a large number of possible compounds, violating the requirements of PCT Articles 5 and 6 for the reason that part of the sequence of SEQ ID NO: 2 that is sequence-defined in claim 1 may be derived from VEGFR1, and in combination with the definition of expressions such as "containing" and "deriving", novelty spillover is caused, and the specific examples disclosed in the description are far exceeded. The noncompliance on the substantive provisions has reached such an extent that when the extent of the search for claims 1-17 and 19-30 was determined, the noncompliance parts were taken into account before the search was performed. Therefore, the search for claims 1-17 and 19-30 was limited to an invention based on a hybrid or fusion peptide comprising domains in VEGFR1 and VEGFR2.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2021/132735
A. 主题的分类 C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/71(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, DWP1, S1P0ABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统:血管内皮生长因子, 受体, 域, 免疫球蛋白, 样, vascular ndothelial growth factor, receptor, VEGF, VEGFR, domain, immu-noglobulin, ig, like, 本申请的SEQ ID NOs; 2, 4-15, 18, 32-59		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	Sandra Markovic-Mueller, 等. "Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracell-ular Domain in Complex with VEGF-A" Structure, 第25卷, 2017年2月7日 (2017 - 02 - 07), 全文, 尤其是第341页右栏第27-30行, 第342页右栏第3段, 第343页右栏最后一段和摘要	1-17(部分), 18, 19-30(部分)
Y	Veli-Matti Leppänen, 等. "Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2" PNAS, 第107卷, 第6期, 2010年2月9日 (2010 - 02 - 09), 全文, 尤其是第2425页右栏第三段, 第2426页左栏第一段, 右栏第二段和摘要	1-17(部分), 18, 19-30(部分)
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☐ 见同族专利附件。 * 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年12月7日		国际检索报告邮寄日期 2022年3月23日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 吴永庆 电话号码 +86-10-62089161

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2021/132735
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: ☒ 附件C/ST. 25文本文件形式 ☐ 纸件或图形文件形式 b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的: c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的: ☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a)) ☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段) 2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。 3. 补充意见:		

国际申请号

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

10

- 20

30

40

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 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
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	C
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	

G,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,
GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,
MA,MD,ME,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 W E E N

- (74)代理人 100099759
弁理士 青木 篤
- (74)代理人 100123582
弁理士 三橋 真二
- (74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100123593
弁理士 関根 宣夫
- (74)代理人 100208225
弁理士 青木 修二郎
- (74)代理人 100217179
弁理士 村上 智史
- (74)代理人 100227592
弁理士 孔 詩麒
- (72)発明者 チャン チエンーシン
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 0 0 0, スーチョウ, シアンチョン ディストリクト, ホアン
タイ タウン, チャンピン ロード 1 7, ビルディング1, ルーム 4 0 7
- (72)発明者 イン チンチン
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 0 0 0, スーチョウ, シアンチョン ディストリクト, ホアン
タイ タウン, チャンピン ロード 1 7, ビルディング1, ルーム 4 0 7

F ターム (参考) 4B064 AG20 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25
CA44
4C084 AA02 BA01 BA08 BA22 CA18 DC50 NA14 ZA331 ZA332
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA51 DA76 EA24
FA74