

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6408492号  
(P6408492)

(45) 発行日 平成30年10月17日(2018.10.17)

(24) 登録日 平成30年9月28日(2018.9.28)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 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

請求項の数 14 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-557292 (P2015-557292)  
 (86) (22) 出願日 平成26年2月13日(2014.2.13)  
 (65) 公表番号 特表2016-508372 (P2016-508372A)  
 (43) 公表日 平成28年3月22日(2016.3.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2014/000114  
 (87) 国際公開番号 W02014/124487  
 (87) 国際公開日 平成26年8月21日(2014.8.21)  
 審査請求日 平成29年2月10日(2017.2.10)  
 (31) 優先権主張番号 61/765,841  
 (32) 優先日 平成25年2月18日(2013.2.18)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/782,376  
 (32) 優先日 平成25年3月14日(2013.3.14)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 515221635  
 ヴェジェニクス プロプライエタリー リ  
 ミテッド  
 VEGENICS PTY LIMITE  
 D  
 オーストラリア連邦 ビクトリア州 3 1  
 4 1, サウスヤラ, チャペルストリート  
 6 5 0, レベル 4, スイート 0 4 0 3  
 (74) 代理人 110001302  
 特許業務法人北青山インターナショナル  
 (72) 発明者 ジェロメッタ, マイケル  
 オーストラリア連邦 クイーンズランド州  
 4 1 0 9, ロバートソン, カーナウスト  
 リート 1 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リガンド結合分子およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

( i ) 配列番号 2 の位置 4 7 ~ 3 1 4、又は、配列番号 2 の位置 2 5 ~ 3 1 4、により規定されるアミノ酸の配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むが、配列番号 2 の位置 1 0 4 ~ 1 0 6 に対応するポリペプチドの位置は、N - X - S にも N - X - T にも一致しないリガンド結合ポリペプチドを含み、且つ

( i i ) 免疫グロブリン定常ドメインフラグメントに連結した、  
 リガンド結合分子において、

前記ポリペプチドおよび前記分子が、ヒト V E G F - C および V E G F - D から選択される、少なくとも 1 つのリガンドポリペプチドに結合することを特徴とするリガンド結合分子。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のリガンド結合分子において、前記リガンド結合ポリペプチドが、配列番号 2 の位置 3 3 ~ 3 5、配列番号 2 の位置 1 6 6 ~ 1 6 8、配列番号 2 の位置 2 5 1 ~ 2 5 3、および配列番号 2 の位置 2 9 9 ~ 3 0 1 に対応する 4 つの N 糖鎖付加シークオン部位を保持することを特徴とするリガンド結合分子。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のリガンド結合分子において、前記 4 つの N 糖鎖付加シークオン部位でグリコシル化されていることを特徴とするリガンド結合分子。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載のリガンド結合分子において、前記リガンド結合ポリペプチドが、配列番号 2 の位置 4 7 ~ 3 1 4、または配列番号 2 の位置 2 5 ~ 3 1 4 によって規定されるアミノ酸の配列に同一であるアミノ酸配列を含むことを特徴とするリガンド結合分子。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 の何れか 1 項に記載のリガンド結合分子において、配列番号 2 の位置 1 0 4 に対応する、前記リガンド結合ポリペプチド中のアミノ酸が欠失しているか、またはグルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、およびリジンからなる群から選択される他のアミノ酸に置換されていることを特徴とするリガンド結合分子。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 の何れか 1 項に記載のリガンド結合分子において、前記リガンド結合ポリペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸 2 3 ~ 2 9 0 を含むことを特徴とするリガンド結合分子。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 の何れか 1 項に記載のリガンド結合分子において、前記リガンド結合分子が配列番号 3 のアミノ酸 2 3 ~ 5 3 7、又は配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含むことを特徴とするリガンド結合分子。

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 の何れか 1 項に記載のリガンド結合分子をコードするコード化ヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項 8 のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 10】

請求項 8 に記載のポリヌクレオチドにより、または請求項 9 に記載のベクターにより形質転換またはトランスフェクトされた単離細胞または細胞株。

【請求項 11】

リガンド結合分子を作製する方法であって、前記ポリヌクレオチドによってコードされた前記リガンド結合分子が発現される条件下で、請求項 10 に記載の細胞を増殖させること、及び、選択的に、前記細胞または前記細胞の増殖培地から前記リガンド結合ポリペプチドまたは前記リガンド結合分子を精製または単離することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 12】

( i ) 請求項 1 乃至 7 の何れか 1 項に記載のリガンド結合分子、請求項 8 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 9 に記載のベクターと、

( i i ) 薬学的に許容される希釈剤、補助剤、賦形剤、または担体とを含むことを特徴とする組成物。

【請求項 13】

それを必要とする被験体における、血管新生を阻害するための、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

異常な血管新生及び / 又はリンパ脈管新生 ;

過度の血管内皮細胞増殖、血管透過性、浮腫または炎症に特徴付けられる病態、損傷、脳卒中、または腫瘍に関連した脳浮腫 ;

炎症性障害、乾癬、関節炎、関節リウマチに関連した浮腫 ;

喘息 ;

熱傷に関連した全身性浮腫 ;

腫瘍、炎症、または外傷に関連した腹水および胸水 ;

慢性的な気道炎症 ;

毛細血管漏出症候群 ;

敗血症 ;

10

20

30

40

50

タンパク質漏出の増大に関連した腎臓病；	
新生血管に関連した眼疾患；	
脈絡膜血管新生；	
糖尿病性黄斑浮腫；	
加齢黄斑変性症；	
増殖性糖尿病網膜症；	
網膜静脈閉塞；	
角膜血管新生 / 移植拒絶反応；	
ウェット加齢黄斑変性症；	
高血圧性網膜症；	10
糖尿病性網膜症；	
鎌状細胞網膜症；	
周辺部網膜血管新生；	
未熟児網膜症；	
静脈閉塞；	
動脈閉塞；	
中心性漿液性脈絡網膜症；	
類嚢胞黄斑浮腫；	
網膜毛細管拡張症；	
動脈瘤；	20
網膜血管腫症；	
放射線誘発性網膜症；	
虹彩血管新生；	
眼瞼腫瘍、結膜腫瘍、脈絡膜腫瘍、虹彩腫瘍、視神経腫瘍、網膜腫瘍、浸潤性眼内腫瘍、及び眼窩腫瘍を含む眼の腫瘍；	
に関連する疾患の治療又は防止に使用するための請求項 1 2 に記載の組成物。	
【発明の詳細な説明】	
【技術分野】	
【0001】	
本発明は、概して、特に眼科学および腫瘍学における脈管増殖の調節に関する。	30
【0002】	
配列表	
電子配列表は本明細書の一部を形成する。	
【背景技術】	
【0003】	
血管内皮増殖因子（VEGF）タンパク質およびその受容体（VEGFR）は、両方の脈管形成、早期分化段階の内皮細胞からの胚血管系の発生、血管新生、既存血管からの新規血管の形成過程と、リンパ脈管新生、新規リンパ管の形成過程とに重要な役割を果たす。血小板由来増殖因子（PDGF）タンパク質およびその受容体（PDGFR）は、いくつかの細胞型の細胞増殖、生存、および遊走の調節に関与する。	40
【0004】	
内皮細胞調節系の機能障害は、癌ならびに異常な脈管形成、血管新生、およびリンパ脈管新生に関連した種々の疾患の重要な特徴である。	
【0005】	
血管新生は、胚発生、ならびに正常組織の増殖、修復、および再生、雌の生殖周期、妊娠の成立および維持、創傷および骨折の修復において生じる。健常個体で起こる血管新生に加えて、血管新生事象は、いくつかの病的過程、特に腫瘍の増殖および転移、ならびに血管増殖、特に微小血管系の増殖が増大する、糖尿病性網膜症、乾癬、および関節症などの他の病態に関与する。血管新生の阻害は、これらの病的過程の防止もしくは緩和に、またはそれらの進行の遅延に有用である。	50

## 【 0 0 0 6 】

受容体を介する V E G F / P D G F シグナル伝達を遮断するように意図した療法が、血管新生および腫瘍増殖の阻害に有望であることが示されているが、このような疾患の治療のための新規または改良された化合物および療法が依然として求められている。

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 7 】

本発明は、異常な血管新生、リンパ脈管新生、またはその両方の阻害ならびに血管内皮増殖因子 C ( V E G F - C ) および血管内皮増殖因子 D ( V E G F - D ) の他の作用の阻害のための新規組成物およびその使用方法に関するものであり、 V E G F - C および V E G F - D のそれぞれは、少なくとも 1 つの増殖因子受容体型チロシンキナーゼ ( すなわち、 V E G F R - 2 または V E G F R - 3 ) に結合し、そのリン酸化を刺激することができる。本発明の組成物は、ヒト V E G F - C およびヒト V E G F - D の一方または両方に結合するリガンド結合分子を含む。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、ポリペプチド、例えば、増殖因子受容体型チロシンキナーゼの細胞外ドメイン ( E C D ) のフラグメントを含む。このフラグメントは、増殖因子結合を消失させない形で野生型配列と異なっているとしてもよく、またこのフラグメントは、好ましくは、必要とする被験体 / 患者に投与するための、治療薬としてのその特性を改善するように本明細書に記載する方法で操作される。

10

## 【 0 0 0 8 】

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核酸を提供する。この核酸は、ポリペプチドリガンド結合分子を発現させるために有用であり、また一部の実施形態では、 *i n v i v o* で、生物活性型のポリペプチドリガンド結合分子を発現させるための治療薬としても有用である。

20

## 【 0 0 0 9 】

本明細書に記載するリガンド結合分子 ( またはそれをコードするポリヌクレオチド ) を含む組成物を、それを必要とする患者に投与することにより、 V E G F 受容体の増殖因子刺激が阻害され ( 例えば、受容体のリン酸化が阻害され ) 、それによって、以下に限定されるものではないが、 V E G F R 媒介の血管新生、リンパ脈管新生、またはその両方を含む、受容体を介して媒介される生物応答が阻害される。

## 【 0 0 1 0 】

V E G F - C および D は、 V E G F R - 2 および V E G F R - 3 から選択される少なくとも 1 つの V E G F 受容体 ( または受容体ヘテロ二量体 ) に高親和性で結合し、そのリン酸化を刺激する。この記載は、同族受容体に対する増殖因子の周知の特性について言及するものであり、本発明のリガンド結合分子の特徴それ自体を限定することを意図するものではない。しかしながら、本発明の好ましいリガンド結合分子は、その標的増殖因子に単に結合するだけでなくそれを超えるものである。好ましいリガンド結合分子はまた、それが結合する増殖因子が、その増殖因子が結合する受容体型チロシンキナーゼの少なくとも 1 つ ( および好ましくはすべて ) のリン酸化を刺激することを阻害する。チロシンリン酸化の刺激は、 *i n v i t r o* の細胞ベースのアッセイおよび抗ホスホチロシン抗体を用いて、容易に測定される。受容体型チロシンキナーゼのリン酸化は、シグナル伝達カスケードの初期段階であるので、リガンド結合分子が、細胞遊走、細胞増殖、および他の応答をもたらす増殖因子媒介シグナル伝達を阻害することができるか否かの好都合な指標となる。いくつかの他の細胞ベースのアッセイおよび *i n v i v o* のアッセイを、増殖因子を中和する、本発明のリガンド結合分子の特性を確認するために用いることができる。

30

40

## 【 0 0 1 1 】

特定の増殖因子に「特異的」であるリガンド結合分子は、増殖因子の活性型 ( 例えば、体内を循環することが見出されている形態 ) を特異的に認識するリガンド結合分子である。好ましくは、リガンド結合分子は、増殖因子の他の形態にも同様に特異的に結合する。例として、 V E G F - C ( および V E G F - D ) は、 V E G F R - 2 および V E G F R - 3 に結合し、それを刺激する V E G F - C ( または V E G F - D ) の「完全にプロセシ

50

グされた」形態を、切断されて生じる、広範なアミノ末端およびカルボキシ末端のプレプロペプチドを有するプレプロ分子として翻訳される。VEGF-C（またはVEGF-D）に特異的なリガンド結合分子は、VEGF-C（またはVEGF-D）の完全にプロセシングされた形態に少なくとも結合し、好ましくはさらに、部分的にプロセシングされた形態およびプロセシングされていない形態にも結合する。

#### 【0012】

本明細書に記載する一態様では、リガンド結合分子は、配列番号2の位置47～115または配列番号2の位置25～115によって規定されるアミノ酸の配列に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するが、配列番号2の位置104～106に対応するポリペプチドの位置は、N-X-SにもN-X-T（Xは任意のアミノ酸を表す）にも一致しない第1のアミノ酸配列を含み、ヒトVEGF-A（VEGF）、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、およびPDGF-DなどのVEGFまたはPDGF増殖因子ファミリーから選択される少なくとも1つのリガンドポリペプチドに結合する精製または単離リガンド結合ポリペプチドである。配列番号2は、推定上のシグナルペプチドに対応する配列番号2の位置1～24と、推定上のシグナルペプチドを欠く、受容体の推定上の成熟形態に対応する配列番号2の位置25以降とを有する、ヒトVEGFR-3に対するアミノ酸配列を含有する。配列番号2の前方のセグメントは、ヒトVEGFR-3の第1の免疫グロブリン様ドメイン（「VEGFR-3のD1」）におよそ対応するか、またはそれを含む。具体的には、リガンド結合ポリペプチドを生じさせるように結合した、VEGFR-3受容体または他の受容体のIg様ドメインをさらに含むコンストラクトが企図され、リガンド結合ポリペプチドを作製するために用いられる受容体成分を変えることによって、異なるリガンドに結合するコンストラクトが構築される。一部の変更形態では、リガンド結合ポリペプチドは主としてVEGFR-3の細胞外ドメインに基づいており、他の実施形態では、リガンド結合ポリペプチドは、VEGFR-1および/またはVEGFR-2および/またはPDGFR-1および/またはPDGFR-2などの他の受容体タイプチロシンキナーゼのセグメントの融合に基づいている。VEGFR-3に主として基づいた実施形態では、少なくとも1つのリガンドは、VEGF-CまたはVEGF-Dのポリペプチドなど、VEGFR-3に対する天然リガンドである。

#### 【0013】

一部の実施形態では、リガンド結合ポリペプチドは、配列番号2の位置154～210または配列番号2の位置248～314によって規定されるアミノ酸の配列に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%同一である第2のアミノ酸配列を含み、第2のアミノ酸配列のN末端残基は、第1のアミノ酸配列のC末端残基に直接またはスパーサーを介して結合しており、またこのポリペプチドは、ヒトVEGF-A（VEGF）、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、およびPDGF-DなどのVEGFまたはPDGF増殖因子ファミリーから選択される少なくとも1つのリガンドポリペプチドに結合する。位置154～210に対応するポリペプチドの位置により規定されるアミノ酸の配列は、ヒトVEGFR-3のECDの第2の免疫グロブリン様ドメイン（「VEGFR-3のD2」）におよそ対応するかまたはそれを含む。位置248～314に対応するポリペプチドの位置により規定されるアミノ酸の配列は、ヒトVEGFR-3のECDの第3の免疫グロブリン様ドメイン（「VEGFR-3のD3」）におよそ対応するかまたはそれを含む。第2のアミノ酸配列がVEGFR-3のD2におよそ対応するかまたはそれを含むアミノ酸配列を含む場合、リガンド結合ポリペプチドは、配列番号2の位置248～314によって規定されるアミノ酸の配列に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なく

10

20

30

40

50

とも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%同一である第3のアミノ酸配列を含み、第3のアミノ酸配列のN末端残基は、第2のアミノ酸配列のC末端残基に直接またはスペーサーを介して結合しており、またこのポリペプチドは、ヒトVEGF-A(VEGF)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PLGF、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、およびPDGF-DなどのVEGFまたはPDGF増殖因子ファミリーから選択される少なくとも1つのリガンドポリペプチドに結合することが好ましい。換言すれば、リガンド結合ポリペプチドがVEGFR-3のD1およびD2におよそ対応するかまたはそれを含むアミノ酸配列を含む実施形態では、リガンド結合ポリペプチドはまた、VEGFR-3のD3におよそ対応するかまたはそれを含むアミノ酸配列を含むことが好ましい。

10

#### 【0014】

リガンド結合ポリペプチドがVEGFR-3の2つ以上の成分ドメインにおよそ対応するアミノ酸配列を含む実施形態では、これらの成分ドメインは互いに直接結合していても、または1つまたは複数のスペーサーを介して結合していてもよい。好ましくは、成分ドメインは1つまたは複数のスペーサーによって結合される。一実施形態では、スペーサーは、アミノ酸長が1~100、好ましくはアミノ酸長が1~50の間である、成分ドメイン間の1つまたは複数のペプチド配列を含む。一実施形態では、2つの成分ドメイン間のスペーサーは、天然VEGFR-3における成分ドメインに天然に結合されたペプチド配列から実質的になる。

20

#### 【0015】

リガンド結合ポリペプチドが、VEGFR-3(例えば、D1-D2またはD1-D2-D3)の連続した成分ドメインにおよそ対応するかまたはそれらを含むアミノ酸配列を含む実施形態では、これらの成分ドメインは、アミノ酸長が1~100、好ましくはアミノ酸長が1~50の間である、成分ドメイン間の1つまたは複数のペプチド配列を含む1つまたは複数のスペーサーを介して結合される。一実施形態では、2つの成分ドメイン間のスペーサーは、天然VEGFR-3におけるそれぞれの連続した成分ドメインを結合するものに対応するペプチド配列から実質的になる。一部の実施形態では、2つの連続した成分ドメイン間のスペーサーは、天然VEGFR-3における連続したドメインを結合するアミノ酸の配列に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

#### 【0016】

リガンド結合ポリペプチドがVEGFR-3のD1およびD2におよそ対応するかまたはそれらを含むアミノ酸配列を含む一実施形態では、成分ドメインD1およびD2は、配列番号2の位置116~153によって規定されるアミノ酸の配列に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するスペーサーアミノ酸配列を介して結合される。リガンド結合ポリペプチドがVEGFR-3のD2およびD3におよそ対応するかまたはそれらを含むアミノ酸配列を含む場合、成分ドメインD2およびD3は、配列番号2の位置211~247によって規定されるアミノ酸の配列に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するスペーサーアミノ酸配列を介して結合される。

40

#### 【0017】

一部の実施形態では、精製または単離リガンド結合ポリペプチドは、配列番号2の位置47~210、または配列番号2の位置25~210、または配列番号2の位置47~3

50

14、または配列番号2の位置25～314、または配列番号2の位置47～752もしくは47～775、または配列番号2の位置25～752もしくは25～775によって規定されるアミノ酸の配列に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むが、配列番号2の位置104～106に対応するポリペプチドの位置は、N-X-SにもN-X-Tにも一致せず、またこのポリペプチドは、ヒトVEGFR-A、VEGFR-C、VEGFR-C、VEGFR-D、およびPLGFから選択される、少なくとも1つのリガンドポリペプチドに結合する。一変更形態では、配列番号2の位置104に対応するアミノ酸は、欠失し、別のアミノ酸（グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、およびリジンなど）に置換される。位置47～210は、ヒトVEGFR-3ECDの第1の2つの免疫グロブリン様ドメインおよび第1の2つのIg様モチーフ間のVEGFR-3ECD配列を含む。位置47～314は、ヒトVEGFR-3ECDの第1の3つの免疫グロブリン様ドメインおよびこれらのIg様モチーフ間のVEGFR-3ECD配列を含む。

10

#### 【0018】

より一般的には、本発明のリガンド結合ポリペプチドは、配列番号2に示すVEGFR-3のアミノ酸配列のフラグメントに対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含み、ここで、このフラグメントのアミノ末端は、配列番号2の位置25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、および50から選択される任意のアミノ酸であり、かつこのフラグメントのカルボキシ末端は、配列番号2の位置110～775（例えば、位置110、111、112、113、114、115、116、...、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770、771、772、773、774、775）から選択される任意のアミノ酸であるが、配列番号2の位置104～106に対応するポリペプチドの位置は、N-X-SにもN-X-Tにも一致しない。本明細書の記載から容易に明らかになる理由で、許容される変更形態は、野生型VEGFR-3では見出されない、新規の糖鎖付加シークオンを導入する変更形態ではない。

20

30

#### 【0019】

本明細書に記載する別の態様では、リガンド結合分子は、配列番号2の位置47～115、配列番号2の47～210、配列番号2の47～314、配列番号2の47～752もしくは47～775、または配列番号2の25～752または25～775に対応するポリペプチドの位置によって規定されるアミノ酸の配列と同一であるアミノ酸配列を含むが、配列番号2の位置104～106に対応するポリペプチドの位置が、N-X-SにもN-X-Tにも一致しない精製または単離リガンド結合ポリペプチドである。一変更形態では、配列番号2の位置104に対応するアミノ酸は、欠失し、別のアミノ酸（グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、およびリジンなど）に置換される。

40

#### 【0020】

本明細書に記載する別の態様では、リガンド結合分子は、配列番号2の位置47～115によって規定されるアミノ酸の配列に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む精製または単離リガンド結合分子であり、ここで、配列番号2の位置104～106に対応するポリペプチドの位置は、推定上のVEGFR-3糖鎖付加シークオンであり、かつ前記推定上の糖鎖付加シークオンは、

50

リガンド結合ポリペプチドのアミノ酸配列から排除される。この文脈で用いられる「排除される」という用語は、N - X - T シークオンモチーフを破壊するための、（置換、欠失、または挿入による）少なくとも1つの位置の主要なアミノ酸配列の変更を意味する。

【0021】

本発明はまた、共有結合的または非共有結合的に互いに結合して二量体または多量体構造を形成する、本明細書に記載する2つ以上のリガンド結合分子を含む多量体リガンド結合コンストラクトを含む。一部の變更形態では、結合は、リガンド結合ポリペプチドのVEGFR - 3 様配列間で起こり；他の變更形態では、結合は、VEGFR - 3 様配列の一方または両方に結合した異種ポリペプチド間で起こる。

【0022】

本明細書に記載するリガンド結合分子またはリガンド結合ポリペプチドへの本明細書における言及は、上記に規定するその変異体への言及を含むが、そのようなリガンド結合ポリペプチドまたは分子は（単量体、二量体、またはより高度の多量体のいずれにもかかわらず）、VEGFR - 3 のIg 様モチーフ（例えば、配列番号2のおよそ47 ~ 115）に類似したまたは同一のIg 様モチーフを少なくとも含有し、配列番号2の位置104 ~ 106（天然VEGFR - 3 配列におけるN連結糖鎖付加シークオンを示す）に対応するポリペプチドの位置は、N - X - S にもN - X - T にも一致しない。

【0023】

別の態様では、本明細書に記載するのは、VEGFR - 3 N2 ポリペプチドの第1の免疫グロブリン様ドメインを含む単離または精製リガンド結合ポリペプチドであるリガンド結合分子である。本明細書で使用する場合、「VEGFR - 3 N2 ポリペプチド」という用語は、ヒトVEGFR - 3 のECDを規定するアミノ酸の配列に対して少なくとも95%の同一性を有するが、第2の推定上の糖鎖付加シークオン、NDTに対応するポリペプチドの配列の一部が、例えば、これらの位置の1つにおける置換のために、もはやN - X - S / T シークオンモチーフに適合しないように突然変異しているポリペプチドを指す。一部の実施形態では、精製ポリペプチドは、VEGFR - 3 N2 ポリペプチドの第1の2つの免疫グロブリン様ドメインを含み、また好ましくはそれらのドメイン間のVEGFR - 3 配列を含む。一部の実施形態では、精製ポリペプチドは、VEGFR - 3 N2 ポリペプチドの第1の3つの免疫グロブリン様ドメインを含み、また好ましくはそれらのドメイン間のVEGFR - 3 配列を含む。

【0024】

さらに別の態様では、本明細書に記載するのは、融合相手に融合したヒトVEGFR - 3 のECDフラグメントを含むポリペプチドであるリガンド結合分子であり、ここで、VEGFR - 3 のECDフラグメントのアミノ酸配列は、野生型VEGFR - 3 の第2の推定上のN連結糖鎖付加シークオンを排除するように、野生型VEGFR - 3 から改変されており、このポリペプチドは、ヒト血清に可溶であり、ヒトVEGF - CまたはヒトVEGF - Dに結合し；かつ融合相手は、溶解性またはECDフラグメントの血清半減期を（例えば、融合相手に融合していない同じフラグメントに比較して）改善する。一部の実施形態では、融合相手は、異種ポリペプチドである。

【0025】

一部の実施形態では、リガンド結合ポリペプチドまたはリガンド結合分子は、ヒトVEGF - CまたはヒトVEGF - Dに結合する。一部の実施形態では、リガンド結合ポリペプチドまたはリガンド結合分子は、VEGFR - 3 へのVEGF - Cまたは - VEGF - Dの結合を阻害するか、またはその表面上にVEGFR - 3 を発現する細胞において、VEGF - CまたはVEGF - D媒介のVEGFR - 3 刺激を阻害する。刺激の阻害は、例えば、受容体リン酸化の測定により、またはin vitroもしくはin vivoにおける細胞増殖の測定により、またはin vivoにおける脈管増殖または他の組織レベル変化の測定により実証することができる。

【0026】

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、

10

20

30

40

50



300 pM、200 pM、100 pM、50 pM、10 pM、またはそれ以下)の $K_d$ でヒトVEGF-Cに結合する。リガンド結合分子は、好ましくは、約5 nM以下(例えば、2 nM、1 nM、500 pM、400 pM、300 pM、200 pM、100 pM、50 pM、10 pM、またはそれ以下)の $K_d$ でヒトVEGF-Dに結合する。

【0027】

別の態様では、精製または単離リガンド結合分子は、配列番号3のアミノ酸22~290、配列番号3のアミノ酸23~290、配列番号3のアミノ酸23~537、または配列番号3のアミノ酸22~537を含む。さらに他の変更形態では、この分子は、前述の配列の何れかに対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含むが、VEGFR-3 N2シークオンに対応する(アライメントする)ポリペプチドの配列は、糖鎖付加配列ではない。

【0028】

本明細書に記載するように、リガンド結合分子は、その特異的な増殖因子結合特性を保持しながら、所望の特徴を付与するように化学的に修飾(例えば、糖鎖付加、ペグ化等)することができる。VEGFR-3のIg様ドメインI~IIIは、5つの推定上のN糖鎖付加部位を含む(それぞれ、VEGFR-3のN1、N2、N3、N4、およびN5シークオンと本明細書では呼ばれる)。N1は配列番号2のアミノ酸33~35に対応し; N2は配列番号2のアミノ酸104~106に対応し; N3は配列番号2のアミノ酸166~168に対応し; N4は配列番号2のアミノ酸251~253に対応し、N5は配列番号2のアミノ酸299~301に対応する。一部の実施形態では、本明細書に記載するリガンド結合分子は、分子のN2シークオンに改変を含む。例えば、一部の実施形態では、配列番号2の位置104に対応する、リガンド結合分子中のアミノ酸は、欠失し、別のアミノ酸に置換される。保存的置換が好ましい。一部の実施形態では、配列番号2の位置104に対応するアミノ酸は、欠失し、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、およびリジンからなる群から選択されるアミノ酸に置換される。配列番号2のN2シークオンが上記のように改変される実施形態では、配列番号2のN1、N3、N4、およびN5のシークオンは、好ましくは、アミノ酸配列に関して不変である。

【0029】

本明細書に記載するように、リガンド結合分子は、融合相手に直接またはリンカーを介して結合することができる。融合相手は、リガンド結合分子の機能性を増強する任意の異種成分であってよい。例示的なペプチド融合相手は、免疫グロブリン定常領域(Fc)フラグメントを含む。一部の実施形態では、免疫グロブリン定常フラグメントは、配列番号3のアミノ酸306~537に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性、あるいは100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0030】

本明細書に記載するように、リガンド結合分子は、例えば、融合相手(例えば、異種ペプチドなど)への結合を容易にするように、または所望の特徴(例えば、血清半減期の延長、水性媒体への溶解性の向上、特定の細胞集団、例えば腫瘍細胞または網膜細胞へのターゲティングを可能にすること)を付与するように化学的に修飾することができる。

【0031】

一部の実施形態では、本明細書に記載するリガンド結合分子は、任意選択で、分子に結合した少なくとも1つのPEG部分を含む。例えば、一部の実施形態では、約20~40 kDaのPEGが、リガンド結合分子のアミノ末端に結合している。

【0032】

一部の実施形態では、本明細書に記載するリガンド結合分子は、任意選択で、例えば、第Xa因子リンカー配列PIEGRGGGG(配列番号4)など、リガンド結合ポリペ

10

20

30

40

50

プチドへの異種ペプチド等の融合相手を連結するリンカーを含む。他の実施形態では、リガンド結合分子は、リガンド結合ポリペプチドのC末端アミノ酸が異種ペプチド融合相手のN末端アミノ酸にペプチド結合によって直接結合しているポリペプチドを含む。一部の実施形態では、リガンド結合ポリペプチドおよび異種ペプチドは、単一ポリペプチド鎖を形成するように、アミド結合によって（直接またはリンカーポリペプチドを介して）結合している。

#### 【0033】

一部の変形形態では、リガンド結合分子は、この分子を発現する細胞からの分子の分泌を指示するシグナルペプチドを含む。

#### 【0034】

本発明の核酸（ポリヌクレオチド）は、ポリペプチドリガンド結合分子をコードする核酸を含み、これは、遺伝子治療およびポリペプチド結合リガンド分子の組換え *in vitro* 発現のような用途に用いることができる。一部の実施形態では、核酸は精製または単離される。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列をさらに含み、このプロモーター配列は、宿主細胞においてポリペプチドをコードする配列の転写を促進する。ポリヌクレオチドはまた、ポリアデニル化シグナル配列を含むことができる。一部の変形形態では、核酸は、野生型ヒトVEGFR-3コード化核酸に類似したコード化ヌクレオチド配列を有する。例えば、核酸は、配列番号1に示すヒトVEGFR-3配列またはそのフラグメントに対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するコード化ヌクレオチド配列を含む。例として、N2シークオンに改変がある、配列番号2のアミノ酸47~314をコードするヌクレオチド配列の文脈では、例示的な核酸は、コドン47~314に対応する、配列番号1の位置157~961に示すヒトVEGFR-3配列に対して、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも92%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するコード化ヌクレオチド配列を含む。

#### 【0035】

ポリヌクレオチドを含むベクターもまた、本発明の態様である。そのようなベクターは、ポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結された発現制御配列を含むことができる。一部の変形形態では、ベクターは、真核生物の宿主細胞など選ばれた宿主細胞において *in vitro* 組換え発現が最適化されるように選択される。一部の変形形態では、ベクターは、*in vivo* 送達用に選択される。例えば、ベクターは、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、リボソームベクター、およびそれらの組合せからなる群から選択することができる。一部の実施形態では、ベクターは、複製欠損アデノウイルスを含み、前記アデノウイルスは、プロモーターに作動可能に連結され、アデノウイルスのポリヌクレオチド配列によって挟まれたポリヌクレオチドを含む。

#### 【0036】

ポリヌクレオチド、ベクター、および他の核酸を含む宿主細胞、ならびにそれを用いてリガンド結合分子を発現および単離するための方法も本発明の態様である。本明細書に記載するリガンド結合ポリペプチドまたはリガンド結合分子をコードするポリヌクレオチドを含む、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞および他の哺乳動物細胞株を含む真核生物宿主細胞が具体的に企図される。一部の変形形態では、細胞株は、細胞において産生されるポリペプチドの糖鎖付加シークオンにヒトまたはヒト様糖鎖付加を導入するように選択または操作される。

#### 【0037】

本明細書に記載するリガンド結合ポリペプチドまたは分子を作製する方法も企図される

10

20

30

40

50

。(そのような方法は、本発明のポリヌクレオチドまたは細胞の使用として記載すること  
もできよう。)一態様では、この方法は、ポリヌクレオチドによりコードされたりガンド  
結合ポリペプチドまたはリガンド結合分子が発現される条件下で、本明細書に記載するポ  
リヌクレオチドまたはベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞を増殖させ  
ることを含む。一部の実施形態では、この方法は、細胞からまたは細胞の増殖培地からリ  
ガンド結合ポリペプチドまたはリガンド結合分子を精製または単離することをさらに含む  
。一部の実施形態では、この方法は、発現および精製/単離したポリペプチドに、1つま  
たは複数のポリエチレングリコール(PEG)または他の部分を結合させることをさらに  
含む。

#### 【0038】

本発明はまた、薬学的に許容される希釈剤、補助剤、または担体培地と一緒に、ポリペ  
プチド、リガンド結合分子、またはそれをコードする核酸を含む組成物を含む。一部の実  
施形態では、組成物は、眼への局所投与用に製剤化される(例えば、軟膏または点眼剤な  
どの局所製剤、または硝子体内注射に適した製剤)。他の実施形態では、組成物は、例え  
ば、静脈内注射もしくは鼻された組織への直接注射による、または腫瘍切除中の器具を介  
する塗布による、腫瘍への局所投与用にまたは腫瘍が外科的に摘出された器官または組織  
への局所投与用に製剤化される。

#### 【0039】

本発明はまた、治療または予防の文脈で脈管(血管および/またはリンパ管)増殖を阻  
害するための、本明細書に記載する物質(ポリペプチド、分子およびコンストラクト、ポ  
リヌクレオチドおよびベクター、形質転換細胞、組成物)を使用する方法を含む。あるい  
は、本明細書に記載する使用方法は、指定の適応症に対する種々の物質の使用として特徴  
づけることができる。治療のための例示的な被験体としては、ヒトおよび他の霊長類、家  
畜(例えば、ウシ、ウマ、ブタ)、動物園動物(例えば、ネコ、イヌ、厚皮動物、シカ)  
、およびペット(例えば、イヌ、ネコ)、およびげっ歯類が挙げられる。

#### 【0040】

一部の変形態では、本発明は、被験体の血管新生を阻害する方法であって、前述の物  
質または組成物の何れかを、被験体の血管新生を阻害するために有効な量で被験体に投与  
することを含む方法を含む。例示的な病原性の血管新生状態には、眼および腫瘍の血管新  
生状態が含まれる。

#### 【0041】

一部の変形態では、本発明は、被験体の網膜血管新生を阻害する方法であって、本明  
細書に記載する物質または組成物を、被験体の網膜血管新生を阻害するために有効な量で  
被験体に投与することを含む方法を含む。関連する変形態では、本発明は、網膜血管新  
生に関連した眼障害を有する被験体を治療する方法であって、本明細書に記載し、上記に  
概説した物質または組成物を、被験体の網膜血管新生を阻害するために有効な量で被験体  
に投与することを含む方法を含む。例えば、本明細書に記載する組成物は、点眼剤または  
他の局所投与によって、結膜下投与(例えば、注射)によって、硝子体内注射によって、  
または硝子体内インプラントによってなど、被験体の眼に局所的に投与される。

#### 【0042】

組成物は、好ましくは、被験体の眼のVEGF-Cおよび/またはVEGF-Dが、眼  
の細胞または眼の脈管に発現したVEGFR-2および/またはVEGFR-3に結合す  
ることまたはそれを刺激することを阻害するために有効な量ならびに反復投与頻度および  
期間で投与される。そのような有益な効果は、病的な眼症状(黄斑変性症、糖尿病性網膜  
症、および黄斑性毛細血管拡張症など)における悪化/進行の遅延もしくは停止、または  
臨床症状の改善の点から評価することができる。この有益な効果はまた、標的組織の中お  
よび周囲の脈管増殖のモニタリングの点から観察可能になることもある。

#### 【0043】

本明細書に記載する方法および使用は、本明細書に詳細に記載するように、追加の治療  
剤または治療法(例えば、放射線形態)と併用して実施することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

本明細書に記載する本発明の方法（または使用）は、別の治療（癌の治療または眼底障害の治療に対する標準治療など）と併用して、１つまたは複数のリガンド結合分子、または少なくとも１つのリガンド結合分子を用いて実施することができる。リガンド結合分子が眼底障害の治療のためである実施形態では、企図される追加の治療としては、限局性レーザー治療（または光凝固術）、散乱レーザー治療（または、汎網膜光凝固術）、および硝子体切除術が挙げられる。一部の実施形態では、抗生物質もまた治療を受ける被験体に投与される。

## 【 0 0 4 5 】

本明細書に記載するリガンド結合分子が癌治療における使用のためである実施形態では、企図される標準治療の治療剤としては、増殖因子および／またはその受容体を標的とする、アンチセンスRNA、RNA干渉、二重特異性抗体、他の抗体型、および小分子、例えば化学療法剤が挙げられる。サイトカイン、放射線療法剤、または放射線療法もまた、本明細書に記載するリガンド結合分子と併用して用いることができる。化学療法剤または放射線療法剤は、代謝拮抗剤；DNA傷害剤；サイトカインまたは増殖因子；共有結合性DNA結合薬；トポイソメラーゼ阻害剤；有糸分裂阻害剤；抗腫瘍抗生物質；分化剤；アルキル化剤；メチル化剤；ホルモンまたはホルモン拮抗剤；ナイトロジェンマスタード；放射線増感剤；および光増感剤を含む薬剤クラスのメンバーであり得る。これらの薬剤の具体例が本出願に別記されている。併用療法は相乗的であることが好ましいが、そうである必要はなく、相加的療法も本発明の態様と見なされる。

## 【 0 0 4 6 】

方法におけるその使用に加えて、リガンド結合分子は、キット中にまたは単位用量として、他の治療剤と組み合わせることもパッケージすることもできる。新生物疾患は、リガンド結合分子で治療することができる唯一の疾患ではない。リガンド結合分子は、異常な血管新生またはリンパ脈管新生に関連した任意の疾患に対する治療剤として用いることができる。

## 【 0 0 4 7 】

本発明はまた、以下のさらなる実施形態で記載することができる。

## 【 0 0 4 8 】

配列番号２の位置４７～１１５により規定されるアミノ酸の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が、配列番号２の位置１０４～１０６に対応するポリペプチドの位置は、N-X-SにもN-X-Tにも一致しない精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、ヒトVEGF-C、VEGF-D、およびPLGFから選択される、少なくとも１つのリガンドポリペプチドに結合する精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

## 【 0 0 4 9 】

段落【 0 0 4 8 】に記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、配列番号２の位置４７～２１０により規定されるアミノ酸の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が、配列番号２の位置１０４～１０６に対応するポリペプチドの位置は、N-X-SにもN-X-Tにも一致しない、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

## 【 0 0 5 0 】

段落【 0 0 4 8 】に記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、配列番号２の位置４７～３１４により規定されるアミノ酸の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が、配列番号２の位置１０４～１０６に対応するポリペプチドの位置は、N-X-SにもN-X-Tにも一致しない、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

## 【 0 0 5 1 】

段落【 0 0 4 8 】に記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、配列番号２の位置４７～７５２により規定されるアミノ酸の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が、配列番号2の位置104～106に対応するポリペプチドの位置は、N-X-SにもN-X-Tにも一致しない、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0052】

段落【0048】～【0051】の何れか1つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、配列番号2の位置33～35、配列番号2の位置166～168、配列番号2の位置251～253、および配列番号2の位置299～301に対応する4つのN糖鎖付加シークオンを保持する、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0053】

段落【0052】に記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、前記4つのN糖鎖付加シークオン部位でグリコシル化されている、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0054】

段落【0048】～【0053】の何れか1つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、可溶性ポリペプチドである、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0055】

段落【0048】～【0054】の何れか1つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、配列番号2の位置47～115、配列番号2の位置47～210、配列番号2の位置47～314、または配列番号2の位置47～752によって規定されるアミノ酸の配列に同一であるアミノ酸配列を含むが、配列番号2の位置104～106に対応するポリペプチドの位置はN-X-SにもN-X-Tにも一致しない、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0056】

段落【0048】～【0055】の何れか1つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、ヒトVEGF-CまたはヒトVEGF-Dに結合する、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0057】

段落【0056】に記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、VEGFR-3へのVEGF-CまたはVEGF-Dの結合を阻害するか、またはその表面上にVEGFR-3を発現する細胞において、VEGF-CまたはVEGF-D媒介のVEGFR-3刺激を阻害する、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0058】

段落【0048】～【0057】の何れか1つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、Kdまたは1nM以下でヒトVEGF-Cに結合する、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0059】

段落【0048】～【0057】の何れか1つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、5nM以下のKdでヒトVEGF-Dに結合する、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0060】

段落【0048】～【0059】の何れか1つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、配列番号2の位置104に対応する、ポリペプチド中のアミノ酸が欠失しているかまたは他のアミノ酸に置換されている、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

【0061】

段落【0055】に記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドにおいて、配列番号2の位置104のアミノ酸が欠失しているかまたはグルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、およびリジンからなる群から選択される別のアミノ酸に置換されている、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

段落【 0 0 4 8 】～【 0 0 5 6 】の何れか 1 つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、配列番号 3 のアミノ酸 2 3 ～ 2 9 0 を含む、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

## 【 0 0 6 3 】

段落【 0 0 4 8 】～【 0 0 6 2 】の何れか 1 つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、シグナルペプチドをさらに含む、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

## 【 0 0 6 4 】

段落【 0 0 4 8 】～【 0 0 6 3 】の何れか 1 つに記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、ポリペプチドに結合した少なくとも 1 つのポリエチレングリコール部分をさらに含む、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

10

## 【 0 0 6 5 】

段落【 0 0 6 4 】に記載の精製または単離リガンド結合ポリペプチドであって、ポリペプチドのアミノ末端に結合した約 2 0 ～ 4 0 k D a のポリエチレングリコールを含む、精製または単離リガンド結合ポリペプチド。

## 【 0 0 6 6 】

異種ペプチドに結合した、段落【 0 0 4 8 】～【 0 0 6 5 】の何れか 1 つに記載のリガンド結合ポリペプチドを含むリガンド結合分子。

## 【 0 0 6 7 】

20

段落【 0 0 6 6 】に記載のリガンド結合分子であって、異種ペプチドが免疫グロブリン定常ドメインフラグメントを含む、リガンド結合分子。

## 【 0 0 6 8 】

段落【 0 0 6 6 】に記載のリガンド結合分子において、免疫グロブリン定常ドメインフラグメントが I g G 定常ドメインフラグメントである、リガンド結合分子。

## 【 0 0 6 9 】

段落【 0 0 6 7 】に記載のリガンド結合分子であって、免疫グロブリン定常フラグメントが配列番号 3 のアミノ酸 3 0 6 ～ 5 3 7 を含む、リガンド結合分子。

## 【 0 0 7 0 】

段落 1 9 に記載のリガンド結合分子であって、リガンド結合分子が配列番号 3 のアミノ酸 2 2 ～ 5 3 7 を含む、リガンド結合分子。

30

## 【 0 0 7 1 】

段落【 0 0 6 6 】～【 0 0 7 0 】の何れか 1 つに記載のリガンド結合分子であって、任意選択で、リガンド結合ポリペプチドに異種ペプチドを結合するリンカーを含む、リガンド結合分子。

## 【 0 0 7 2 】

段落【 0 0 6 6 】～【 0 0 7 0 】の何れか 1 つに記載のリガンド結合分子であって、リガンド結合ポリペプチドの C 末端アミノ酸が異種ペプチドの N 末端にペプチド結合によって直接結合しているポリペプチドを含む、リガンド結合分子。

## 【 0 0 7 3 】

40

段落【 0 0 6 6 】～【 0 0 7 2 】の何れか 1 つに記載のリガンド結合分子であって、分子を発現する細胞からの分子の分泌を指示するシグナルペプチドをさらに含む、リガンド結合分子。

## 【 0 0 7 4 】

段落【 0 0 6 6 】に記載のリガンド結合分子であって、分子が配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含む、リガンド結合分子。

## 【 0 0 7 5 】

段落【 0 0 6 6 】～【 0 0 7 0 】の何れか 1 つに記載のリガンド結合分子であって、リガンド結合ポリペプチドと異種ペプチドとがアミド結合によって連結して単一ポリペプチド鎖を形成している、リガンド結合分子。

50

## 【 0 0 7 6 】

段落 [ 0 0 4 8 ] ~ [ 0 0 6 5 ] の何れか 1 つに記載のリガンド結合ポリペプチドまたは段落 1 9 ~ 2 8 の何れか 1 つに記載のリガンド結合分子であって、検出可能標識をさらに含む、リガンド結合分子。

## 【 0 0 7 7 】

段落 1 ~ 1 8 の何れか 1 つに記載のリガンド結合ポリペプチドまたは段落 [ 0 0 6 6 ] ~ [ 0 0 7 5 ] の何れか 1 つに記載のリガンド結合分子と化学療法剤とを含むコンジュゲート。

## 【 0 0 7 8 】

段落 1 ~ 1 8 の何れか 1 つに記載のリガンド結合ポリペプチドまたは段落 [ 0 0 6 6 ] ~ [ 0 0 7 5 ] の何れか 1 つに記載のリガンド結合分子をコードするコード化ヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド。

10

## 【 0 0 7 9 】

段落 [ 0 0 7 8 ] に記載のポリヌクレオチドであって、宿主細胞におけるコード化ヌクレオチド配列の転写を促進するように、コード化ヌクレオチド配列に作動可能に結合したプロモーター配列をさらに含む、ポリヌクレオチド。

## 【 0 0 8 0 】

段落 [ 0 0 7 8 ] または段落 [ 0 0 7 9 ] のポリヌクレオチドを含むベクター。

## 【 0 0 8 1 】

段落 [ 0 0 8 0 ] に記載のベクターであって、コード化ヌクレオチド配列に作動可能に結合した発現制御配列をさらに含む、ベクター。

20

## 【 0 0 8 2 】

段落 [ 0 0 8 0 ] に記載のベクターであって、前記ベクターが、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、リボソームベクター、およびそれらの組合せからなる群から選択される、ベクター。

## 【 0 0 8 3 】

段落 [ 0 0 8 0 ] に記載のベクターであって、前記ベクターが、複製欠損アデノウイルスを含み、前記アデノウイルスが、プロモーターに作動可能に連結され、アデノウイルスのポリヌクレオチド配列によって挟まれたポリヌクレオチドを含む、ベクター。

## 【 0 0 8 4 】

30

段落 [ 0 0 7 8 ] もしくは [ 0 0 7 9 ] に記載のポリヌクレオチドまたは段落 [ 0 0 8 0 ] ~ [ 0 0 8 3 ] に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトされた単離細胞または細胞株。

## 【 0 0 8 5 】

段落 [ 0 0 8 4 ] に記載の単離細胞または細胞株であって、真核細胞である、単離細胞または細胞株。

## 【 0 0 8 6 】

段落 [ 0 0 8 4 ] に記載の単離細胞または細胞株であって、ヒト細胞である、単離細胞または細胞株。

## 【 0 0 8 7 】

40

段落 [ 0 0 8 4 ] に記載の単離細胞または細胞株であって、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、単離細胞または細胞株。

## 【 0 0 8 8 】

リガンド結合ポリペプチドを作製する方法であって、ポリヌクレオチドによってコードされたリガンド結合ポリペプチドまたはリガンド結合分子が発現される条件下で、段落 [ 0 0 8 4 ] ~ [ 0 0 8 7 ] の何れか 1 つに記載の細胞を増殖させることを含む方法。

## 【 0 0 8 9 】

段落 [ 0 0 8 8 ] に記載の方法であって、細胞または細胞の増殖培地からリガンド結合ポリペプチドまたはリガンド結合分子を精製または単離することをさらに含む、方法。

## 【 0 0 9 0 】

50

段落[0048]～[0076]の何れか1つに記載の精製リガンド結合ポリペプチドまたはリガンド結合分子と、薬学的に許容される希釈剤、補助剤、賦形剤、または担体とを含む組成物。

【0091】

段落[0078]～[0083]の何れか1つに記載のポリペプチドまたはペクターと、薬学的に許容される希釈剤、補助剤、賦形剤、または担体とを含む組成物。

【0092】

段落[0090]または段落[0091]に記載の組成物であって、局所投与用に製剤化されている、組成物。

【0093】

段落[0092]に記載の組成物であって、固体、ペースト、軟膏、ゲル、液体、エアロゾル、ミスト、ポリマー、フィルム、エマルジョン、または懸濁液の形態にある、組成物。

【0094】

段落[0090]または段落[0091]に記載の組成物であって、硝子体内投与用に製剤化されている、組成物。

【0095】

被験体の血管新生を阻害する方法であって、段落[0090]～[0094]の何れか1つに記載の組成物を、被験体の血管新生を阻害するために有効な量で被験体に投与することを含む方法。

【0096】

被験体の網膜血管新生を阻害する方法であって、段落[0090]～[0094]の何れか1つに記載の組成物を、被験体の網膜血管新生を阻害するために有効な量で被験体に投与することを含む方法。

【0097】

網膜血管新生に関連した眼障害を有する被験体を治療する方法であって、段落[0090]～[0095]の何れか1つに記載の組成物を、被験体の網膜血管新生を阻害するために有効な量で被験体に投与することを含む方法。

【0098】

それを必要とする被験体における、網膜血管新生または腫瘍血管新生などの血管新生を阻害するための、段落[0090]～[0094]の何れか1つに記載の組成物の使用。

【0099】

段落[0096]～[0098]の何れか1つに記載の方法または使用であって、組成物が被験体の眼に局所投与される、方法または使用。

【0100】

段落[0099]に記載の方法または使用であって、組成物が硝子体内注射によって投与される、方法または使用。

【0101】

段落[0099]に記載の方法または使用であって、組成物が局所投与によって投与される、方法または使用。

【0102】

段落[0096]～[0101]の何れか1つに記載の方法または使用であって、被験体の眼のVEGF-Cおよび/またはVEGF-Dが、眼の細胞または眼の脈管に発現したVEGFR-2および/もしくはVEGFR-3に結合することまたはそれを刺激することを阻害するために有効な量で、組成物が投与される、方法または使用。

【0103】

段落[0097]または[0098]の方法または使用であって、眼障害が、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、および黄斑性毛細血管拡張症からなる群から選択される、方法または使用。

【0104】

10

20

30

40

50



段落[0096]～[00103]の何れか1つに記載の方法または使用であって、被験体に抗生物質を投与することをさらに含む、方法または使用。

【0105】

段落[00104]に記載の方法であって、抗生物質が、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、テイコブラニン、バンコマイシン、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン、アモキシシリン、アンピシリン、アズロシリン、カルベニシリン、クロザシリン、ジクロキサシリン、フルコザシリン、メズロシリン、ナフシリン、ペニシリン、ピペラシリン、チカルシリン、バシトラシン、コリスチン、ポリミキシンB、シプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トロバフロキサシン、マフェニド、スルファセタミド、スルファメチゾール、スルファサラジン、スルフイソキサゾール、トリメトプリム、コトリモキサゾール、デメクロサイクリン、ソキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、およびテトラサイクリンからなる群から選択される、方法。

10

【0106】

段落[0095]または[0098]に記載の方法または使用であって、被験体が腫瘍と診断されており、かつ組成物が腫瘍の血管新生を阻害するために有効な量で投与される、方法または使用。

20

【0107】

段落[00106]に記載の方法または使用であって、腫瘍または腫瘍が外科的に摘出された器官もしくは組織に、組成物が局所投与される、方法または使用。

【0108】

段落[00106]に記載の方法または使用であって、被験体の腫瘍のVEGF-Cおよび/またはVEGF-Dが、腫瘍細胞に発現されたVEGFR-2および/またはVEGFR-3に結合することまたはそれを刺激することを阻害するために有効な量で、組成物が投与される、方法または使用。

【0109】

本発明のこの概要は、限定することまたは包括することを意図するものではなく、さらなる実施形態が、実施例を含む図面および詳細な説明に記載される。そのような実施形態はすべて本発明の態様である。さらに、簡潔さのために、複数の実施形態に適用可能な種々の詳細が、すべての実施形態について繰り返されているわけではない。本明細書に記載する実施形態の組合せおよび再編成を反映する変更形態は、本発明の態様として意図されるものである。前述のものに加えて、本発明は、上記に具体的に述べた変更形態よりも任意の点で範囲が狭くなっている、本発明のすべての実施形態を、さらなる態様として含む。例えば、属または範囲として記載される態様について、すべての亜属、部分範囲、または種が、本発明の実施形態として具体的に企図される。

30

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】図1Aは、一過性のCHO発現により産生されるVGX-300およびVGX-301-N2のPKプロファイルを示す図である。図1Bは、一過性のHEK発現により産生されるVGX-300およびVGX-301-N2のPKプロファイルを示す図である。

40

【図2】図2は、VGX-300およびVGX-301-N2は両方とも、VEGF-CおよびVEGF-Dの両方に特異的に結合することを実証する図である。

【図3】図3は、VGX-300が、a) VEGFR-2およびb) VEGFR-3のVEGF-CおよびVEGF-D結合および架橋を遮断することを示す図である。

【図4】図4は、VGX-300およびVGX-300-N2が、細胞ベースのBa/F3アッセイにおいて、VEGFR-3のa) VEGF-Cおよびb) VEGF-D結合お

50

よび架橋を遮断することを示す図である。データポイントは、 $n = 2$ の平均  $\pm$  SDを表す。

【図5】図5は、硝子体内投与後のウサギにおける薬物動態および眼の生体内分布を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0111】

本発明は、ECDのNグリカン領域に1つまたは複数の改変を有するヒトVEGFR-3のECDのフラグメントが、*in vitro*において、ヒトVEGF-CおよびヒトVEGF-Dに結合し中和することができ、また加齢黄斑変性症の動物モデルにおいて、脈管発生を阻害することができることを実証する研究に部分的に基づいている。

10

【0112】

増殖因子受容体型チロシンキナーゼは、一般に、3つの主要なドメイン、すなわち、細胞外ドメイン(ECD)、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む。ECDはリガンドに結合し、膜貫通ドメインは細胞膜に受容体を繫留し、細胞内ドメインは1つまたは複数のチロシンキナーゼ酵素ドメインを有し、下流のシグナル伝達分子と相互作用する。血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)は、そのECDを介してそのリガンドに結合するが、ECDは複数の免疫グロブリン様ドメイン(Ig様ドメイン)で構成される。Ig様ドメインは、本明細書では、「D#」という名称を用いて特定される。例えば、「D1」は、特定の受容体のECDの第1のIg様ドメインを指す。「D1~3」は、特定のリガンド結合分子の第1の3つのIg様ドメインを少なくとも含有し、かつドメイン1および2ならびに2および3の間の介在配列を含有するコンストラクトを指す。

20

【0113】

リガンド(増殖因子)結合にVEGFRの完全なECDは必要ではない。VEGFR-3のECDは、6つのインタクトなIg様ドメインおよび1つの切断されたIg様ドメインを有する。- VEGFR-3のD5は、ジスルフィド連結サブユニットに翻訳後切断され、VEGFR-3を離れる。Veikkola, T., et al., Cancer Res. 60: 203-212 (2000)。一部の実施形態では、このファミリーについて、第1の3つのIg様ドメインを少なくとも含む受容体フラグメントがリガンドに結合するために十分である。VEGF-CおよびVEGF-Dに結合し、それによってVEGF-CまたはVEGF-Dの活性またはVEGFR-3を介するシグナル伝達を阻害することができる可溶性受容体も、国際公開第2000/023565号パンフレット、国際公開第2000/021560号パンフレット、国際公開第2002/060950号パンフレット、および国際公開第2005/087808号パンフレットに開示されており、これらの開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。N2シークオンの変化で改変された、また任意選択で本明細書に記載の他の改変を有するこれらの可溶性受容体は、本発明の態様として企図される。

30

【0114】

表1に、ヒトVEGFR-3について、Ig様ドメインのおよその境界を規定する。選ばれた境界を用いてリガンド結合分子を形成させることができ、そのため、選ばれた境界は得られるコンストラクトの結合特性に影響を及ぼし得るので、これらの境界は重要である。

40

【0115】

表 1: ヒト VEGFR-3 についての免疫グロブリン様ドメイン

	VEGFR-3 配列番号 1 の位置	VEGFR-3 配列番号 2 の位置
D1	158~364	47~115
D2	479~649	154~210
D3	761~961	248~314
D4	1070~1228	351~403
D5	1340~1633	441~538
D6	1739~1990	574~657
D7	2102~2275	695~752

10

## 【 0 1 1 6 】

完全な E C D は、配列番号 2 のおよそ位置 7 7 5 にまで及ぶ。

## 【 0 1 1 7 】

ヒト V E G F - C または V E G F - D に対するリガンド結合分子として使用するための可溶性受容体コンストラクトは、好ましくは、表 1 に記載する V E G F R - 3 の少なくとも 1 つから 7 つまでの I g 様ドメインを含む。リガンド結合分子は、任意選択で、最も N 末端に位置した I g 様ドメインの前の配列を含み、任意選択で、最も C 末端にある I g 様ドメインの後の配列を含み、任意選択で、I g 様ドメイン間の配列も含むことになる。例えば、1 つまたは複数のアミノ酸の置換、付加、または欠失を有する変更形態もまた企図される。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、ヒト V E G F R - 3 の第 1 の 3 つの I g 様ドメインを少なくとも含む、ヒト V E G F R - 3 のフラグメントを含む。

20

## 【 0 1 1 8 】

一部の実施形態では、リガンド結合分子は、ヒト V E G F R - 3 E C D の一部を含むポリペプチドであり、この一部は、ヒト V E G F - C およびヒト V E G F - D の一方または両方に結合し、V E G F R - 3 E C D の第 1、第 2、および第 3 の I g 様ドメインを少なくとも含み、V E G F R - 3 の E C D フラグメントのアミノ酸配列は、野生型 V E G F R - 3 の第 2 の推定上の N 連結糖鎖付加シークオンを排除するように野生型 V E G F R - 3 から改変されており、またこのポリペプチドは、V E G F R - 3 I g 様ドメイン 4 ~ 7、ならびに好ましくはすべての膜貫通ドメインおよび好ましくはすべての細胞内ドメインを欠失している。

30

## 【 0 1 1 9 】

一部の実施形態では、リガンド結合分子は、ヒト V E G F R - 3 ポリペプチド（配列番号 2）に対してアミノ酸配列が類似もしくは同一のポリペプチドまたはそのフラグメントを含むが、配列番号 2 に示すヒト V E G F R - 3 の位置 1 0 4 ~ 1 0 6 に対応するリガンド結合分子の位置は N - X - S にも N - X - T にも一致せず、またこのリガンド結合分子は、ヒト V E G F - C およびヒト V E G F - D からなる群から選択される 1 つまたは複数の増殖因子に結合する。フラグメントは、リガンドに結合するために十分な V E G F R - 3 配列を最小限含み、また完全な受容体を含むこともある。E C D フラグメントが好ましい。好ましいポリペプチドは、そのリガンド結合フラグメントに対して少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する。より類似した、例えば、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、または 1 0 0 % のフラグメントは、高度に好ましい。3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、および 7 5 % のフラグメントも企図される。あるいは、類似のポリペプチドに属する種類は、V E G F R - 3 受容体をコードする c D N A 配列に対応するヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズするコード化ポリヌクレオチドの能力により規定することができる。

40

## 【 0 1 2 0 】

50

「同一性」という用語は、当技術分野で公知のように、配列比較によって判定されるような、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係を指す。当技術分野では、「同一性」はまた、任意選択で、2つ以上のヌクレオチド配列または2つ以上のアミノ酸配列の文字列間のマッチによって判定される、核酸分子配列またはポリペプチド配列の配列関連性を意味する。「同一性」は、特にコンピュータプログラムの数学モデル（すなわち、「アルゴリズム」）によって処理される、ギャップアライメント（もしあれば）と共に2つ以上の配列のうちの小さい配列間の同一マッチのパーセントを評価するものである。本発明のパーセント同一性を判定するための適切なアルゴリズムとしては、最も一般的で容認されているデフォルトパラメータを用いるBLASTPおよびBLASTNが挙げられる。

10

#### 【0121】

リガンド結合分子はまた、VEGFR-3のリガンド結合フラグメントをコードする、配列番号1のフラグメントに少なくとも80%同一である核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を有するが、VEGFR-3のコード化リガンド結合フラグメントの位置104～106に対応するリガンド結合分子の位置が、N-X-SにもN-X-Tにも一致しないものとして記載されることもある。より類似した、例えば、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%である核酸フラグメントが高度に好ましい。35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、および75%であるフラグメントも企図される。例えば、好ましいリガンド結合分子は、ヒトVEGFR-Cおよび/またはヒトVEGFR-Dに結合するアミノ酸配列であって、本明細書で論じられる中等度または高度ストリンジェントな条件下で配列番号1の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。

20

#### 【0122】

一部の実施形態では、リガンド結合分子は、配列番号2の位置1～226または25～226、配列番号2の位置1～229または25～229、および配列番号2の位置1～329または25～229からなる群から選択される、ヒトVEGFR-3（配列番号2）のフラグメントを含むが、VEGFR-3のコード化リガンド結合フラグメントの位置104～106が、N-X-SにもN-X-Tにも一致しないポリペプチドを含む。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、配列番号2の位置47～224、配列番号2の位置47～225、配列番号2の位置47～226、配列番号2の位置47～227、配列番号2の位置47～228、配列番号2の位置47～229、配列番号2の位置47～230、配列番号2の位置47～231、配列番号2の位置47～232、配列番号2の位置47～236、配列番号2の位置47～240、および配列番号2の位置47～245からなる群から選択される、ヒトVEGFR-3（配列番号2）のフラグメントを含むが、VEGFR-3のコード化リガンド結合フラグメントの位置104～106が、N-X-SにもN-X-Tにも一致しないポリペプチドである。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、配列番号2の位置47～314、配列番号2の位置47～210、および配列番号2の位置47～247からなる群から選択される、ヒトVEGFR-3（配列番号2）のフラグメントを含むが、VEGFR-3のコード化リガンド結合フラグメントの位置104～106が、N-X-SにもN-X-Tにも一致しないポリペプチドである。

30

40

#### 【0123】

リガンド結合分子はまた、配列番号3に示すアミノ酸配列に類似または同一のアミノ酸配列を有するものとして記載することができる。好ましいポリペプチドは、配列番号3に示すアミノ酸配列に対して少なくとも80%同一であるが、配列番号3に示すポリペプチドの位置80～82がN-X-SにもN-X-Tにも一致しないアミノ酸配列を有し、このリガンド結合分子は、ヒトVEGFR-CおよびヒトVEGFR-Dからなる群から選択される1つまたは複数の増殖因子に結合する。より類似した、例えば、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%のポリペプチドが、高度に好ましい。35%、40%、45%、50%

50

、55%、60%、65%、70%、および75%であるフラグメントも企図される。あるいは、類似のポリペプチドに属する種類は、VEGFR-3受容体をコードするcDNA配列に対応するヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズするコード化ポリヌクレオチドの能力により規定することができる。

#### 【0124】

一部の実施形態では、リガンド結合分子は、配列番号3のアミノ酸22~290を含むアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、配列番号3のアミノ酸23~290を含むアミノ酸配列を含む。一部の態様では、リガンド結合分子は、配列番号3のアミノ酸22~537、または配列番号3のアミノ酸23~537、または配列番号3のアミノ酸1~537を含む。

10

#### 【0125】

本明細書で使用する「成分ドメイン」という用語は、受容体タンパク質の細胞外部分内のタンパク質ドメインに由来するか、またはそれに基づくリガンド結合分子内のドメインを指す。例えば、VEGFR-3(D1~D7)および他のチロシンキナーゼ受容体ファミリーメンバー(例えば、VEGFR-1およびVEGFR-2など)の各Igドメインは、成分ドメインを構成する。本明細書における成分ドメインへの言及には、完全な天然野生型ドメインと、インタクトドメインの機能特性を実質的に保持する、その挿入、欠失、および/または置換変異体の両方が含まれる。野生型ドメインと実質的に同じ機能特性を保持する、上記ドメイン(例えば、Igドメイン)の数多くの変異体を得られ得ることは、当業者には容易に明らかであろう。

20

#### 【0126】

リガンド結合分子が由来し得る増殖因子受容体には、スプライスバリエーションおよび天然対立遺伝子変異体が含まれる。対立遺伝子変異体は当技術分野で周知であり、対立遺伝子形態、または1つもしくは複数のヌクレオチドの置換、欠失、もしくは付加を含むが、コード化ポリペプチドの実質的な機能変化をもたらさないアミノ酸配列を表す。VEGFR-3の例示的な対立遺伝子変異体は、文献、例えば、<http://www.uniprot.org/uniprot/P35916>に報告されており、ECD内の位置149、378、494、527、および641を含む。ポリヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発または特異的な酵素的切断および連結を含む標準的な方法を用いて、そのようなポリヌクレオチドを容易に作製することができる。同様に、結合活性を保持するペプチドミメティック化合物または1つもしくは複数のアミノ酸残基が非天然アミノ酸もしくはアミノ酸類似体に置換されている化合物の使用が企図される。好ましくは、アミノ酸置換が用いられる場合、置換は保存的である、すなわち、アミノ酸は、類似のサイズでかつ類似の電荷特性を有するアミノ酸に置換される。本明細書で使用する場合、「保存的置換」という用語は、別の生物学的に類似の残基によるアミノ酸残基の置換を表す。保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、システイン、グリシン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、ノルロイシン、もしくはメチオニンなどのある疎水性残基の別の疎水性残基への置換、またはリジンのアルギニンへの置換、アスパラギン酸のグルタミン酸への置換、もしくはアスパラギンのグルタミンへの置換等のある極性残基の別の極性残基への置換が挙げられる。互いに置換され得る中性親水性アミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、セリン、およびスレオニンが挙げられる。「保存的置換」という用語はまた、置換されていないアミノ酸の代わりに置換されたアミノ酸の使用を含む。

30

40

#### 【0127】

あるいは、Lehninger(Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY: NY, pp. 71-77(1975))に記載されるように、保存的アミノ酸は、以下に示すようにグループ化することができる:

非極性(疎水性)

A. 脂肪族: A、L、I、V、P、

50

- B．芳香族：F、W、
- C．イオウ含有：M、
- D．ボーダーライン：G。

無電荷極性

- A．ヒドロキシル：S、T、Y、
- B．アミド：N、Q、
- C．スルフヒドリル：C、
- D．ボーダーライン：G。

正電荷（塩基性）：K、R、H。

負電荷（酸性）：D、E。

10

#### 【0128】

疑問を回避するために、「成分ドメイン」は、配列番号2の位置104～106のN-X-S/Tシークオンモチーフが、例えば置換により突然変異されている、VEGFR-3のD1に対応するドメインを含む。

#### 【0129】

リガンド結合分子が複数の成分ドメイン、例えばVEGFR-3の成分ドメインD1、D2、D3を含む実施形態では、成分ドメインは、互いに直接結合していても、または1つまたは複数のスペーサーを介して結合していてもよい。一般に、「スペーサー」という用語は、共有結合を形成する1つまたは複数の成分ドメイン間に挿入され得る1つまたは複数の分子、例えば、核酸もしくはアミノ酸、またはポリエチレングリコールもしくはジスルフィド架橋などの非ペプチド部分を意味する。スペーサー配列を用いて、操作を容易にするための、成分間の目的とする望ましい部位を提供することができる。また、スペーサーを提供して、宿主細胞からのリガンド結合ポリペプチドの発現を増強し、成分または1群の成分が、その／それらの最適三次構造を取り得るように、かつ／またはその／それらの標的分子と適切に相互作用し得るように立体障害を低減することができる。スペーサーおよび望ましいスペーサーを特定する方法については、例えば、参照により本明細書に具体的に組み込まれるGeorge et al. (2003) Protein Engineering 15: 871-879を参照されたい。スペーサー配列は、受容体成分に天然に結合している1つまたは複数のアミノ酸を含んでもよく、あるいはリガンド結合ポリペプチドの発現を増強するために、目的の特別に望ましい部位を提供するために、成分ドメインが最適な三次構造を形成できるようにするために、かつ／または成分または1群の成分とその／それらの標的分子との相互作用を増強するために用いられる追加の配列であってもよい。一実施形態では、スペーサーは、アミノ酸長が1～100、好ましくはアミノ酸長が1～50の間である、1つまたは複数の成分間の1つまたは複数のペプチド配列を含む。好ましい実施形態では、2つの成分ドメイン間のスペーサーは、野生型受容体中の受容体成分に天然に結合しているアミノ酸から実質的になる。例えばVEGFR-3のD1、D2、およびD3など、天然受容体中で互いに隣接している、同じ受容体からの複数の成分ドメインを含むリガンド結合分子の場合、一実施形態では、これらのドメインは、天然のアミノ酸連結配列に対応するスペーサーを用いて、互いに（例えば、D1とD2ならびにD2とD3）結合している。

20

30

40

#### 【0130】

一部の変形態では、各リガンド結合ポリペプチドは、免疫グロブリン定常領域などの融合相手タンパク質との融合体として発現され、異種融合相手が連結してリガンド結合分子が形成される。

#### 【0131】

多量体、多量体化成分、融合相手、およびリンカー

融合相手は、リガンド結合分子の機能性を増強する任意の異種成分とすることができる。したがって、例えば、融合相手は、リガンド結合ポリペプチドの溶解性の増大、クリアランスの調節、特定の細胞型または組織型のターゲティングの促進、生物活性の向上、産生および／または回収の補助、薬理学的特性の向上、または薬物動態学（PK）プロファイ

50

ルの向上を可能にする。PKプロファイルの向上に関しては、例えば、リガンド結合分子の血清半減期、組織浸透性、免疫原性の欠如、または安定性を向上させることによって達成することができる。好ましい実施形態では、融合相手は、多量体化成分、血清タンパク質、または血清タンパク質に結合することができる分子からなる群から選択される。

#### 【0132】

融合相手が血清タンパク質またはそのフラグメントである場合、それは、  
 - 1 - ミクログロブリン、AGP - 1、オロソムコイド、  
 - 1 - 酸性糖タンパク質、ビタミンD結合タンパク質(DBP)、ヘモペキシン、ヒト血清アルブミン(hSA)、トランスフェリン、フェリチン、アフアミン、ハプトグロビン、  
 - フェトプロテイン チログロブリン、  
 - 2 - HS - 糖タンパク質、  
 - 2 - 糖タンパク質、ヒアルロン結合タンパク質  
 シンタキシン、C1R、C1qa鎖、ガレクチン3 - Mac2結合タンパク質、フィブリノーゲン、多量体Ig受容体(PIGR)、  
 - 2 - マクログロブリン、尿素輸送タンパク質、ハプトグロビン、IGFBP、マクロファージスカベンジャー受容体、フィブロネクチン、ギアンチン(giantin)、Fc、  
 - 1 - アンチキロモトリプシン(antichymotrypsin)、  
 - 1 - アンチトリプシン、アンチトロンビンIII、アポリポタンパク質A - 1、アポリポタンパク質B、  
 - 2 - ミクログロブリン、セルプラスミン、補体成分C3またはC4、CIEステラーゼ阻害因子、C反応性タンパク質、シスタチンC、およびプロテインCからなる群から選択される。より具体的な実施形態では、融合相手は、  
 - 1 - ミクログロブリン、AGP - 1、オロソムコイド、  
 - 1 - 酸性糖タンパク質、ビタミンD結合タンパク質(DBP)、ヘモペキシン、ヒト  
 血清アルブミン(hSA)、アフアミン、およびハプトグロビンからなる群から選択される。所望に応じて、融合相手成分を含めると、本発明の融合ポリペプチドの血清半減期を延長させることができる。例えば、血清アルブミン融合ポリペプチドの例については、参照により本明細書にその内容全体が具体的に組み込まれる米国特許第6,423,512号明細書、同5,876,969号明細書、同6,593,295号明細書、および同6,548,653号明細書を参照されたい。hSAは、体内全体にわたって、特に腸管および血液成分に広範囲に分布し、モル浸透圧濃度および血漿量の維持に重要な役割を果たしている。それは、肝臓で徐々にクリアランスされ、典型的には、ヒトで14~20日のin vivo半減期を有する(Waldmann et al. (1977) Albumin, Structure Function and Uses; Pergamon Press; pp. 255 - 275)。

#### 【0133】

融合相手が血清タンパク質に結合することができる分子である場合、この分子は、合成小分子、脂質またはリポソーム、アプトマーなどの合成核酸を含む核酸、ペプチド、またはオリゴ糖とすることができる。この分子はさらに、例えばFcR1、FcR2、FcR3、多量体Ig受容体(PIGR)、ScFv、および血清タンパク質に特異的な他の抗体フラグメントなどのタンパク質とすることができる。

#### 【0134】

融合相手が多量体化成分である場合、それは、第1のリガンド結合分子を別のリガンド結合分子または別のリガンド結合分子の別の多量体化成分と作動可能に連結させて、より高次の構造、例えば、二量体、三量体等を形成させることができる任意の天然または合成の配列または化合物である。適切な多量体化成分としては、c-junもしくはc-fosに由来するロイシンジッパードメインを含むロイシンジッパー；または軽鎖の定常領域に由来する配列；ヘリックス・ループ・ヘリックスモチーフなどの合成配列(Muller et al. (1998) FEBS Lett. 432: 45 - 49)、コイル-コイルモチーフ等、または当技術分野で公知の他の一般に容認されている多量体化ドメインを挙げることができる。一部の実施形態では、融合成分は、例えばヒトIgG、IgM、またはIgAからの免疫グロブリン由来ドメインを含む。

#### 【0135】

一態様では、本明細書に記載するリガンド結合分子は多量体として生成される。多量体

10

20

30

40

50

の各サブユニットは、リガンド結合分子、例えばリガンド結合ポリペプチドを含むかまたはそれからなる。これらの多量体は、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体の可溶性受容体であり得、多量体受容体は9個以下のサブユニット、好ましくは6個以下のサブユニット、さらに好ましくは3個以下のサブユニット、および最も好ましくは2つのサブユニットからなる。好ましくは、これらの多量体可溶性受容体は、リガンド結合分子のホモ二量体である。

#### 【0136】

多量体における少なくとも2個のサブユニットは、互いに作動可能に連結される。「作動可能に連結される」という用語は、サブユニットが共有結合および/または非共有結合を通して結合していることを示す。サブユニットは、架橋試薬またはポリペプチドもしくはペプチドリンカーなどのリンカーを介してなど、任意の適切な手段によって共有結合させることができる。別の実施形態では、サブユニットは非共有結合を介して連結される。一部の変形態態では、2個のサブユニット（例えば、2つのリガンド結合ポリペプチド）は、直接または「ペプチドリンカー」を介してペプチド結合により結合している。サブユニット間に導入されるペプチドリンカーは、長さが1～3個のアミノ酸残基（好ましくは、グリシン、セリン、スレオニン、もしくはアラニンなどの小さなアミノ酸からなる）ほど短くてもよく、またはより長く、例えば長さが13、15、または16個のアミノ酸残基であってもよい。好ましくは、ペプチドリンカーは、免疫学的に不活性なペプチドである。前記リンカーは、配列E - F - M (G l u - P h e - M e t) のトリペプチド、例えば、G l u - P h e - G l y - A l a - G l y - L e u - V a l - L e u - G l y - G l y - G l n - P h e - M e t (配列番号7) からなる13アミノ酸リンカー配列、(G 4 S) 3 (配列番号8) からなる15アミノ酸リンカー配列、G G S G G S G G G G S G G G G S (配列番号9) からなる16アミノ酸リンカー配列、またはヒトI g G (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4) のヒンジ領域とすることができる。一部の変形態態では、2個のサブユニットは、例えばジスルフィド結合または他の結合によって互いに連結される2つの別個のポリペプチド鎖を含むリガンド結合ポリペプチドである。

#### 【0137】

一部の実施形態では、リガンド結合分子は、それぞれがリガンド結合ポリペプチドを含む少なくとも2個のサブユニットを含む融合タンパク質の形態をしている。このようにして、融合タンパク質は、単一翻訳領域としてそれをコードする核酸分子の宿主細胞における直接発現により、組換え的に生成させることができる。

#### 【0138】

一部の変形態態では、リガンド結合ポリペプチドは、免疫グロブリン定常領域などの異種タンパク質融合相手との融合体として発現され、異種融合相手が連結して多量体リガンド結合分子が形成される。一実施形態では、サブユニットは、多量体化成分に作動可能に連結される。多量体化成分には、2個以上のサブユニットを作動可能に連結して高次構造、例えば二量体、三量体等を形成させることができる任意の天然または合成の配列が含まれる。多量体化成分は、サブユニットと「直接」相互作用することによって2個以上のサブユニットを作動可能に連結することができる。あるいは、あるサブユニットに対する多量体化成分は、別のサブユニットに対する別の多量体化成分と相互作用してこれらのサブユニットを作動可能に連結することができる。

#### 【0139】

一実施形態では、サブユニットは、サブユニットの多量体化を提供する追加のアミノ酸ドメインに作動可能に連結される（具体的には、追加のドメインは、サブユニットの二量体化を提供する任意の機能領域を含む）。「作動可能に連結される」という用語は、V E G F R - 3 ベースのサブユニットおよび追加のアミノ酸ドメインが、ペプチド結合により直接または「ペプチドリンカー」（本明細書に規定する）を介して結合しており、かつV E G F R - 3 ベースのサブユニットがリガンド結合特性を保持していることを指す。追加のアミノ酸ドメインは、V E G F R - 3 サブユニット配列の上流（N末端）または下流（



C末端)に位置することができる。好ましくは、それは下流に位置する(すなわち、第1の免疫グロブリン様ドメイン(Ig-ドメイン)から離れて)。このようにして、融合タンパク質は、それをコードする核酸分子の宿主細胞における直接発現によって、組換え的に生成させることができる。そのような実施形態では、本明細書に記載するリガンド結合分子は、リガンド結合ポリペプチドと、別の融合タンパク質に存在する多量体化成分に相互作用して二量体などのより高次の構造を形成させることができる多量体化成分とを含有する融合タンパク質の多量体である。これらのタイプの融合タンパク質は、VEGFR-3サブユニット配列(すなわち、リガンド結合ポリペプチド)を、二量体、三量体等の形成を可能にする、他のタンパク質から単離されたドメインに作動可能に連結することにより調製することができる。本明細書に記載するリガンドポリペプチドの多量体化を可能にするタンパク質配列の例としては、以下に限定されるものではないが、免疫グロブリン、hCG(国際公開第97/30161号パンフレット)、コラーゲンX(国際公開第04/33486号パンフレット)、C4BP(国際公開第04/20639号パンフレット)、Erbbタンパク質(国際公開第98/02540号パンフレット)、またはコイルドコイルペプチド(国際公開第01/00814号パンフレット)などのタンパク質から単離されたドメインが挙げられる。これらの開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0140】

多量体化成分は、例えば、(i)1~約500アミノ酸長の間のアミノ酸配列、(ii)ロイシンジッパー、(iii)ヘリックスループモチーフ、および(iv)コイル-コイルモチーフから選択することができる。多量体化成分が、1~約500アミノ酸長の間のアミノ酸配列を含む場合、この配列は、1つまたは複数のシステイン残基を有する多量体化成分を含む別の融合ポリペプチド上の対応するシステイン残基とジスルフィド結合を形成することができる1つまたは複数のシステイン残基を含有することができる。

#### 【0141】

特定の態様では、多量体は、多量体化成分としても作用し得る、融合相手としての免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの一部に作動可能に連結されているリガンド結合ポリペプチドの二量体である。「作動可能に連結される」という用語は、リガンド結合ポリペプチドおよび免疫グロブリンまたはその一部が、ペプチド結合によって直接または「ペプチドリンカー」(本明細書に規定される)を介して結合しており、かつリガンド結合ポリペプチドのリガンド結合特性が保持されていることを示す。この実施形態では、リガンド結合ポリペプチドは、免疫グロブリンの全部または一部、具体的にはヒト免疫グロブリン、さらに具体的にはヒト免疫グロブリンのFc部分に作動可能に連結されている。典型的には、ヒト免疫グロブリンのFc部分は、2つの定常領域ドメイン(CH2およびCH3ドメイン)およびヒンジ領域を含有するが、可変領域を欠失している(例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,018,026号明細書および同5,750,375号明細書を参照のこと)免疫グロブリンは、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMを含む免疫グロブリンの主要なクラス、ならびに任意のサブクラスまたはアイソタイプ、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4; IgA-IおよびIgA-2の何れかから選択することができる。一実施形態では、Fc部分は、ヒトIgG4のFc部分であり、これは溶液中で安定であり、かつ補体活性化活性がほとんどまたはまったくない。別の実施形態では、Fc部分はヒトIgG1のFc部分である。Fc部分は、補体結合、Fc受容体への結合等の望ましくない活性を防止するために、突然変異させることができる。免疫グロブリンに由来するアミノ酸配列は、リガンド結合ポリペプチドのC末端またはN末端、好ましくはC末端に連結することができる。そのような融合タンパク質は、VEGFR-3サブユニット:Fc融合タンパク質をコードするDNAを細胞にトランスフェクトし、同細胞中で二量体を発現させることにより調製することができる。特定の実施形態では、リガンド結合ポリペプチドは、各単量体サブユニット上で同じである(すなわち、二量体はホモ二量体である)。免疫グロブリン融合タンパク質を作製する方法は、例えば、両方とも参照により本明細書に組み込まれる、Hollenbau

10

20

30

40

50

ghおよびAruffo("Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pp. 10.19.1-10.19.11, 1992)または国際公開第01/03737号パンフレットに記載されるものなど、当技術分野で周知である。

【0142】

あるいは、本発明のリガンド結合ポリペプチドの二量体は、リガンド結合ポリペプチドの一方を免疫グロブリン重鎖の定常領域に作動可能に連結し、他方のリガンド結合ポリペプチドを免疫グロブリン軽鎖の定常領域に作動可能に連結することにより調製することができる。例えば、リガンド結合ポリペプチドを、ヒトIgG1のCH1-ヒンジ-CH2-CH3領域に作動可能に連結することができ、もう1つのまたは同じリガンド結合ポリペプチドをIg軽鎖のC領域に作動可能に連結することができる。一実施形態では、重定常鎖は、ヒト4であり、これは、溶液中で安定であり、かつ補体活性化活性がほとんどまたはまったくない。別の実施形態では、重定常鎖はヒト1である。重定常鎖は、補体結合、Fc受容体への結合等の望ましくない活性を防止するために突然変異させることができる。

10

【0143】

また、必要に応じて、本明細書に記載する融合タンパク質は、精製または製造を容易にする任意の機能領域を含むことができる。そのような追加のアミノ酸配列の具体例としては、GST配列またはHisタグ配列が挙げられる。一部の変更形態では、精製を容易にする領域は、医薬用途用の組成物の製剤のために除去される。

20

【0144】

免疫グロブリンに由来するアミノ酸配列は、リガンド結合ポリペプチドのC末端またはN末端、好ましくはC末端に連結することができる。免疫グロブリン軽鎖融合タンパク質および免疫グロブリン重鎖融合タンパク質をコードするDNAをトランスフェクトされた細胞は、それぞれリガンド結合ポリペプチドを含有する重鎖/軽鎖ヘテロ二量体を発現する。両方のリガンド結合ポリペプチドは、有利には、細胞からの分泌を促進するために最初に合成されたときに天然または異種シグナルペプチドを含むが、このシグナルペプチドは、分泌の際に切断される。シグナルペプチドを含む前述の実施形態のいずれについても変更形態が企図される。ヒトVEGFR-3の天然シグナルペプチドは、配列番号2の残基1~24を含む。数多くの他のシグナルペプチドタンパク質が文献に教示されている。

30

【0145】

本発明の別の特定の態様では、多量体のリガンド結合ポリペプチドは、非共有結合を介して連結される。サブユニットの非共有結合は、その生物活性(すなわち、ヒトVEGFR-Cおよび/またはVEGFR-Dに結合するその能力)に干渉しない任意の適切な手段によって達成することができる。特定の態様では、これらの多量体は、あるリガンド結合ポリペプチドが第1の化合物に作動可能に連結され、別のまたは同じリガンド結合ポリペプチドが、第1の化合物に非共有結合することになる第2の化合物に作動可能に連結されているリガンド結合ポリペプチドの二量体である。そのような化合物の例には、ビオチンおよびアビジンがある。リガンド結合ポリペプチドの二量体は、一方のVEGFR-3サブユニットをビオチンに作動可能に連結し、他方のリガンド結合ポリペプチドをアビジンに連結することにより調製することができる。こうして、ビオチンとアビジンの非共有相互作用を通して、受容体が形成される。他の例としては、異種二量体のタンパク質性ホルモンのサブユニットが挙げられる。これらの実施形態では、一方のリガンド結合タンパク質をコードするDNAコンストラクトは、hCGなどの異種二量体のタンパク質性ホルモンのサブユニットをコードするDNAコンストラクトに融合され、他方のリガンド結合タンパク質をコードするDNAコンストラクトは、hCGなどの異種二量体のタンパク質性ホルモンの他方のサブユニットをコードするDNAコンストラクトに融合される(米国特許第6,193,972号明細書に開示されるように)。これらのDNAコンストラクトは、リガンド結合分子の発現をもたらす同じ細胞中に同時発現される。というのは、同時

40

50

発現される各配列は、発現に際して異種二量体を形成するように対応するホルモンサブユニットを含有するからである。異種二量体のタンパク質性ホルモンに由来するアミノ酸配列は、リガンド結合ポリペプチドのC末端またはN末端、好ましくはC末端に連結することができる。両方のサブユニットは、有利には、細胞からの分泌を促進するために最初に合成されたときに天然または異種シグナルペプチドを含むが、このシグナルペプチドは、分泌の際に切断される。

#### 【0146】

一実施形態では、リガンド結合分子は、非VEGFR-3由来結合ユニット、すなわちVEGFR-3由来成分ドメインを含有しない結合ユニットに作動可能に連結される。そのようなキメラリガンド結合分子は、例えば、他のチロシンキナーゼ受容体に基づく異種結合ユニットを含むことができる。一実施形態では、そのような異種結合ユニットは、VEGF-A(VEGF)、VEGF-B、PLGF、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、およびPDGF-Dから選択される少なくとも1つのリガンドポリペプチドに結合する。好ましい実施形態では、そのような異種結合ユニットは、少なくともVEGF-A(VEGF)に結合する。

#### 【0147】

一実施形態では、そのような異種結合ユニットは、VEGFR-1もしくはVEGFR-2またはその両方に由来する成分ドメインを含む。キメラリガンド結合分子の形態において、本発明のリガンド結合分子と組み合わせて使用することができる異種結合ユニットの例としては、例えば、国際公開第2000/75319号パンフレット、国際公開第2005/000895号パンフレット、および国際公開第2006/088650号パンフレットに記載されているVEGFトラップ分子が挙げられる。好ましい異種結合ユニットは、任意選択で免疫グロブリンのFc部分に融合した、VEGFR-1(R1D2)由来のIgドメイン2およびVEGFR-2(R2D3)由来のIgドメイン3を含む。一実施形態では、免疫グロブリンのFc部分に融合したR1D2R2D3結合ユニットと作動可能に連結された免疫グロブリンのFc部分に連結された本発明のリガンド結合ポリペプチドを含むキメラ分子が想定される。2つの結合ユニットは、2つのFc部分間のジスルフィド結合を介して作動可能に連結される。

#### 【0148】

リンカー

ヒトVEGFR-3のIg様ドメインは、互いにまたは他の受容体のIg様ドメインに(ペプチド、ジスルフィド、または他のタイプの共有結合を介して)直接結合することができるが、本明細書に記載するリガンド結合分子は、任意選択で、2つ以上の異なるユニット、例えば、VEGFR3 ECDフラグメントと別のVEGFR3 ECDフラグメント、またはそれ自体のコピーでも互いに結合させる(1つまたは複数の)リンカーをさらに含む。リンカーはまた、結合ユニットを本明細書に記載する他の置換基に連結することができる。一部の実施形態では、リンカーは、異種ポリペプチドを含む。例えば、一部の実施形態では、リンカーは、結合ユニットを連結して、単一リガンド結合分子として発現され得る単一の連続したペプチドを形成させるペプチドを含む。リンカーは、アレルギー反応を誘導する可能性が少ないように選ぶことができる。多糖または他の部分もまた、結合ユニットを連結してリガンド結合分子を形成させるために用いることができる。

#### 【0149】

1つのリガンド結合分子当たり2つ以上のリンカーを用いることができる。リンカーは、所望であればそれらが互いに相互作用して、例えば二量体を形成できるように、またはそれらがリガンドと相互作用できるように、種々のリガンド結合ユニット間の最適な配座(立体障害)自由度を求めて選択することができる。リンカーは、一続きの結合ユニットが直列に連結されるように直鎖状であることも、またはリンカー、例えば分枝状リンカーは、種々の結合ユニットが結合するスキャフォールドとして機能することもある。リンカーはまた、例えばTam, J. Immunol. Methods 196:17(1996)に開示されるように、複数の分枝を有することもある。結合ユニットは、N末端アミ

ノ基、C末端カルボキシル基、側鎖、化学的に修飾された基、側鎖、または他の手段を介して互いにまたはリンカースキャフォールドに結合させることができる。

#### 【0150】

リンカーペプチドは、所望の特性を可能にする配列を有するように設計することができる。例えば、グリシル残基の使用は、比較的大きな配座自由度を可能にするが、プロリンは、逆の効果を示す傾向がある。ペプチドリinkerは、特定の二次構造および三次構造、例えばヘリックス、シート、バレルを実現するように選ぶことができる。四次構造もまた、2つの結合ユニットを非共有的に互いに連結するリンカーを作製するために利用することができる。例えば、疎水性面を有するタンパク質ドメインを各結合ユニットに融合させると、2つの分子の疎水的相互作用間の相互作用を介して2つの結合ユニットの連結が可能になり得る。一部の実施形態では、リンカーは極性相互作用を提供することができる。例えば、プロトオンコプロテインMy cおよびMaxのロイシンジッパードメインはそれぞれ用いることができる。Luscher and Larsson, *Oncogene* 18:2955-2966 (1999)。一部の実施形態では、リンカーは、塩橋またはジスルフィド結合の形成を可能にする。リンカーは、非天然アミノ酸ならびにポリペプチドに天然には組み込まれていない天然アミノ酸を含むことができる。一部の実施形態では、リンカーは、金属または他のイオンとそれによって連結された複数のペプチドからの種々の残基との間の配位化合物を含む。

10

#### 【0151】

少なくとも1つのアミノ酸残基の直鎖状ペプチドリinkerが企図される。一部の実施形態では、リンカーは10,000残基超を有する。一部の実施形態では、リンカーは、1~10,000残基、1~1000残基、1~100残基、1~50残基、または1~10残基を有する。一部の実施形態では、直鎖状のペプチドリinkerは、比較的不活性な側鎖を有する残基を含む。ペプチドリinkerアミノ酸残基は、-カルボキシ基および-アミノ基を介して連結される必要は完全にまたは全くない。すなわち、ペプチドは、種々の残基の側鎖基を介して連結され得る。

20

#### 【0152】

リンカーは、それが融合しているポリペプチドが互いにまたは別のポリペプチドと二量体化することができるか否かに影響する可能性がある。リンカーはいくつかの機能に役立つ。細胞膜のおよそ二次元平面に拘束されている天然受容体単量体は、比較的高い局所濃度を有し、共受容体(結合ユニット)のアベイラビリティにおいて、相手を見出す確率が増大している。そのような利点を欠く、溶液中に遊離している受容体は、単量体の有効濃度を増大させるリンカーによって助けられる可能性がある。

30

#### 【0153】

一部の実施形態では、リガンド結合分子は、2種以上のタイプのリンカーを含むことができる。適切なリンカーはまた、上記に論じた化学修飾を含むことができる。

#### 【0154】

本明細書に記載するリガンド結合分子は、追加のN末端アミノ酸残基、好ましくはメチオニンを含むことができる。実際、発現系および条件に応じて、ポリペプチドは開始メチオニンと共に組換え宿主細胞で発現させることができる。次いで、この追加アミノ酸は、文献(Van Valkenburgh HA and Kahn RA, *Methods Enzymol.* (2002) 344:186-93; Ben-Bassat A, *Bioprocess Technol.* (1991) 12:147-59)に開示されている方法に従って、得られた組換えタンパク質中に維持されるか、またはメチオニンアミノペプチダーゼなどのエキソペプチダーゼによって除去され得る。

40

#### 【0155】

置換基および他の化学修飾

本明細書に記載するリガンド結合分子は、任意選択で種々の置換基で化学修飾される。そのような修飾は、好ましくは、増殖因子結合親和性またはリガンド結合分子の特異性を実質的に低下させない。むしろ、化学修飾は、本明細書で論じられるようなさらなる望ま

50

しい特性を付与する。化学修飾は、異種ペプチド、多糖、脂質、放射性同位元素、非標準的なアミノ酸残基および核酸、金属キレート、ならびに種々の毒素などのいくつかの異なる形態を取り得る。

#### 【0156】

本明細書に記載する受容体フラグメント（または「結合ユニット」もしくは「成分ドメイン」）およびリガンド結合分子は、任意選択で、種々の特性（例えば、溶解性の向上、クリアランスの調節、特定の細胞型または組織型へのターゲティング）を付与するために、異種ポリペプチドなどの異種融合相手に融合される。一部の実施形態では、受容体フラグメントは、IgGまたは他の免疫グロブリンのFcドメインに連結される。一部の実施形態では、受容体フラグメントは、アルカリホスファターゼ（AP）に融合される。FcまたはAP融合コンストラクトを作製する方法は、国際公開第02/060950号パンフレットに見出される。特定の特性（例えば、半減期、バイオアベイラビリティ、相互作用相手）を有するタンパク質ドメインとリガンド結合ポリペプチドまたは分子を融合させることにより、これらの特性をリガンド結合分子に付与することが可能になる（例えば、分子は、特定の組織分布または特定の生物学的半減期を有するように操作される）。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、共受容体およびVEGFRフラグメントを含む。

10

#### 【0157】

特定のリガンド結合分子に用いられる特定の融合相手（例えば、異種ポリペプチド）は、VEGR-3フラグメントが二量体化するか否かに影響を及ぼし得るものであり、これにより、次にはリガンド結合が影響され得る。

20

#### 【0158】

ヒトIgGのFc領域などの置換基の場合、融合体は、リガンド結合分子に直接融合されるか、または介在配列によって融合され得る。例えば、ヒトIgGヒンジ、CH2およびCH3領域は、Fc領域に結合することになるリガンド結合分子のN末端またはC末端の何れかで融合することができる。得られるFc融合コンストラクトは、プロテインA親和性カラムによる精製が可能である（Pierce, Rockford, Ill.）。Fc領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合されていない対応物よりもin vivoで実質的に長い半減期を示し得る。Fc領域への融合により、融合ポリペプチドの二量体化/多量体化が可能になる。Fc領域は、天然のFc領域であっても、または優れた特性、例えば、治療の質、循環時間、凝集の低下のために改変されていてもよい。

30

#### 【0159】

ポリペプチドは、例えば、糖鎖付加、アミド化、カルボキシル化、もしくはリン酸化によって、または酸付加塩、アミド、エステル、特にC末端エステル、およびN-アシル誘導体の生成によって改変することができる。VEGFR-3のIg様ドメインI~IIIは、5つの推定上のN糖鎖付加部位を含む（それぞれ、VEGFR-3のN1、N2、N3、N4、およびN5シークオンまたは領域と本明細書では呼ばれる）。N1は配列番号2のアミノ酸33~35に対応し；N2は配列番号2のアミノ酸104~106に対応し；N3は配列番号2のアミノ酸166~168に対応し；N4は配列番号2のアミノ酸251~253に対応し、N5は配列番号2のアミノ酸299~301に対応する。一部の実施形態では、本明細書に記載するリガンド結合分子は、分子のN2領域に改変を含む。例えば、一部の実施形態では、配列番号2の位置104に対応する、リガンド結合分子中のアミノ酸は、欠失し、別のアミノ酸に置換される。保存的置換が好ましい。一部の実施形態では、配列番号2の位置104に対応するアミノ酸は、欠失し、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、およびリジンからなる群から選択されるアミノ酸に置換される。さらに他の変更形態では、位置106はN2シークオンを排除するために置換される。配列番号2のN2シークオンが上記のように改変される実施形態では、配列番号2のN1、N3、N4、およびN5のシークオンは改変されていないことが好ましい。

40

#### 【0160】

タンパク質はまた、他の部分と共有結合複合体または非共有結合複合体を形成すること

50

により、ペプチド誘導体を生成するように改変することができる。共有結合複合体は、化学部分を、ポリペプチドのアミノ酸の側鎖上にある官能基またはN末端またはC末端にある官能基に連結することにより調製することができる。

#### 【0161】

ポリペプチドは、以下に限定されるものではないが、放射標識、蛍光標識、酵素（例えば、熱量定量的または蛍光定量的な反応を触媒する）、基質、固体マトリックス、または担体（例えば、ビオチンまたはアビジン）を含むレポーター基にコンジュゲートすることができる。アナログの例は、国際公開第98/28621号パンフレット、ならびにOlsson, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 95: 11709-11714 (1998)、米国特許第5,512,545号明細書および同5,474,982号明細書；米国特許出願公開第20020164687号明細書および同20020164710号明細書に記載されている。

10

#### 【0162】

システニル残基は、最も一般的には、クロロ酢酸またはクロロアセトアミドなどのハロアセテート（および対応するアミン）と反応してカルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、  
- プロモ - （5 - イミドゾイル）プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N - アルキルマレイミド、3 - ニトロ - 2 - ピリジルジスルフィド、メチル2 - ピリジルジスルフィド、p - クロロメルクリベンゾエート、2 - クロロメルクリ - 4 - ニトロフェノール、またはクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1,3 - ジアゾールとの反応により誘導体化される。

20

#### 【0163】

ジエチルプロカルボネートがヒスチジル側鎖に比較的特異的であるため、ヒスチジル残基は、pH 5.5 ~ 7.0でのジエチルプロカルボネートとの反応によって誘導体化される。パラ - プロモフェナシルプロミドも有用であり、この反応は、好ましくは、0.1 M カコジル酸ナトリウム中、pH 6.0で行なわれる。

#### 【0164】

リジニル残基およびアミノ末端残基は、コハク酸無水物またはカルボン酸無水物と反応する。これらの試剤による誘導体化には、リジニル残基の電荷を反対にする効果がある。

- アミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬には、ピコリンイミド酸メチルなどのイミドエステル；ピリドキサルリン酸；ピリドキサル；クロロボロヒドリド；トリニトロベンゼンスルホン酸；O - メチルイソ尿素（O - methylisourea）；2,4 - ペンタンジオン；およびグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応が含まれる。

30

#### 【0165】

アルギニル残基は、1つまたはいくつかの従来試薬、とりわけフェニルグリオキサル、2,3 - ブタンジオン、1,2 - シクロヘキサジオン、およびニンヒドリンとの反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化では、グアニジン官能基のpKaが高いので、アルカリ条件下で反応を行う必要がある。さらに、これらの試薬は、アルギニンだけでなくリジンの - アミノ基とも反応し得る。

40

#### 【0166】

チロシル残基それ自体の特異的な修飾が広範囲に研究されており、特に、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によるチロシル残基へのスペクトル標識の導入に関心がもたれている。最も一般的には、N - アセチルイミジゾールおよびテトラニトロメタンを用いて、それぞれO - アセチルチロシル類および3 - ニトロ誘導体を形成させる。チロシル残基は、ラジオイムノアッセイで使用される標識タンパク質を調製するために、125Iまたは131Iを用いてヨウ素化される。

#### 【0167】

カルボキシル側鎖基（アスパルチルまたはグルタミル）は、1 - シクロヘキシル - 3 - （2 - モルホリニル - （4 - エチルカルボジイミドまたは1 - エチル - 3 - （4 - アゾニ

50

ア - 4 , 4 - ジメチルペンチル)カルボジイミドなどのカルボジイミド ( R 1 ) との反応によって選択的に修飾される。さらに、アスパルチル残基およびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によって、アスパラギニル残基およびグルタミニル残基に変換される。

#### 【 0 1 6 8 】

二官能基試剤による誘導体化は、水不溶性支持マトリックスにリガンド結合分子を架橋するために有用である。そのような誘導はまた、リガンド結合分子中の隣接した結合エレメントを連結し得る、または異種ペプチド、例えば F c フラグメントに結合エレメントを連結し得るリンカーを提供することができる。一般に用いられる架橋剤としては、例えば、1 , 1 - ビス ( ジアゾアセチル ) - 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば 4 - アジドサリチル酸とのエステル、3 , 3 ' - ジチオビス ( スクシンイミジルプロピオネート ) などのジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、およびビス - N - マレイミド - 1 , 8 - オクタンなどの二官能性マレイミドが挙げられる。メチル - 3 - [ ( p - アジドフェニル ) ジチオ ] プロピオイミデートなどの誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化可能な中間体を生じる。あるいは、臭化シアン活性化炭水化物などの反応性の水不溶性マトリックス、ならびに参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 3 , 9 6 9 , 2 8 7 号 ; 同第 3 , 6 9 1 , 0 1 6 号 ; 同第 4 , 1 9 5 , 1 2 8 号 ; 同第 4 , 2 4 7 , 6 4 2 号 ; 同第 4 , 2 2 9 , 5 3 7 号 ; および同第 4 , 3 3 0 , 4 4 0 号に記載される反応性基材がタンパク質固定化のために用いられる。

#### 【 0 1 6 9 】

グルタミニル残基およびアスパラギニル残基は、対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基に脱アミド化されることが多い。あるいは、これらの残基は、温和な酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も本発明の範囲内である。

#### 【 0 1 7 0 】

他の修飾としては、プロリンおよびリジンの水酸化、セリル残基またはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン側鎖、アルギニン側鎖、およびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化 ( T . E . C r e i g h t o n , P r o t e i n s : S t r u c t u r e a n d M o l e c u l e P r o p e r t i e s , W . H . F r e e m a n & C o . , S a n F r a n c i s c o , p p . 7 9 - 8 6 , 1 9 8 3 ) 、 N 末端アミンのアセチル化、ならびに一部の例では、C 末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。このような誘導体は、リガンド結合分子ポリペプチドがポリマーに連結されている、化学修飾されたポリペプチド組成物である。選択されるポリマーは典型的には水溶性であり、そのためそれが結合しているタンパク質は、生理的環境などの水性環境で沈殿しない。選択されるポリマーは、通常、アシル化のための活性エステルまたはアルキル化のためのアルデヒドなどの単一反応基を有するように修飾され、その結果、本方法で提供されるように、重合度が制御され得る。ポリマーは、任意の分子量のものでよく、分枝していても分枝していなくてもよい。ポリマーの混合物は、リガンド結合分子ポリペプチドポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終製品製剤の治療用途のために、ポリマーは薬学的に許容される。

#### 【 0 1 7 1 】

ポリマーはそれぞれ、任意の分子量のものでよく、分枝していても分枝していなくてもよい。ポリマーはそれぞれ、典型的には、約 2 k D a ~ 約 1 0 0 k D a の間の平均分子量を有する ( 「 約 」 という用語は、水溶性ポリマーの調製では、分子の中には指定の分子量よりも重くなるものも、軽くなるものもあることを示す ) 。各ポリマーの平均分子量は、約 5 k D a ~ 約 5 0 k D a の間、より好ましくは約 1 2 k D a ~ 約 4 0 k D a の間、最も好ましくは約 2 0 k D a ~ 約 3 5 k D a の間である。

#### 【 0 1 7 2 】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下に限定されるものではないが、N 連結または O 連結の炭水化物、糖、ホスフェート、炭水化物 ; 糖 ; ホスフェート ; ポリ

10

20

30

40

50

エチレングリコール ( P E G ) ( モ ノ - ( C 1 ~ C 1 0 ) アルコキシ - またはアリアルオキシ - ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために用いられている P E G の形態を含む ) ; モノメトキシ - ポリエチレングリコール ; デキストラン ( 例えば約 6 k D の低分子デキストランなど ) 、セルロース ; セルロース ; 他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ - ( N - ビニルピロリドン ) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール ( 例えば、グリセロール ) 、およびポリビニルアルコールが挙げられる。また、共有結合多量体を調製するために用いることができる二官能性架橋分子が、本発明に包含される。

#### 【 0 1 7 3 】

一般に、化学的誘導体化は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために用いられる任意の適切な条件下で行うことができる。ポリペプチドの化学誘導体を調製するための方法は、一般に、( a ) リガンド結合分子が 1 つまたは複数のポリマー分子に結合するようになる条件下で、ポリペプチドを活性化ポリマー分子 ( ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体など ) と反応させるステップ、および ( b ) 反応生成物を得るステップを含む。最適な反応条件は、既知パラメーターおよび所望の結果に基づいて決定されることになる。例えば、ポリマー分子 : タンパク質の比が大きいほど、結合されるポリマー分子の量は多くなる。一実施形態では、リガンド結合分子ポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一ポリマー分子部分を有することができる。( 例えば、米国特許第 5 , 2 3 4 , 7 8 4 号明細書を参照のこと ) 。

#### 【 0 1 7 4 】

本明細書で使用する特に好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール ( P E G ) である。本明細書で使用する場合、ポリエチレングリコールは、モノ - ( C 1 ~ C 1 0 ) アルコキシ - またはアリアルオキシ - ポリエチレングリコールなど他のタンパク質を誘導体化するために用いることができる P E G の形態をいずれも包含することを意味する。P E G は直鎖状または分枝状の中性ポリエーテルであり、広範囲の分子量で入手可能であり、水およびほとんどの有機溶媒に可溶性である。P E G は、主としてその高い動的鎖可動性および親水性によって、したがって、他のタンパク質またはポリマーの表面に結合した場合、水シェルまたは水和層を形成することによって、水中に存在する場合、他のポリマーまたはペプチドを排除するのに効果的である。P E G は無毒で非免疫原性であり、体内消費について食品医薬品局 ( F o o d   a n d   D r u g   A d m i n i s t r a t i o n ) から承認されている。

#### 【 0 1 7 5 】

タンパク質または酵素は、P E G にコンジュゲートされた場合、動物に投与されたときの生物活性、非抗原性、および低下したクリアランス率が実証されている。参照により本明細書に組み込まれる、F . M . V e r o n e s e   e t   a l . , P r e p a r a t i o n   a n d   P r o p e r t i e s   o f   M o n o m e t h o x y p o l y ( e t h y l e n e   g l y c o l ) - m o d i f i e d   E n z y m e s   f o r   T h e r a p e u t i c   A p p l i c a t i o n s , i n J . M . H a r r i s   e d . , P o l y ( E t h y l e n e   G l y c o l ) C h e m i s t r y - - B i o t e c h n i c a l   a n d   B i o m e d i c a l   A p p l i c a t i o n s , 1 2 7 - 3 6 , 1 9 9 2 。これらの現象は、免疫系による認識を防止する、P E G の排除特性による。さらに、P E G は、タンパク質吸着の低減および血液適合性の改善のための表面修飾手法で広く用いられている。参照により本明細書に組み込まれる、S . W . K i m   e t   a l . , A n n . N . Y . A c a d . S c i . 5 1 6 : 1 1 6 - 3 0   1 9 8 7 ; J a c o b s   e t   a l . , A r t i f . O r g a n s   1 2 : 5 0 0 - 5 0 1 , 1 9 8 8 ; P a r k   e t   a l . , J . P o l y . S c i , P a r t   A   2 9 : 1 7 2 5 - 3 1 , 1 9 9 1 。ポリウレタンおよびポリスチレンなどの疎水性ポリマー表面は、P E G ( M W 3 , 4 0 0 ) の結合により改変することができ、非血栓形成性表面として用いることができる。表面特性 ( 接触角 ) は、P E G の水和作用により親水性表面との一致が高まる可能性があ

10

20

30

40

50



る。より重要なことは、タンパク質（アルブミンおよび他の血漿タンパク質）の吸着が大幅に低減され得、その結果PEGの高い鎖運動性、水和層、およびタンパク質排除特性が得られる。

【0176】

PEG（MW3,400）は、表面固定化試験、Park et al., J. Biomed. Mat. Res. 26:739-45, 1992で最適サイズと判定されたが、一方PEG（MW5,000）は、タンパク質抗原性の低下の点で最も有益であった。（F.M. Veronese et al., In J.M. Harris, et al., Poly(Ethylene Glycol) Chemistry - Biotechnical and Biomedical Applications, 127-36.）

10

【0177】

ペグ化リガンド結合分子を調製するための方法は、一般に、（a）リガンド分子が1つまたは複数のPEG基に結合するようになる条件下で、ポリペプチドをポリエチレングリコール（PEGの反応性エスエルまたはアルデヒド誘導体など）と反応させるステップ、および（b）反応生成物を得るステップを含む。一般に、アシル化のための最適な反応条件は、既知パラメーターおよび所望の結果に基づいて決定されることになる。例えば、PEG：タンパク質の比が大きいほど、ポリ-ペグ化生成物のパーセントは多くなる。一部の実施形態では、リガンド結合分子はN末端に単一PEG部分を有することになる。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,234,784号明細書を参照されたい。一部の実施形態では、本明細書に記載するリガンド結合分子は、任意選択で、分子に結合した少なくとも1つのPEG部分を含む。例えば、一部の実施形態では、約20~40 kDaのPEGは、リガンド結合分子のアミノ末端に結合している。

20

【0178】

本明細書に開示する誘導体化リガンド結合分子は、非誘導体化分子に比較して、追加の活性、生物活性の増強もしくは低下、または半減期の延長もしくは短縮などの他の特性を有することがある。

【0179】

リガンド結合分子をコードするポリヌクレオチドおよび発現系  
本発明は、本明細書に記載するリガンド結合分子、結合ユニット、およびポリペプチドだけでなく、そのような分子をコードする核酸、そのような分子を含むベクター、およびそのようなベクターを含む宿主細胞も含む。分子、ユニット、ポリペプチド、核酸、ベクター、および宿主細胞の何れかをを用いる方法はすべて、本発明の態様と見なされる。

30

【0180】

例示的なヒトVEGFR-3コード配列は、配列番号1に示され、配列番号1のフラグメント（N2シークオンに改変がある）は、本明細書に記載するリガンド結合ポリペプチドに対するコード配列として企図される。（例えば、VEGFR-3 ECDの全部または一部をコードするフラグメントが企図される。）遺伝コードの周知の縮重のため、数多くの等価なコード配列がポリペプチドコード配列について可能であり、そのような等価物はすべて本発明の態様として企図される。

40

【0181】

さらに、上記のように、VEGFR-3野生型ECD由来のアミノ酸配列変更形態がまさに企図されるように、核酸配列変更形態も企図される。核酸配列変更形態は、配列番号1に対するパーセント同一性で特徴づけることができる（例えば、少なくとも80、85、90、92、93、94、95、96、97、98、または99%の同一性）。

【0182】

ヌクレオチド配列変更形態はまた、好ましいコード配列の相補鎖にハイブリダイズする能力によって特徴づけることができる。核酸分子には、配列番号1に示す核酸分子のECDコード配列、または配列番号2および3に示す受容体型チロシンキナーゼアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子のECDコード配列、または本明細書に記載する核

50

酸フラグメントのE C Dコード配列、または本明細書に記載するポリペプチドをコードする核酸フラグメントのE C Dコード配列と、本明細書に規定する中等度または高度ストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子が含まれる。

#### 【0183】

「高度ストリンジент条件」という用語は、配列が高度に相補的であるDNAのハイブリダイゼーションを可能にし、顕著にミスマッチしたDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設定される条件を指す。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、主として、温度、イオン強度、およびホルムアミドなどの変性剤濃度により決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度ストリンジент条件」の例には、65～68 °Cでの0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、または42 °Cでの0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、および50 %ホルムアミドがある。Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989); およびAnderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach, 第4章, IRL Press Limited (Oxford, England). Limited, Oxford, Englandを参照されたい。非特異的および/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを低減する目的のために、他の試剤をハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液に含ませることができる。例には、他の適切な試剤も用いることができるが、0.1 %ウシ血清アルブミン、0.1 %ポリビニル-ピロリドン、0.1 %ピロリン酸ナトリウム、0.1 %ドデシル硫酸ナトリウム(NaDodSO<sub>4</sub>またはSDS)、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA (または別の非相補的DNA)、および硫酸デキストランがある。これらの添加物の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を及ぼすことなく変更することができる。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH 6.8～7.4で実施される。しかしながら、典型的なイオン強度条件では、ハイブリダイゼーションの割合はpHにほとんど依存しない。Anderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach, 第4章, IRL Press Limited (Oxford, England)を参照されたい。

#### 【0184】

DNA二本鎖の安定性に影響を及ぼす要因には、塩基組成、長さ、および塩基対ミスマッチ度が含まれる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変量が適合するように、また異なる配列関連度のDNAがハイブリッド形成可能になるように当業者によって調節することができる。完全にマッチしたDNA二本鎖の融解温度は、以下の式により推定することができる：

$$T_m(^\circ\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 600/N - 0.72(\% \text{ホルムアミド})$$

式中、Nは、形成された二本鎖の長さであり、[Na<sup>+</sup>]は、ハイブリダイゼーションまたは洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G + Cは、ハイブリッド中の(グアニン+シトシン)塩基のパーセントである。マッチが不完全なハイブリッド鎖については、1 %のミスマッチそれぞれにつき融解温度が約1 °C低下する。

#### 【0185】

「中等度ストリンジент条件」という用語は、「高度ストリンジент条件」下で生じ得るものよりも、塩基対ミスマッチ度が高いDNA二本鎖が形成し得る条件を指す。典型的な「中等度ストリンジент条件」の例は、50～65 °Cでの0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、または37～50 °Cでの0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、および20 %ホルムアミドである。例として、0.015 Mナトリウムイオン中で50 °Cの「中等度ストリンジент」条件で

は、約 21% のミスマッチが許容される。

【0186】

約 20 nt までのオリゴヌクレオチドプローブについての 1 M NaCl \* 中における融解温度の良好な推定値は以下の式から得られる：

$$T_m = AT \text{塩基対あたり } 2 + G - C \text{塩基対あたり } 4$$

\* 6 X クエン酸ナトリウム塩 (SSC) 中のナトリウムイオン濃度は 1 M である。Suggs et al., Developmental Biology Using Purified Genes, p. 683, Brown and Fox (eds.) (1981) を参照されたい。

【0187】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェント洗浄条件は、通常、6 X SSC、0.1% SDS 中で、オリゴヌクレオチドの  $T_m$  より 0 ~ 5 低い温度である。

【0188】

核酸配列の相違によって、配列番号 2 または配列番号 3 のアミノ酸配列に対する、アミノ酸配列の保存的および / または非保存的改変がもたらされ得る。本発明はまた、前述の DNA 配列の何れか 1 つに対応するか、またはそれとストリンジェント条件下でハイブリダイズする単離および / または精製 DNA も対象とする。

【0189】

本明細書に記載するリガンド結合分子または結合ユニットなどの本発明のポリペプチドの全部または一部をコードする核酸分子は、限定されるものではないが、化学合成、cDNA またはゲノムライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリーのスクリーニング、および / または cDNA またはゲノム DNA の PCR 増幅を含む、種々の方法で作製することができる。このような DNA を単離するために有用なこれらの方法および他の方法は、例えば、Sambrook, et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Ausubel, et al. 編, "Current Protocols in Molecular Biology," Current Protocols Press (1994), および Berger and Kimmel, "Methods in Enzymology: Guide To Molecular Cloning Techniques," vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1987) に示されている。好ましい核酸配列は、ヒト、ラット、およびマウスなどの哺乳動物の配列である。

【0190】

核酸分子の化学合成は、Engels, et al., Angew. Chem. Intl. Ed., 28: 716 - 734 (1989) によって示されるものなど、当技術分野で周知の方法を用いて達成することができる。これらの方法には、とりわけ、核酸合成のホスホトリエステル、ホスホラミダイト、および H - ホスホネートの方法が含まれる。約 100 ヌクレオチド長よりも大きい核酸は、各フラグメントが最大約 100 ヌクレオチド長であるいくつかのフラグメントとして合成することができる。次いで、以下に記載するように、これらのフラグメントを互いに連結して目的の完全長核酸を形成させる。好ましい方法は、標準ホスホラミダイト化学を用いる、ポリマー支持合成である。

【0191】

「ベクター」という用語は、多くの場合、プラスミドまたはウイルス DNA もしくは RNA 系に由来するか、あるいはその形態である、核酸分子の増幅、複製、および / または発現のビヒクルを指し、ここで、プラスミドまたはウイルス DNA もしくは RNA は、細菌、酵母、植物、無脊椎動物、および / または哺乳動物の宿主細胞など選択された宿主細胞中で機能的である。ベクターは、宿主細胞のゲノム DNA とは別個に存続することも、またはゲノム DNA に全体もしくは一部が組み込まれることもある。ベクターは、それが適合するいかなる宿主細胞でも機能的であるように必要なエレメントをすべて含有するこ

10

20

30

40

50

とになる。そのようなエレメントは以下に示される。

【0192】

ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする核酸が単離された場合、それは、適切な宿主細胞中で、遺伝子のコピー数を増加させかつ／もしくはコード化ポリペプチドを発現させるために、ならびに／または標的生物中で細胞を形質転換させるために (in vivoでポリペプチドを発現させるために)、好ましくは増幅および／または発現ベクターに挿入される。数多くの市販ベクターが適切であるが、「注文仕様の」ベクターも同様に用いることができる。ベクターは、特定の宿主細胞または宿主組織で機能的であるように (すなわち、複製および／または発現のために) 選択される。ポリペプチドまたはそのフラグメントは、原核生物および／または真核生物の宿主細胞、例えば、酵母、昆虫 (バキュロウイルス系)、植物、および哺乳動物の細胞で増幅／発現させることができる。宿主細胞の選択は、ポリペプチドまたはそのフラグメントがグリコシル化されるか否かに少なくとも一部依存することになる。その場合は、酵母、昆虫、または哺乳動物宿主細胞が好ましい；酵母細胞および哺乳動物細胞は、糖鎖付加部位がアミノ酸配列上に存在すると、ポリペプチドをグリコシル化する。

10

【0193】

典型的には、宿主細胞のいずれにおいても用いられるベクターは、5' フランキング配列およびエンハンサー、プロモーター、複製エレメントの起点、転写終結エレメント、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含有する完全なイントロン配列、シグナルペプチド配列、リボソーム結合部位エレメント、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、および選択可能マーカーエレメントなどの他の調節エレメントを含有する。任意選択で、ベクターは、「タグ」配列、すなわち、ポリHis (ヘキサHisなど) または別の小さな免疫原性配列をコードする、コード配列の5' もしくは3' 末端に位置するオリゴヌクレオチド配列を含有することができる。このタグは、タンパク質と共に発現され、宿主細胞からポリペプチドを精製するための親和性タグとして役立ち得る。任意選択で、次いで、タグは、選択されたペプチダーゼを用いるなどの種々の手段によって、精製ポリペプチドから除去することができる。

20

【0194】

ベクター／発現コンストラクトは、任意選択で、5' フランキング配列、複製起点、転写終結配列、選択可能マーカー配列、リボソーム結合部位、シグナル配列、および1つまたは複数のイントロン配列などのエレメントを含有することができる。5' フランキング配列は、同種 (すなわち、宿主細胞と同じ種および／または系統)、異種 (すなわち、宿主細胞の種または系統以外の種由来)、ハイブリッド (すなわち、2つ以上の供給源に由来する5' フランキング配列の組合せ)、合成であってもよく、天然ポリペプチド5' フランキング配列であってもよい。そのため、5' フランキング配列の供給源は、5' フランキング配列が宿主細胞機構中で機能的でありかつその機構によって活性化され得るならば、任意の単細胞原核生物もしくは真核生物、任意の脊椎生物もしくは無脊椎動物、または任意の植物であってもよい。

30

【0195】

転写終結エレメントは、典型的には、ポリペプチドコード配列末端の3' 側に位置し、ポリペプチドの転写を終結させる役目をする。通常、原核細胞における転写終結エレメントは、ポリT配列が後続するG-Cリッチフラグメントである。このようなエレメントは、ライブラリーからクローニングすること、ベクターの一部として商業的に購入すること、および容易に合成することが可能である。

40

【0196】

選択可能マーカー遺伝子は、選択培養培地における宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択可能マーカー遺伝子は、(a) 抗生物質または他の毒素、例えば原核宿主細胞についてのアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシンに抵抗性を付与するタンパク質、(b) 細胞の栄養要求性の欠乏を補完するタンパク質；または(c) 合成培地から入手可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードす

50

る。

【0197】

シャイン・ダルガーノ配列（原核生物）またはコザック配列（真核生物）と一般に呼ばれるリボソーム結合エレメントが、mRNAの翻訳開始には必要である。このエレメントは、典型的には、プロモーターの3'側に位置し、合成されるポリペプチドのコード配列の5'側に位置する。シャイン・ダルガーノ配列は多様であるが、典型的には、ポリプリン（すなわち、高いAG含量を有する）である。多くのシャイン・ダルガーノ配列が同定されており、そのそれぞれは上記に示す方法を用いて容易に合成することができる。

【0198】

上記に示すエレメントのすべておよび本発明で有用な他のエレメントは、当業者に周知であり、例えば、Sambrook, et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) および Berger, et al. 編, "Guide To Molecular Cloning Techniques," Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1987) に記載されている。

【0199】

組換えポリペプチドが分泌される、本発明の実施形態については、それが合成される細胞からの分泌を指示するためにシグナル配列が含まれることが好ましい。典型的には、シグナル配列をコードするポリヌクレオチドは、コード領域の5'末端に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、それらのいずれも、標的細胞または種で機能的であれば、導入遺伝子と共に用いることができる。

【0200】

多くの場合、遺伝子転写は、ベクター上に1つまたは複数のイントロンが存在すると増大する。イントロンは、特に、導入遺伝子がゲノムDNA配列の完全長またはフラグメントである場合、天然に存在するものでよい。イントロンは、導入遺伝子に対しておよび/または遺伝子が挿入されるトランスジェニック哺乳動物に対して同種であっても異種であってもよい。イントロンは効果的であるように転写されなければならないので、プロモーターおよび導入遺伝子に対するイントロンの位置は重要である。イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側であり、ポリA転写終結配列の5'側である。cDNA導入遺伝子の場合、イントロンは、導入遺伝子コード配列の一方側または他方側（すなわち、5'側または3'側）に置かれる。任意のウイルス、原核生物、および真核生物（植物または動物）を含む、任意の供給源に由来するいかなるイントロンも、それが挿入される宿主細胞に適合すれば、ポリペプチドを発現するために用いることができる。合成イントロンも本明細書に含まれる。任意選択で、2つ以上のイントロンをベクターに用いることができる。

【0201】

組換え発現のための例示的なベクターは、細菌、昆虫、および哺乳動物の宿主細胞に適合するものである。そのようなベクターとしては、とりわけ、pCRII (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), およびpETL (BlueBacII; Invitrogen) が挙げられる。

【0202】

ベクターを構築し、核酸をベクターの適切な部位に挿入した後、完成したベクターを、増幅および/またはポリペプチド発現に適した宿主細胞に挿入することができる。一般に用いられるものとしては、原核細胞、例えばグラム陰性菌またはグラム陽性菌、すなわち大腸菌 (E. coli)、バチルス (Bacillus)、ストレプトミセス (Streptomyces)、サッカロミセス (Saccharomyces)、サルモネラ (Salmonella) 等の任意の菌株；真核細胞、例えばCHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞；ヒト腎臓293細胞；COS-7細胞；昆虫細胞、例えばSf4、Sf5

10

20

30

40

50

、S f 9、およびS f 2 1、ならびにH i g h 5（すべてI n v i t r o g e n C o m p a n y , S a n D i e g o , C a l i f . 由来）；植物細胞、ならびに種々の酵母細胞、例えばサッカロミセス属（S a c c h a r o m y c e s ）およびピチア属（P i c h i a ）が挙げられる。細菌、酵母、真菌、単子葉植物および双子葉植物、植物細胞、および動物などの任意の生物に由来する、形質転換またはトランスフェクト可能な任意の細胞または細胞株が適切である。

#### 【0203】

選択された宿主細胞へのベクターの挿入（「形質転換」または「トランスフェクション」とも呼ばれる）は、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、またはD E A E デキストラン法のような方法を用いて達成することができる。選択される方法は、用いられる宿主細胞のタイプに一部依存することになる。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、S a m b r o o k e t a l . 前出、に示されている。

10

#### 【0204】

ベクターを含有する宿主細胞（すなわち、形質転換またはトランスフェクトされた）は、当業者に周知の標準培地を用いて培養することができる。培地は、通常、細胞の増殖および生存に必要な栄養素をすべて含有する。大腸菌（E . c o l i ）細胞の培養に適した培地は、例えば、L u r i a B r o t h （L B ）および／またはT e r r i f i c B r o t h （T B ）である。真核細胞の培養に適した培地は、R P M I 1 6 4 0 、M E M 、D M E M であり、これらのすべてに、特定の細胞株の培養に必要とされる血清および／または増殖因子を添加することができる。昆虫培養に適した培地は、必要に応じて、イーストレイト（y e a s t o l a t e ）、ラクトアルブミン加水分解物、および／またはウシ胎仔血清を添加されたグレース培地である。

20

#### 【0205】

典型的には、抗生物質または形質転換細胞のみの選択的な増殖に有用な他の化合物が培地にサプリメントとして加えられる。用いられる化合物は、宿主細胞を形質転換したプラスミド上に存在する選択可能マーカーエレメントにより決定されることになる。例えば、選択可能マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培地に加えられた化合物はカナマイシンになる。

#### 【0206】

宿主細胞で産生されるポリペプチドの量は、当技術分野で公知の標準的方法を用いて評価することができる。そのような方法としては、限定されるものではないが、ウエスタンブロット解析、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、H P L C 分離、免疫沈降、および／または結合アッセイが挙げられる。

30

#### 【0207】

ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計されている場合、大多数のポリペプチドは、おそらく細胞培養培地中に見出されることになる。しかしながら、ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合は、ポリペプチドは、細胞質中（真核生物、グラム陽性菌、および昆虫の宿主細胞の場合）、または周辺質中（グラム陰性菌の宿主細胞の場合）に存在する。

40

#### 【0208】

細胞内ポリペプチドの場合は、宿主細胞を、機械的または浸透圧的に最初破壊して細胞質含有物を緩衝液中に放出させる。次いで、ポリペプチドをこの溶液から単離する。

#### 【0209】

組換えポリペプチドの長期高収率産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、目的のポリペプチドを安定に発現する細胞株を、ウイルスの複製起点および／または内因性発現エレメントおよび同じベクター上もしくは別個のベクター上にある選択可能マーカー遺伝子を含有し得る発現ベクターを用いて形質転換することができる。ベクターの導入後、選択培地に切り替える前に、栄養強化培地中で1～2日間、細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することであり、それが存在

50

すると、導入配列の発現に成功した細胞の増殖および回収が可能になる。安定して形質転換された細胞の耐性クローンは、細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖させることができる。次いで、そのような細胞中で実質的に濃縮された細胞株を単離して、安定な細胞株を提供することができる。

#### 【0210】

本発明の組換えポリペプチドの高収率生産に特に好ましい方法は、米国特許第4,889,803号明細書に記載されているように、漸増させたメトトレキセートレベルを使用することによる、DHFR欠損CHO細胞におけるジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の増幅を使用することによるものである。得られるポリペプチドは、グリコシル化された形態であってもよい。

10

#### 【0211】

溶液からのポリペプチドの精製は、種々の技術を用いて達成することができる。ポリペプチドが、そのカルボキシル末端またはアミノ末端の何れかにヘキサヒスチジンまたは他の小ペプチドなどのタグを含有するように合成された場合、ポリペプチドは、基本的には、タグに対してまたはポリペプチドに対してカラムマトリックスが高親和性を有する(すなわち、ポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体)親和性カラムに直接溶液を通すことによって1段階過程で精製することができる。例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性をもって結合するため、ニッケルの親和性カラム(Qiagenニッケルカラムなど)を、Hisタグ付きポリペプチドの精製に用いることができる。(例えば、Ausubel, et al., eds., "Current Protocols In Molecular Biology," Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993)を参照のこと)。

20

#### 【0212】

強い親和性その受容体に対するリガンドにより、リガンド結合分子の親和性精製および、相補的結合相手を含む親和性マトリックスを用いるリガンド結合分子が可能になる。例えば、天然の結合相手(例えば、リガンド結合分子を精製する場合、それに親和性を有するリガンド)または標準的手法(例えば、マウス、ウサギ、または他の動物を適切なポリペプチドで免疫処置すること)を用いて作製された抗体の何れかを用いる親和性クロマトグラフィーを使用することができる。本発明のペプチドはそのような抗体を作製するために用いることができる。公知の抗体または公知の増殖因子受容体に対する抗体は、それらが標的リガンド結合分子とエピトープを共有する場合に用いることができる。

30

#### 【0213】

さらに、精製についての他の周知の手法を用いることができる。そのような手法としては、限定されるものではないが、イオン交換クロマトグラフィー、分子篩クロマトグラフィー、HPLC、ゲル溶出と組み合わせた天然ゲル電気泳動、および調製用等電点電気泳動("Isoprime" machine/technique, Hoefer Scientific)が挙げられる。任意選択で、これらの技術を2つ以上組み合わせて純度を高めることができる。精製についての好ましい方法としては、調製用等電点電気泳動と組み合わせたポリヒスチジンタギングおよびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる。

40

#### 【0214】

細菌の細胞膜周辺腔または真核細胞の細胞質、プロセッシングされたポリペプチドがそのような複合体を形成している場合には封入体(細菌)を含む、周辺質または細胞質の含有物の中に見出されるポリペプチドは、当業者に公知の任意の標準的技術を用いて、宿主細胞から抽出することができる。例えば、宿主細胞を溶解させて、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および/または超音波処理により、周辺質の含有物を放出させることができる。次いで、ホモジネートを遠心分離することができる。

#### 【0215】

ポリペプチドが周辺質において封入体を形成した場合、封入体は、多くの場合、内側お

50

よび/または外側細胞膜に結合することができ、そのため、遠心分離後には主としてペレット物質中に見出されることになる。次いで、ペレット物質をグアニジンまたは尿素などのカオトロピック剤で処理して、封入体を放出させ、粉々に分解し、可溶化することができる。次いで、可溶化したポリペプチドをゲル電気泳動、免疫沈降等を用いて分析することができる。ポリペプチドを単離することが所望される場合には、以下に示すものおよび [Marston, et al., Meth. Enz., 182: 264 - 275 (1990).] にあるものなど標準的方法を用いて、単離を達成することができる。

#### 【0216】

##### 遺伝子治療

一部の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子治療を容易にするために追加の配列をさらに含む。一実施形態では、本明細書に記載するリガンド結合分子をコードする「裸の」導入遺伝子（すなわち、トランスフェクションを容易にするためのウイルス、リポソーム、または他のベクターを伴わない導入遺伝子）が、遺伝子治療のために用いられる。

#### 【0217】

ベクターもまた、被験体の細胞に本発明のリガンド結合分子を *in vivo* で発現させる形態で、リガンド結合ポリペプチドまたは分子をコードするポリヌクレオチドを血管新生の阻害を必要とする被験体に導入する、「遺伝子治療」の治療レジメンに有用である。両方とも参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2002/0151680号明細書および国際公開第01/62942号パンフレットに記載されている遺伝子治療の態様もまた、本明細書に適用可能である。

#### 【0218】

本明細書に記載するリガンド結合分子をコードするポリヌクレオチドを宿主に導入するために、任意の適切なベクターを用いることができる。文献に記載されている例示的なベクターとしては、以下に限定されるものではないが、レンチウイルスベクター (Kim et al., J. Virol., 72(1): 811 - 816, 1998; Kingman & Johnson, Scrip Magazine, 1998年10月, pp. 43 - 46); アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター (米国特許第5,474,935号明細書; 同第5,139,941号明細書; 同第5,622,856号明細書; 同第5,658,776号明細書; 同第5,773,289号明細書; 同第5,789,390号明細書; 同第5,834,441号明細書; 同第5,863,541号明細書; 同第5,851,521号明細書; 同第5,252,479号明細書; Gnatenko et al., J. Invest. Med., 45: 87 - 98, 1997); アデノウイルス (AV) ベクター (米国特許第5,792,453号明細書; 同第5,824,544号明細書; 同第5,707,618号明細書; 同第5,693,509号明細書; 同第5,670,488号明細書; 同第5,585,362号明細書; Quantin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2581 - 2584, 1992; Stratford Perricadet et al., J. Clin. Invest., 90: 626 - 630, 1992; および Rosenfeld et al., Cell, 68: 143 - 155, 1992); アデノウイルスアデノ随伴ウイルスキメラ (米国特許第5,856,152号明細書) またはワクチニアウイルスまたはヘルペスウイルス (米国特許第5,879,934号明細書; 同第5,849,571号明細書; 同第5,830,727号明細書; 同第5,661,033号明細書; 同第5,328,688号明細書); リポフェクチン媒介遺伝子移入 (BRL); リポソームベクター (米国特許第5,631,237号明細書およびセンダイウイルスタンパク質を含むリポソーム); ならびにそれらの組合せを含む複製欠損レトロウイルスベクターが挙げられる。前述の文献はすべて、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0219】

企図される他の非ウイルス性送達機構としては、以下に限定されるものではないが、リン酸カルシウム沈殿 (Graham and Van Der Eb, Virology

10

20

30

40

50



, 52:456 - 467, 1973; Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7:2745 - 2752, 1987; Rippe et al., Mol. Cell Biol., 10:689 - 695, 1990) DEAE - デキストラン (Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188 - 1190, 1985)、エレクトロポレーション (Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716 - 718, 1986; Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161 - 7165, 1984)、直接マイクロインジェクション (Harland and Weintraub, J. Cell Biol., 101:1094 - 1099, 1985.)、DNA 負荷リボソーム (Nicolaou and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185 - 190, 1982; Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348 - 3352, 1979; Felgner, Sci. Am. 276(6):102 - 6, 1997; Felgner, Hum. Gene Ther. 7(15):1791 - 3, 1996)、細胞超音波処理 (Fechheimer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463 - 8467, 1987)、高速マイクロプロジェクトルを用いる遺伝子打ち込み (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9568 - 9572, 1990)、および受容体媒介トランスフェクション (Wu and Wu, J. Biol. Chem., 262:4429 - 4432, 1987; Wu and Wu, Biochemistry, 27:887 - 892, 1988; Wu and Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159 - 167, 1993) が挙げられる。

#### 【0220】

発現コンストラクト (または、実際には本明細書に記載するリガンド結合分子) は、リボソーム中に封入され得る。リボソームは、リン脂質二重層膜および内側の水性媒体を特徴とする小胞構造である。多重膜リボソームは水性媒体により分離された複数の脂質層を有する。リン脂質が過剰量の水溶液に懸濁されると、リボソームが自発的に形成される。脂質成分は自己再配列を起こした後、閉鎖構造を形成し、脂質二重層の間に水および溶解した溶質を封入する (Ghosh and Bachhawat, In: Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands, Wu G, Wu C 編, New York: Marcel Dekker, pp. 87 - 104, 1991)。陽イオン性リボソームに DNA を添加すると、リボソームから光学的に複屈折性の液体 - 結晶凝縮小滴への形態的な移行が起こる (Radler et al., Science, 275(5301):810 - 4, 1997)。これらの DNA - 脂質複合体は、遺伝子治療および送達に使用するための有望な非ウイルスベクターである。

#### 【0221】

in vitro における、外来性 DNA のリボソーム媒介核酸送達および発現は成功している。また、「リポフェクション」技術を含む種々の商業的アプローチも、本発明では企図される。本発明の特定の実施形態では、リボソームは血球凝集ウイルス (HVJ) と複合体を形成することができる。これにより、細胞膜との融合が容易になり、リボソームに被包された DNA の細胞内移行が促進されることが示されている (Kaneda et al., Science, 243:375 - 378, 1989)。他の実施形態では、リボソームは、核の非ヒストン性染色体タンパク質 (HMG - 1) と複合体を形成させても、またはそれと一緒に用いてもよい (Kato et al., J. Biol. Chem., 266:3361 - 3364, 1991)。さらにさらなる実施形態では、リボソームは、HVJ および HMG - 1 の両方と複合体を形成させても、またはそれらと一緒に用いてもよい。そのような発現コンストラクトが、in vitro および in vivo において、核酸の移入および発現に成功裡に用いられている点から、それらは本発明に適用可能である。

## 【0222】

裸のDNA発現コンストラクトを細胞に移入するための本発明の別の実施形態には、粒子打ち込みが含まれ得る。この方法は、DNA被覆マイクロプロジェクティルを高速に加速して、それが細胞膜を貫通し、細胞を殺傷することなく細胞内に移行することを可能にする、その能力に依存する。(Klein et al., Nature, 327: 70 - 73, 1987)。小粒子を加速するためのいくつかの装置が開発されている。そのような1つの装置は、それによって輸送力が与えられる電流を発生させるための高電圧に依存する(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 9568 - 9572, 1990)。用いられるマイクロプロジェクティルは、タンゲステンまたは金ビーズなどの生物学的に不活性な物質からなっている。

10

## 【0223】

ウィルスベクターを用いる実施形態では、好ましいポリヌクレオチドはさらに、上記に記載する適切なプロモーターおよびポリアデニル化配列を含む。さらに、これらの実施形態では、ポリヌクレオチドがさらに、本発明のポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結されたベクターポリヌクレオチド配列(例えば、アデノウイルスポリヌクレオチド配列)を含むことが容易に明らかであろう。

## 【0224】

## リガンド結合分子の治療用途

本明細書に記載するリガンド結合ポリペプチドおよび分子、ならびにそれらをコードするポリヌクレオチドおよびベクターは、VEGFR-2またはVEGFR-3を通してシグナル伝達を誘導する内皮増殖因子によって媒介される細胞プロセスを阻害するために有用であり、これらの受容体上のそのような増殖因子の作用により刺激される異常な血管新生および/またはリンパ脈管新生に関連した障害(例えば、種々の眼障害および癌)の予防または治療に対する適応を有する。本明細書に記載するリガンド結合ポリペプチドおよび分子、ならびにそれらをコードするポリヌクレオチドおよびベクターは、VEGF-Cおよび/またはVEGF-Dの除去、阻害、または低減により改善、寛解、抑制、または予防される症状のいかなる疾患の治療または予防のためにも治療上有用である。VEGF-Cおよび/またはVEGF-D(具体的には少なくともVEGF-C)の阻害または低減によって改善される具体的な症状の非網羅的なリストとしては、過度の血管内皮細胞増殖、血管透過性、浮腫、または炎症を特徴とする臨床症状、例えば損傷、脳卒中、または腫瘍に関連した脳浮腫；関節リウマチを含む、乾癬または関節炎などの炎症性障害に関連した浮腫；喘息；熱傷に関連した全身性浮腫；腫瘍、炎症、または外傷に関連した腹水および胸水；慢性的な気道炎症；毛細血管漏出症候群；敗血症；タンパク質漏出の増大に関連した腎臓病；および加齢黄斑変性症および糖尿病性網膜症などの眼疾患が挙げられる。

20

30

## 【0225】

簡潔さのために、本方法の多くがリガンド結合分子を含む組成物に関して以下に記載されるが、本明細書に記載するコンストラクトのいずれについても(リガンド結合ポリペプチド、分子、およびコンストラクト、ならびにそれらをコードするポリヌクレオチド、二量体および他の多量体等)本発明の実施が企図されることを理解されたい。

## 【0226】

例示的な治療用途は、それを必要とする被験体において血管新生を阻害する方法であって、本明細書に記載するリガンド結合分子を含む組成物を、被験体の血管新生を阻害するために有効な量で被験体に投与することを含む方法である。一部の実施形態では、血管新生は、脈絡膜または網膜の血管新生を含む。一部の実施形態では、血管新生は、悪性癌および他の腫瘍で生じる腫瘍血管新生である。

40

## 【0227】

別の態様では、血管新生に関連した眼障害のための予防または治療の方法であって、本明細書に記載するリガンド結合分子を含む組成物を、眼障害の予防または治療を必要とする被験体に投与することを含む方法を本明細書に記載する。

## 【0228】

50

別の態様では、網膜浮腫をもたらす眼障害のための予防または治療の方法であって、本明細書に記載するリガンド結合分子を含む組成物を、眼障害または眼疾患の予防または治療を必要とする被験体に投与することを含む方法を本明細書に記載する。

【0229】

治療することができる眼障害の例としては、脈絡膜血管新生、糖尿病性黄斑浮腫、加齢黄斑変性症、増殖性糖尿病性網膜症、網膜静脈閉塞、および角膜血管新生/移植拒絶反応が挙げられる。好ましくは、用いられるリガンド結合分子の量は、VEGFR-3（および好ましくはVEGFR-2も）へのVEGF-Cおよび/またはVEGF-Dリガンドの結合、またはVEGFR-3（および好ましくはVEGFR-2も）に対するVEGF-Cおよび/またはVEGF-Dの刺激作用を阻害するために有効である。

10

【0230】

一実施形態では、眼障害は加齢黄斑変性症である。加齢黄斑変性症の例には、非新生血管（「ドライ」としても知られている）黄斑変性症および新生血管（「ウェット」としても知られている）黄斑変性症がある。好ましい実施形態では、眼障害はウェット加齢黄斑変性症である。ウェット加齢黄斑変性症の治療または予防はまた、脈絡膜血管新生または色素上皮剥離の治療または予防を包含する。

【0231】

一実施形態では、眼障害はポリープ状脈絡膜血管症である。ポリープ状脈絡膜血管症は、動脈瘤の膨隆または外部突出をもたらす、内部脈絡膜脈管ネットワークの脈管に由来する病変を特徴とする（Ciardella et al. (2004) Surv Ophthalmol. 49:25-37）。

20

【0232】

一実施形態では、眼障害は脈絡膜血管新生に関連した症状である。脈絡膜血管新生に関連した症状の例としては、変性、炎症性、外傷性、特発性の症状が挙げられる。脈絡膜血管新生に関連した変性障害の治療または予防はまた、遺伝性変性障害の治療および予防を包含する。遺伝性変性障害の例としては、卵黄様黄斑ジストロフィー、黄色斑眼底、および視神経円板ドルーゼが挙げられる。脈絡膜血管新生に関連した変性症状の例としては、近視性変性または網膜色素線条が挙げられる。脈絡膜血管新生に関連した炎症性障害の治療または予防はまた、眼ヒストプラズマ症候群、多巣性脈絡膜炎、蛇行性脈絡膜炎、トキシソプラズマ症、トキシカラ症、風疹、フォクト・小柳・原田症候群、ペーチェット病、または交感性眼炎の治療または予防を包含する。脈絡膜血管新生に関連した外傷性障害の治療または予防はまた、脈絡膜破裂または激しい光凝固により引き起こされる外傷性症状の治療または予防を包含する。

30

【0233】

一実施形態では、眼障害は高血圧性網膜症である。

【0234】

一実施形態では、眼障害は糖尿病性網膜症である。糖尿病性網膜症は、非増殖性糖尿病性網膜症であることも、増殖性糖尿病性網膜症であることもある非増殖性糖尿病性網膜症の例としては、黄斑浮腫および黄斑虚血が挙げられる。

【0235】

一実施形態では、眼障害は鎌状赤血球網膜症である。

40

【0236】

一実施形態では、眼障害は、末梢網膜血管新生に関連した症状である。末梢網膜血管新生に関連した症状の例としては、虚血性血管疾患、虚血を伴い得る炎症性疾患、色素失調症、色素性網膜炎、網膜分離症、または慢性網膜剥離が挙げられる。

【0237】

虚血性血管疾患の例としては、増殖性糖尿病性網膜症、網膜静脈分枝閉塞症、網膜細動脈分枝閉塞症、頸動脈海綿洞瘻、鎌状異常ヘモグロビン症、非鎌状異常ヘモグロビン症、IRVAN症候群（特発性網膜血管炎、動脈瘤、および視神経網膜炎を特徴とする網膜血管炎性障害）、網膜塞栓症、未熟児網膜症、家族性滲出性硝子体網膜症、過粘稠度症候群

50

、大動脈弓症候群、またはイールス病が挙げられる。鎌状異常ヘモグロビン症の例としては、SS異常ヘモグロビン症およびSC異常ヘモグロビン症が挙げられる。非鎌状異常ヘモグロビン症の例としては、AC異常ヘモグロビン症およびAS異常ヘモグロビン症が挙げられる。過粘稠度症候群の例としては、白血病、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、多発性骨髄腫、赤血球増加症、または骨髄増殖性疾患が挙げられる。

【0238】

虚血を伴い得る炎症性疾患の治療または予防はまた、全身性疾患に関連した網膜血管炎、感染病原体に関連した網膜血管炎、ぶどう膜炎、またはバードショット網膜症 (birdshot retinopathy) の治療または予防を包含する。全身性疾患の例としては、全身性エリテマトーデス、ベーチェット病、炎症性腸疾患、サルコイドーシス、多発性硬化症、ヴェグナー肉芽腫症、および結節性多発動脈炎が挙げられる。感染病原体の例としては、梅毒、結核、ライム病、またはネコひっかき病の病原体である細菌病原体、ヘルペスウイルスなどのウイルス、またはイヌ回虫またはトキソプラズマ・ゴンディ (Toxoplasma gondii) などの寄生生物が挙げられる。ぶどう膜炎の例としては、周辺部ぶどう膜炎またはフックスぶどう膜炎症候群が挙げられる。

10

【0239】

一実施形態では、眼障害は末熟児網膜症である。末熟児網膜症は、発生中の網膜を支持する血管床の血管の異常増殖に起因する場合がある (Pollan C (2009) Neonatal Netw. 28:93-101)。

【0240】

20

一実施形態では、眼障害は静脈閉塞性疾患である。静脈閉塞性疾患の例としては、網膜静脈分枝閉塞症および網膜中心静脈閉塞症が挙げられる。網膜静脈分枝閉塞症は、網膜から血液を排出する血液循環の一部を遮断する場合がある。この遮断により、毛細血管にバックアップ圧力が引き起こされることがあり、それによって出血に加え、液体および他の血液成分の漏出も起こり得る。

【0241】

一実施形態では、眼障害は動脈閉塞性疾患である。動脈閉塞性疾患の例としては、網膜動脈分枝閉塞症、網膜中心動脈閉塞症、または眼虚血症候群が挙げられる。網膜への動脈供給の分枝の1つが閉塞されると、網膜動脈分枝閉塞症 (BRAO) が起こることがある。

30

【0242】

一実施形態では、眼障害は中心性漿液性脈絡網膜症 (CSC) である。一実施形態では、CSCは、中心網膜黄斑における流体の漏出を特徴とする。

【0243】

一実施形態では、眼障害は嚢胞様黄斑浮腫 (CME) である。一実施形態では、CMEは中心網膜または網膜黄斑を冒す。別の実施形態では、CMEは白内障手術の後に生じる。

【0244】

一実施形態では、眼障害は網膜末梢血管拡張症である。一実施形態では、網膜末梢血管拡張症は、網膜脈管の拡張および蛇行ならびに多発性動脈瘤の形成を特徴とする。特発性JXT、レーバー粟粒動脈瘤、およびコーツ病は、3タイプの網膜末梢血管拡張症である。

40

【0245】

一実施形態では、眼障害は動脈細動脈瘤である。

【0246】

一実施形態では、眼障害は網膜血管腫症である。一実施形態では、眼脈管が複数の血管腫を形成すると、網膜血管腫症が生じる。

【0247】

一実施形態では、眼障害は放射線誘発性網膜症 (RIRP) である。一実施形態では、RIRPは、黄斑浮腫ならびに非増殖および増殖性の網膜症などの症候を示すことがある

50

。

## 【0248】

一実施形態では、眼障害は虹彩血管新生である。別の実施形態では、虹彩血管新生は血管新生緑内障の形成をもたらす。別の実施形態では、虹彩血管新生は、糖尿病性網膜症、網膜中心静脈閉塞症、眼虚血症候群、または慢性網膜剥離により引き起こされる。

## 【0249】

一実施形態では、眼障害は新生物である。新生物の例としては、眼瞼腫瘍、結膜腫瘍、脈絡膜腫瘍、虹彩腫瘍、視神経腫瘍、網膜腫瘍、浸潤性眼内腫瘍、または眼窩腫瘍が挙げられる。眼瞼腫瘍の例としては、基底細胞癌、扁平上皮癌、皮脂腺癌、悪性黒色腫、毛細血管腫、水嚢腫、母斑症、または脂漏性角化症が挙げられる。結膜腫瘍の例としては、結膜カポジ肉腫、扁平上皮癌、結膜上皮内新生物、眼球上類皮腫、結膜リンパ腫、黒色腫、瞼裂斑、または翼状片が挙げられる。脈絡膜腫瘍の例としては、脈絡膜母斑、脈絡膜血管腫、転移性脈絡膜腫瘍、脈絡膜骨腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または太田母斑が挙げられる。虹彩腫瘍の例としては、前部ぶどう膜転移、虹彩嚢腫、虹彩黒色細胞腫、虹彩黒色腫、または虹彩真珠嚢腫が挙げられる。視神経腫瘍の例としては、視神経黒色細胞腫、視神経鞘膜腫、視神経を冒す脈絡膜黒色腫、または視神経症を伴う乳頭周囲転移が挙げられる。網膜腫瘍の例としては、網膜色素上皮(RPE)肥大、RPE腺腫、RPE癌腫、網膜芽細胞腫、RPEの過誤腫、またはフォンヒッペル血管腫が挙げられる。浸潤性眼内腫瘍の例としては、慢性リンパ球性白血病、浸潤性脈絡膜症、または眼内リンパ腫が挙げられる。眼窩腫瘍の例としては、涙腺の腺様嚢胞癌、眼窩の海綿状血管腫、眼窩のリンパ管腫、眼窩粘液嚢腫、眼窩偽腫瘍、眼窩横紋筋肉腫、小児期の眼周囲血管腫、または硬化性眼窩偽腫瘍が挙げられる。

## 【0250】

さらなる態様では、本発明は、眼外傷を治療する方法であって、眼外傷が寛解または改善するように、有効量の本明細書に記載するリガンド結合分子を、それを必要とする被験体に局所投与することを含む方法を特色とする。好ましくは、眼外傷は角膜外傷または結膜外傷であり、この治療方法は、眼外傷に関連した血管新生および炎症を低減する。一部の実施形態では、この方法は、急性および亜急性の角膜外傷または結膜外傷を治療するために有用である。急性角膜外傷は、発生の24時間以内に治療することができ、貫通物体、異物、または化学的外傷もしくは熱傷を原因とする角膜外傷または結膜外傷を含む。亜急性外傷は、外傷後2週間まで治療することができ、上記に記載の外傷および感染性の病因を含み得る。一部の実施形態では、眼外傷は、外傷、例えば、外科的外傷、化学的熱傷、角膜移植、感染性または炎症性疾患を原因とする。

## 【0251】

治療の長さは、外傷によって異なるが、治療期間は、短期間、例えば最大1ヶ月間である場合も、3~6ヶ月の観察期間を含む場合もあり、観察期間の間に再治療が施されることもある。投与には、免疫抑制剤、例えばコルチコステロイド、デキサメタゾン、またはサイクロスポリンAの1つまたは複数などの第2の薬剤が含まれることもある。局所投与には、例えば、眼に適用される点眼剤中のリガンド結合分子の投与、または眼への結膜下注射が含まれる。

## 【0252】

さらなる態様では、眼外傷を治癒させる方法であって、眼外傷を治癒させるように、有効量の本明細書に記載するリガンド結合分子を、それを必要とする被験体に局所投与することを含む方法を本明細書に記載する。

## 【0253】

さらなる態様では、眼外傷に関連した血管新生を低減または寛解する方法であって、眼外傷に関連した血管新生を低減または寛解するように、有効量の本明細書に記載するリガンド結合分子を、それを必要とする被験体に局所投与することを含む方法を本明細書に記載する。

## 【0254】

さらなる態様では、炎症を低減または寛解する方法であって、眼外傷に関連した炎症を低減または寛解するように、有効量の本明細書に記載するリガンド結合分子を、それを必要とする被験体に局所投与することを含む方法を本明細書に記載する。

【0255】

さらなる態様では、眼の外傷または感染に関連した血管新生および/炎症のために本発明のリガンド結合分子を投与する方法であって、本明細書に記載するリガンド結合分子を含む点眼剤による局所投与または注射もしくはインプラントによる結膜下投与を含む方法を本明細書に記載する。

【0256】

さらなる態様では、本明細書に記載するリガンド結合分子を含有する、有効量の医薬組成物を被験体に投与することによって（それによって患者の角膜における血管新生および/またはリンパ脈管新生が抑制される）、被験体の角膜移植後の角膜移植片の生存を延長する方法を記載する。

【0257】

用量応答試験により、使用すべき適量のリガンド結合分子を正確に決定することが可能になる。例えば、標的受容体に対するポリペプチドの結合親和性、標的細胞上に存在する受容体の量、予測される希釈容積（例えば、*in vivo*実施形態の場合、患者の体重および血液量）、およびポリペプチドクリアランス速度の測定から、有効量を評価することができる。例えば、公知のVEGF-C抗体の投与に関する既存の文献も、本明細書に記載するリガンド結合分子の投与に関する手引きを提供する。VEGFR-1/VEGFR-2に基づくリガンドトラップであるアフリベルセプト（Regeneron）の投与を記載する文献も、本明細書に記載する治療分子の投与に関する手引きを提供するために用いることができる。

【0258】

一部の実施形態では、硝子体内注射により投与される場合、リガンド結合分子は、1眼当たり約2mg～約4mg（または1眼当たり約1mg～約3mg、または約1mg～約4mg、または約3mg～約4mg、または約1mg～約2mg）の濃度で投与される。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、1眼当たり約1mg、または約2mg、または約3mg、または約4mg、または約5mg、または約6mgの濃度で投与される。リガンド結合分子は、一部の実施形態では、10μl、15μl、20μl、25μl、30μl、35μl、40μl、45μl、50μl、60μl、70μl、80μl、90μl、95μl、または100μlの容量で、上記に記載の濃度の何れかで存在する。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、約2～4mg/50μlの濃度で投与される。

【0259】

本明細書に記載するリガンド結合分子は、血管新生に関連した眼疾患（例えば、糖尿病性網膜症、黄斑変性症）の発症リスクのある被験体の血管新生を予防するために予防的処置として、またはそれを必要とする被験体の眼の血管新生を阻害する目的で眼疾患に罹患した被験体に治療的処置として、純粋に投与することができる。

【0260】

糖尿病性網膜症または黄斑変性症を発症するリスクのある被験体には、50歳を超える被験体；関節リウマチに罹患した被験体、糖尿病の被験体、甲状腺異常の被験体、喘息の被験体、白内障の被験体、緑内障の被験体、ループスの被験体、高血圧の被験体、および網膜剥離の被験体が含まれる。他のリスクファクターとしては、遺伝、食餌、喫煙、および日光曝露が挙げられる。

【0261】

一部の実施形態では、それを必要とする被験体に対する治療レジメンを選択する方法であって、網膜血管新生に関連した症候の1つまたは複数について被験体をスクリーニングすること、および本明細書に記載するリガンド結合分子を含む組成物の投与について被験体に対して処方することを含む方法を本明細書に記載する。別の実施形態では、網膜血管

新生に関連した眼障害で冒された被験体を治療する方法であって、眼障害の1つまたは複数の症候を有するとして被験体を同定すること、およびリガンド結合分子を含む組成物を被験体に投与することを含む方法を本明細書に記載する。網膜血管新生に関連した眼障害に関連した症候としては、以下に限定されるものではないが、霧視および時間経過に伴うゆっくりした視力喪失、眼の内部に漂う小粒子、視野の影または欠損、乱視、および夜盲症が挙げられる。

【0262】

一部の実施形態では、本明細書に記載する方法は、ドライアイ疾患の治療のための標準治療レジメンを処方（または投与）することをさらに含む。本明細書に記載する方法の文脈では、「標準治療」とは、あるタイプの病気と診断された特定のタイプの患者に対する、臨床医により一般に承認されている治療を指す。糖尿病性網膜症および黄斑変性症の場合、例えば、本発明の一態様は、網膜血管新生を阻害する、本明細書に記載するリガンド結合分子との併用療法により、標準治療を改善することである。糖尿病性網膜症および黄斑変性症のための例示的な標準治療としては、以下に限定されるものではないが、眼瞼衛生、局所用抗生物質（以下に限定されるものではないが、エリスロマイシンまたはバシトラシン軟膏剤が含まれる）、経口テトラサイクリン（テトラサイクリン、ドキシサイクリン、またはミノサイクリン）、抗炎症性化合物（以下に限定されるものではないが、シクロスポリンが含まれる）、コルチコステロイド、レーザー光凝固術、および光線力学療法が挙げられる。

【0263】

また、眼障害の治療のための標準治療レジメンに対して反応性の低下した、網膜血管新生に関連した眼障害の哺乳動物被験体を治療する方法であって、リガンド結合分子を、その疾患を治療するために有効な量で被験体に投与することを含む方法も企図される。

【0264】

哺乳動物被験体は、好ましくはヒト被験体である。他の哺乳動物被験体、特にヒトにおける治療効力を実証するためのモデルとして慣用的に用いられている哺乳動物（例えば、霊長類、ブタ、イヌ、またはウサギ）における本発明の方法の実施も企図される。

【0265】

併用療法および追加の活性薬剤

本発明の併用療法および予防的な実施形態には、製剤および方法が含まれる。本明細書に記載するリガンド結合分子の1つまたは複数と併用して投与され得る例示的な化合物としては、以下に限定されるものではないが、下記の表2に示す化合物が挙げられる。

【表 2】

製剤	標的または作用機序	コメント
<b>VEGF-A 阻害剤</b>		
KH902	VEGF-A 阻害剤	すべての VEGF-A アイソフォームおよび PlGF に結合するが、VEGF-C にも-D にも結合しない、VEGFR-1 および VEGFR-2 から得られるリガンド結合ドメインを有する VEGF 受容体-Fc 組換え融合タンパク質
VEGF-A DARPin (AGN-150998)	VEGF-A 阻害剤	VEGF ファミリーの他のメンバーではなく、VEGF-A に選択的に結合するアンキリントタンパク質に由来する。
ESBA1008	VEGF-A に対する単一鎖抗体フラグメント	
ラニズマブ (Lucentis™)	モノクローナル抗体フラグメント (Fab)	ベバシズマブ(Avastin™)と同じ親マウス抗体に由来する
<b>抗ペリサイト(PDGF-B 阻害剤)</b>		
E10030 (Fovista™)	抗 PDGF アプタマー	抗 VEGF-A 療法に対するペリサイト媒介耐性を標的にする。
<b>多重標的キナーゼ阻害剤</b>		
バタラニブ (PTK787/PTK/ZK)	チロシンキナーゼ阻害剤	
AL-39324	チロシンキナーゼ阻害剤	注射可能
パゾパニブ	チロシンキナーゼ阻害剤	VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR-a/b、および cKit の TKI。局所点眼剤の適用。
TG100801	チロシンキナーゼ阻害剤	プロドラッグは、VEGF、PDGF、FGF 受容体、および Src キナーゼファミリーを阻害する。局所投与。
スクアラミン	小分子アミノステロールはカルモデュリンに結合する	カルモデュリンに結合し、VEGF、PDGF、および bFGF の調節を妨げる。
<b>mTOR 経路阻害剤</b>		
シロリムス (DE-109)	mTOR 阻害剤	広範囲に作用する抗増殖および免疫抑制の薬剤。
シロリムス	mTOR 阻害剤	
PF-655 (REDD14P)	RTP801(mTOR 調節因子)に対する合成 siRNA	TSC1-TSC2 阻害複合体を安定化し、酸化ストレス依存性細胞死を増強する、ストレス誘導 mTOR 阻害剤。
パロミド (Palomid)529	小分子 TORC1/TORC2 阻害剤(mTOR 経路)	

10

20

30

40



【表 3】

脈管破壊剤		
ジブレスタット (Zybrestat)	VDA(脈管破壊剤) およびカドヘリン 5 阻害剤	
ホスプレタブリン (Fosbretabulin) (コンプレタスタチ ン A4 ホスフェー ト)	脈管破壊剤(VDA)	
抗炎症剤		
コルチコステロイド		
ポスルデックス (Posurdex)/SK- 0503	コルチコステロイドおよ び VEGF-A 阻害剤	
イルヴィエン (Iluvien)(フルオ シノロンアセトニ ド)	コルチコステロイド (硝子体内挿入)	
IBI-20089	除放射性トリウムシノロン	
補体阻害剤		
LFG316	抗 C5(補体経路)	AMD に関連した炎症を選択的に標的にする
ARC1905	抗 C5 アプタマー	
AL-78898A (POT-4)	抗 C3 環状ペプチド	補体経路の C3 を標的にする。
「他の」抗炎症剤		
ヒュミラ (アダリムマブ)	抗 TNF mAb	
種々の標的薬剤		
iSONEP	抗 S1P mAb	mAb は脂質スフィンゴシン-1-ホスフェートを標的にする
オクリプラスミン	ヒトセリンプロテアーゼ プラスミンの短縮型	症候性硝子体黄斑癒着の治療用に承認されている
ボロシキシマブ	a5b1 インテグリンに 対するキメラ Ab	脈管安定化に関与するフィブロネクチンへの a5b1 インテグリンの結合を遮断する
hI-con1	抗組織因子	エフェクター領域(IgG Fc)に融合した突然変異体 ファクター V11a ドメインで構成されるキメラ IgG 様 ホモ二量体タンパク質。突然変異体 fV11 は、 AMD 病変を含む病的細胞の管腔側に発現される 組織因子に結合し、エフェクター機能を介して hI-con1 標的細胞の免疫破壊を誘発する。
ORA102	標的未知	
遺伝子治療		
rAAV.sFlt-1	可溶性形態の VEGFR-1 のアデノウ イルス遺伝子送達	網膜下送達遺伝子治療。VEGFR-1 リガンドのみ (VEGF-A、VEGF-B、PlGF)を「トラップする」。
adPEDF	色素上皮由来因子 (PEDF)のアデノウ イルス遺伝子送達	PEDF は抗血管新生である(VEGF 誘導の増殖、 EC 遊走および透過性を阻害する)。

10

20

30

40

【表 4】

RetinoStat	アンジオスタチン およびエンドスタチン のレンチウイルス送達	アンジオスタチン(プラスミンのフラグメント)および エンドスタチン(XVIII 型コラーゲンの C 末端フラグ メント)は、血管新生の内因性阻害剤である。
AAV2-sFLT01	可溶性形態の VEGFR-1 のアデノウ ウイルス遺伝子送達	硝子体内送達遺伝子治療。VEGFR-1 リガンドの み(VEGF-A、VEGF-B、PlGF)を「トラップする」。
<b>アンチセンスおよび siRNA</b>		
GS-101	IRS-1 を標的にする アンチセンス	インスリン受容体基質 1 に対するアンチセンスの 局所適用
ベバシラニブ	VEGF を標的にする siRNA	
AGN211745	VEGFR-1 を標的に する siRNA	

10

## 【 0 2 6 6 】

リガンド結合分子は、第 2 の受容体トラップ分子、細胞傷害性薬剤、外科手術、カテーテルデバイス、および放射線を含む、1 つまたは複数の追加の活性化合物または治療と併用して投与することができる。例示的な配合剤には、単一組成物として製剤化されたまたは例えば単位容量パッケージもしくはキットとして別個の組成物と一緒にパッケージされた 2 つ以上の薬剤が含まれる。例示的な併用方法には、投与について、すなわち、2 つ以上の薬剤を同時にまたは一斉にまたはずらして（すなわち、逐次的に）投与するように処方することが含まれる。

20

## 【 0 2 6 7 】

本明細書で使用する「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞の機能を阻害または阻止し、かつ/または細胞の破壊をもたらす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、および  $Re^{186}$ ）、化学療法剤、および細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素的に活性な毒素もしくはそのフラグメントを含むことを意図する。

## 【 0 2 6 8 】

30

「化学療法剤」は癌の治療に有用な化学物質である。化学療法剤の例としては、チオテパおよびシクロホスファミド（シトキサン（登録商標））などのアルキル化剤；ブスルファン、イソブスルファン、およびピボスルファンなどのアルキルスルホネート；ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、およびウレドーパ（uredopa）などのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチロロメラミンを含むエチレンジアミンおよびメチラメラミン（methyldiamine）；クロランブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピシン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソウレア；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラピシン（carabichin）、カルミノマイシン、カルジオリピン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン（detorubicin）、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン（marcellomycin）、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシ

40

50

ン ( *quelamycin* )、ロドルピシン ( *rodorubicin* )、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなどの抗生物質；メトトレキセートおよび 5 - フルオロウラシル ( 5 - FU ) などの代謝拮抗剤；デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸アナログ；フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリンアナログ；アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどのピリミジンアナログ；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤；フロリン酸 ( *frolinic acid* ) などの葉酸補給剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル ( *bestrabucil* )；ピサントレン；エダトラキセート ( *edatraxate* )；デフォファミン ( *defofamine* )；デメコルチン；ジアジコン；エルフォルニチン ( *elfornithine* )；酢酸エリブチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット ( *phenamet* )；ピラルピシン；ポドフィリン酸 ( *podophyllinic acid* )；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK (登録商標)；ラゾキサン；シゾフィラン；スピログルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン ( *gacytosine* )；アラビノシド (「アラ C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン、例えば、バクリタキセル (タキソール (登録商標)、Bristol - Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) およびドセタキセル (登録商標) (タキソテル；Aventis Antony, France)；クロランブシル；ゲムシタビン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金アナログ；ピンブラスチン；白金；エトボシド (VP - 16)；イホスファミド；マイトマイシン C；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルビン；ナベルピン；ノバントロン ( *novantrone* )；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT - 11；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000；ジフルオロメチロールニチン ( *difluoromethylornithine* ) (DMFO)；レチノイン酸；エスペラマイシン；カペシタビン；ならびに上記の何れかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。また、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼを阻害する 4 (5) - イミダゾール、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY 117018、オナプリストン、およびトレミフェン (フェアストン) を含む抗エストロゲン；ならびにフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、リュープロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲン；ならびに上記の何れかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体など、腫瘍へのホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤もこの定義に含まれる。

#### 【 0 2 6 9 】

本明細書で使用する場合、「増殖阻害剤」は、細胞、特に癌細胞の増殖を *in vitro* または *in vivo* の何れかで阻害する化合物または組成物を指す。増殖阻害剤の例としては、G1 停止および M 期停止を誘導する薬剤など、細胞周期進行 (S 期以外の場所で) を遮断する薬剤が挙げられる。古典的な M 期遮断薬としては、ピンカ類 (ピンクリスチンおよびピンブラスチン)、タキソール (登録商標)、ならびにドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトボシド、およびブレオマイシンなどのトポ II 阻害剤が挙げられる。G1 停止を起こす薬剤、例えば、タモキシフェン、ブレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5 - フルオロウラシル、およびアラ C などの DNA アルキル化剤はまた、S 期停止にも及ぶ。

## 【0270】

VEGF-A (VEGF) 阻害剤製剤

一部の実施形態では、本明細書に記載する方法は、任意選択で、VEGF-Aのその受容体の1つまたは複数、特にVEGFR-2への結合を阻害する治療活性剤を投与することを含む。VEGF-A阻害剤製剤は、本明細書に記載するリガンド結合分子の1つまたは複数と併用して投与することができる。一部の実施形態では、VEGF-A阻害剤製剤およびリガンド結合分子は、単一組成物で同時投与される。他の実施形態では、VEGF-A阻害剤製剤は、リガンド結合分子とは別個の組成物として投与される。

## 【0271】

一実施形態では、VEGF-A阻害剤製剤は、ラニズマブ、ベバシズマブ、アフリベルセプト、KH902 VEGF受容体-Fc融合タンパク質、2C3抗体、ORA102、ベガブタニブ、ベバシラニブ、SIRNA-027、デクルシン、デクルシノール、ピクロポドフィリン、ググルステロン、PLG101、エイコサノイドLXA4、PTK787、パゾバニブ、アキシチニブ、CDDO-Me、CDDO-Imm、シコニン、-ヒドロキシイソバレリルシコニン、EYE001、ガングリオシドGM3、DC101抗体、Mab25抗体、Mab73抗体、4A5抗体、4E10抗体、5F12抗体、VA01抗体、BL2抗体、VEGF関連タンパク質、sFLT01、sFLT02、ペプチドB3、TG100801、ソラフェニブ、もしくはG6-31抗体、または前述の何れかの薬学的に許容される塩から選択される。

## 【0272】

ヒトVEGFR-2 ECDのcDNAおよびアミノ酸配列はそれぞれ、配列番号5および6で示される。「VEGF-A阻害剤製剤」は、例えば、VEGF-AのVEGFR-2への結合を遮断することによって、またはVEGFR-2の発現を低減することによって、VEGF-A/VEGFR-2相互作用を特異的に低減するように作用する任意の分子であり得る。本明細書で使用する「VEGF-A」という用語は、血管新生または血管新生プロセスを誘導する血管内皮増殖因子を指し、例えば、VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>165</sub>、およびVEGF<sub>189</sub>を含む、VEGF-A遺伝子の選択的スプライシングによって生じ、血管新生または血管新生プロセスを誘導するVEGFの種々のサブタイプを含む。「VEGF」という用語は、「VEGF」ポリペプチドまたは遺伝子もしくは核酸をコードする「VEGF」を指すために用いることができる。

## 【0273】

「VEGF-A阻害剤製剤」という用語は、VEGF-Aの活性または生成を部分的または完全に低減または阻害する薬剤を指す。VEGF-A阻害剤製剤は、VEGF<sub>165</sub>などの特定のVEGF-Aの活性または生成を直接的または間接的に低減または阻害することができる。さらに、「VEGF-A阻害剤製剤」は、VEGF-A関連受容体シグナルを低減または阻害するように、VEGF-Aリガンドまたはその同族受容体の何れかに作用する薬剤を含む。「VEGF-A阻害剤製剤」の例としては、VEGF-A核酸を標的にするアンチセンス分子、リボザイム、またはRNAi；VEGF-Aアプタマー；VEGF-A抗体；VEGF-Aのその同族受容体への結合を妨げる可溶性VEGF受容体デコイ；同族VEGF-A受容体(VEGFR-1および/またはVEGFR-2)核酸を標的にするアンチセンス分子、リボザイム、またはRNAi；VEGFR-1およびVEGFR-2のアプタマーまたはVEGFR-1およびVEGFR-2の抗体；ならびにVEGFR-1および/またはVEGFR-2のチロシンキナーゼ阻害剤が挙げられる。

## 【0274】

VEGF-A阻害剤は、VEGFに結合する可溶性VEGFR-2 ECDフラグメント(配列番号6のアミノ酸20~764)を含むポリペプチド；可溶性VEGFR-1のECDフラグメント、可溶性VEGFR-1/R2ベースのリガンドトラップ、例えばアフリベルセプト(Regeneron)；VEGFR-2アンチセンスポリヌクレオチドまたは短い干渉RNA(sRNA)；抗VEGFR-2抗体；VEGFR-2とVEGFの間の結合を阻害する抗VEGFR-2抗体の抗原結合フラグメントを含むVEGFR

10

20

30

40

50

- 2 阻害剤ポリペプチド；VEGFR - 2 と VEGF - A の間の結合を阻害するアプタマーであり得る。一部の変態形態では、VEGFR - 2 ベースのリガンドトラップは、免疫グロブリン定常領域フラグメント (Fc) に融合した可溶性 VEGFR - 2 ポリペプチドフラグメントを含む融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、VEGFR - 2 ポリペプチドフラグメントはアルカリホスファターゼ (AP) に融合される。Fc または AP の融合コンストラクトを作製する方法は、国際公開第 02 / 060950 号パンフレットに見出され、この開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0275】

いくつかの VEGF - A 抗体が記載されており、例えば、米国特許第 8,349,322 号明細書；同第 8,236,312 号明細書；同第 8,216,571 号明細書；同第 8,101,177 号明細書；同第 8,092,797 号明細書；同第 8,088,375 号明細書；同第 8,034,905 号明細書；同第 5,730,977 号明細書；同第 6,342,219 号明細書、同第 6,524,583 号明細書、同第 6,451,764 号明細書、同第 6,448,077 号明細書、同第 6,416,758 号明細書、同第 6,342,221 号明細書、ならびに国際公開第 96 / 30046 号パンフレット、国際公開第 97 / 44453 号パンフレット、および国際公開第 98 / 45331 号パンフレットを参照されたい。これらの内容は、その全体が参照により組み込まれる。例示的な VEGF - A 抗体としては、ベバシズマブ (Avastin (登録商標)) およびラニズマブ (Lucentis (登録商標)) が挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に記載する 1 つまたは複数のリガンド結合分子は、ベバシズマブと併用して投与される。本明細書に記載する 1 つまたは複数のリガンド結合分子は、ラニズマブと併用して投与される。

#### 【0276】

一部の実施形態では、VEGF - A 阻害剤は、EYE001 (以前は NX1838 と呼ばれた) であり、これは、主要な可溶性ヒト VEGF アイソフォームに高度かつ特異的な親和性で結合する改変ペグ化アプタマーである (米国特許第 6,011,020 号明細書；同第 6,051,698 号明細書；および同第 6,147,204 号明細書を参照のこと)。アプタマーは、VEGF に向けられた高親和性抗体に類似の方法で VEGF に結合し不活性化する。別の有用な VEGF アプタマーは、非ペグ化形態の EYE001 である。

#### 【0277】

好ましい実施形態では、本明細書に記載する 1 つまたは複数のリガンド結合分子は、アフリベルセプト (Eylea (登録商標)) (Holash et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:11393-11398, 2002、この開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる) と併用して投与される。

#### 【0278】

いくつかの VEGFR - 2 抗体が記載されており、例えば、米国特許第 6,334,339 号明細書、米国特許出願公開第 2002 / 0064528 号明細書、同第 2005 / 0214860 号明細書、および同第 2005 / 0234225 号明細書 (これらはすべて、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。相対的親和性を有する抗体が容易に作製できるため、またヒト治療に抗体を取り入れる技術が継続的に改善されているため、抗体は VEGFR - 2 / VEGF 相互作用を調節するために有用である。したがって、本発明では、VEGFR - 2 に特異的な抗体 (例えば、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、単一鎖抗体、キメラ抗体、二官能性 / 二重特異性抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、および相補性決定領域 (CDR) 移植抗体、また本発明のポリペプチドを特異的に認識する CDR 配列を含む化合物を含む) の使用が企図される。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーを含む、当技術分野で公知の種々の技術を用いて作製することができる [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]。また、Cole et al. および Bo

erner et al. の技術もヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) および Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86 - 95 (1991) ]。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば、内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活性化されたマウスに導入することによって作製することができる。チャレンジすると、ヒト抗体産生が観察されるが、これは、遺伝子再編成、アセンブリ、および抗体レパートリーを含むすべての点においてヒトで観察されるものに極めて類似している。このアプローチは、例えば、米国特許第 5,545,807 号明細書；同第 5,545,806 号明細書；同第 5,569,825 号明細書；同第 5,625,126 号明細書；同第 5,633,425 号明細書；同第 5,661,016 号明細書、および以下の科学論文：Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779 - 783 (1992)；Lonberg et al., *Nature* 368, 856 - 859 (1994)；Morrison, *Nature* 368, 812 - 13 (1994)；Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845 - 51 (1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996)；Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65 - 93 (1995) に記載されている。

【0279】

#### PDGF 阻害剤製剤

一部の実施形態では、本明細書に記載する方法は、任意選択で、PDGF のその受容体の 1 つまたは複数への結合を阻害するように、治療活性剤を投与することを含む。PDGF 阻害剤製剤は、本明細書に記載するリガンド結合分子の 1 つまたは複数と併用して投与することができる。一部の実施形態では、PDGF 阻害剤製剤およびリガンド結合分子は、単一組成物で同時投与される。他の実施形態では、PDGF 阻害剤製剤は、リガンド結合分子とは別個の組成物として投与される。

【0280】

「PDGF」という用語は、細胞の増殖または分裂を調節する血小板由来増殖因子を指す。本明細書で使用する場合、「PDGF」という用語は、PDGF - B、PDGF - A、PDGF - C、PDGF - D、それらの変異形態、および PDGF - AA、PDGF - AB、PDGF - BB、PDGF - CC および PDGF - DD を含む、それらの二量体形態を含む。血小板由来増殖因子は、2 つの関連受容体型チロシンキナーゼ血小板由来増殖因子細胞表面受容体 (すなわち、PDGFR)、PDGFR - および PDGFR - への結合およびそれらの二量体化を介してその作用を及ぼす、A 鎖 (PDGF - A) および B 鎖 (PDGF - B) のホモ二量体およびヘテロ二量体を含む。さらに、PDGFR 複合体に対する 2 つのさらなるプロテアーゼ活性化リガンドである PDGF - C および PDGF - D が同定されている (Li et al., (2000) *Nat. Cell. Biol.* 2: 302 - 9；Bergsten et al., (2001) *Nat. Cell. Biol.* 3: 512 - 6；および Utele et al., (2001) *Circulation* 103: 2242 - 47)。PDGFR の異なるリガンド結合特性のため、PDGFR - / は PDGF - AA、PDGF - BB、PDGF - AB、および PDGF - CC に結合し、PDGFR - / は PDGF - BB および PDGF - DD に結合するが、PDGFR - / は PDGF - AB、PDGF - BB、PDGF - C、および PDGF - DD に結合する (Betsholtz et al., (2001) *BioEssays* 23: 494 - 507)。本明細書で使用する場合、「PDGF」という用語はまた、応答性の細胞型上の PDGFR の結合および活性化を通して、DNA 合成および有糸分裂を誘導する増殖因子のクラスのメンバーを指す。PDGF は、例えば、定方向の細胞移動 (走化性) および細胞活性化；ホスホリパーゼ活性化；ホスファチジルイノシトール代謝回転およびプロスタグランジン代謝の増大；応答性細胞によるコラ

10

20

30

40

50

ーゲンとコラゲナーゼの両方の合成の刺激；マトリックス合成、サイトカイン産生、およびリポタンパク質取り込みを含む、細胞代謝活性の変化；PDGF受容体を欠く細胞の増殖応答の間接的な誘導；ならびに強力な血管収縮活性をもたらすことができる。「PDGF」という用語は、「PDGF」ポリペプチド、「PDGF」をコードする遺伝子もしくは核酸、またはその二量体化形態を指すために用いることができる。

#### 【0281】

「PDGF阻害剤製剤」という用語は、PDGFの活性または生成を部分的または完全に低減または阻害する薬剤を指す。PDGF阻害剤製剤は、PDGF-Bなどの特定のPDGFの活性または生成を直接的または間接的に低減または阻害することができる。さらに、「PDGF阻害剤製剤」は、PDGF関連受容体シグナルを低減または阻害するように、PDGFリガンドまたはその同族受容体に作用する薬剤を含む。「PDGF阻害剤製剤」の例としては、PDGF核酸を標的にするアンチセンス分子、リボザイム、またはRNAi；PDGFアプタマー、PDGFそれ自体もしくはその受容体に対するPDGF抗体、またはPDGFのその同族受容体への結合を妨げる可溶性PDGF受容体デコイ；同族PDGF受容体(PDGF-R)核酸を標的にするアンチセンス分子、リボザイム、またはRNAi；同族PDGF-R受容体に結合するPDGF-RアプタマーまたはPDGF-R抗体；ならびにPDGF-Rチロシンキナーゼ阻害剤が挙げられる。

#### 【0282】

一実施形態では、PDGF阻害剤製剤は、米国特許出願公開第2012/0100136号明細書（この内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載および定義される式A、B、C、D、またはEの化合物、p1B3抗体、CDP860、IMC-3G3、162.62抗体、163.31抗体、169.14抗体、169.31抗体、R1抗体、2A1E2抗体、M4TS.11抗体、M4TS.22抗体、Hyb 120.1.2.1.2抗体、Hyb 121.6.1.1.1抗体、Hyb 127.5.7.3.1抗体、Hyb 127.8.2.2.2抗体、Hyb 1.6.1抗体、Hyb 1.11.1抗体、Hyb 1.17.1抗体、Hyb 1.18.1抗体、Hyb 1.19.1抗体、Hyb 1.23.1抗体、Hyb 1.24抗体、Hyb 1.25抗体、Hyb 1.29抗体、Hyb 1.33抗体、Hyb 1.38抗体、Hyb 1.39抗体、Hyb 1.40抗体、Hyb 1.45抗体、Hyb 1.46抗体、Hyb 1.48抗体、Hyb 1.49抗体、Hyb 1.51抗体、Hyb 6.4.1抗体、F3抗体、ヒト化F3抗体、C1抗体、ヒト化C1抗体、6.4抗体、抗mPDGF-CヤギIgG抗体、C3.1抗体、PDGF-R-B1モノクローナル抗体、PDGF-R-B2モノクローナル抗体、6D11モノクローナル抗体、Sis 1モノクローナル抗体、PR7212モノクローナル抗体、PR292モノクローナル抗体、HYB 9610モノクローナル抗体、HYB 9611モノクローナル抗体、HYB 9612モノクローナル抗体、HYB 9613モノクローナル抗体、または前述の何れかの何れかのその薬学的に許容される塩から選択される。

#### 【0283】

好ましい実施形態では、本明細書に記載する1つまたは複数のリガンド結合分子は、PDGF-R-抗体（眼の適応症についてRegeneron Inc.により開発されているものなど）または抗PDGFアプタマー（眼の適応症についてOphthotech Inc.により開発されているE10030など）と併用して投与される。

#### 【0284】

例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFvを含む、VEGF-AおよびPDGF阻害剤製剤の抗体フラグメントもまた企図される。「に特異的」という用語は、本発明の抗体を記載するために使用する場合、本発明の抗体の可変領域がもっぱら目的のポリペプチドを認識し結合する（すなわち、ファミリーメンバー間の局所的な配列同一性、相同性、または類似性が存在し得るにもかかわらず、結合親和性の計測可能な差によって、同じファミリーの他の公知のポリペプチドから目的のポリペプチドを識別することができる）ことを示す。特異的抗体が、他のタンパク質（例えば、黄色ブドウ球菌（S

． aureus) プロテイン A または E L I S A 技術における他の抗体) とも、抗体の可変領域以外の配列との相互作用によって、特に分子の定常領域において相互作用し得ることは理解されよう。本発明の抗体の結合特異性を決定するスクリーニングアッセイは、当技術分野で周知であり、ルーチン的に実施される。そのようなアッセイの包括的な議論については、Harlow et al. (Eds), Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6 を参照されたい。本発明の抗体は、当技術分野でルーチン的に実施される、周知の任意の方法を用いて作製することができる。

#### 【0285】

10

別の実施形態では、本明細書に記載する方法は、任意選択で、アンチセンス (例えば、VEGFR - 2 に対するアンチセンス) 核酸分子を被験体に投与することを含む。特定のタンパク質 (例えば、VEGFR - 2) に対するアンチセンス核酸分子は、治療目的に、そのタンパク質の存在を排除するかまたはそのレベルをダウンレギュレートする要求が含まれる場合、そのタンパク質 (例えば、VEGFR - 2) をコードする mRNA の翻訳を阻害するために治療上有用である。VEGFR - 2 アンチセンス RNA は、例えば、VEGFR - 2 が原因因子として関与する疾患、例えば炎症性疾患の治療において、VEGFR - 2 をアンタゴナイズする薬剤として有用になり得よう。

#### 【0286】

アンチセンス核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的なヌクレオチド配列を含む (例えば、二本鎖 cDNA 分子のコード鎖に相補的であるか、または mRNA 配列に相補的である)。(例えば、配列番号 1 の VEGFR - 3 cDNA 配列を参照されたい)。アンチセンスヌクレオチドを設計および最適化するための方法は、Lima et al., (J Biol Chem; 272: 626 - 38, 1997) および Kurreck et al., (Nucleic Acids Res.; 30: 1911 - 8, 2002) に記載されている。特定の態様では、少なくとも約 10、25、50、100、250、もしくは 500 ヌクレオチド、または全タンパク質 (例えば、VEGFR - 2) コード鎖に相補的な配列、またはその一部のみに相補的な配列を含むアンチセンス核酸分子が提供される。タンパク質 (例えば、VEGFR - 2) のフラグメント、ホモログ、誘導体、およびアナログをコードする核酸分子、またはタンパク質 (VEGFR - 2) 核酸配列に相補的なアンチセンス核酸も企図される。

20

30

#### 【0287】

一実施形態では、アンチセンス核酸分子は、例えば VEGFR - 2 などのタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対するアンチセンスである。「コード領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を指す。別の実施形態では、アンチセンス核酸分子は、例えば VEGFR - 2 などのタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コンシーディング (conceding) 領域」に対するアンチセンスである。「コンシーディング領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されない、コード領域に隣接する 5' および 3' 配列 (すなわち、5' および 3' 非翻訳領域とも呼ばれる) を指す。

40

#### 【0288】

本発明のアンチセンス核酸は、ワトソンおよびクリックの規則またはフーグスティーン塩基対の規則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、タンパク質 mRNA の全コード領域に対して相補的にすることができるが、より好ましくは、タンパク質 mRNA のコード領域または非コード領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50 ヌクレオチド長とすることができる。本発明のアンチセンス核酸は、当技術分野で公知の手法を用いる化学合成または酵素的連結反応を用いて構築することができる。例えば、アンチセンス核酸 (例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド) は、天然ヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増大させるように

50



もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二本鎖の物理的安定性を増大させるように設計された種々に修飾されたヌクレオチドを用いて化学合成することができる（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを用いることができる）。

#### 【0289】

アンチセンス核酸を作製するために用いることができる、修飾ヌクレオチドの例としては、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 $\beta$  - D - ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 $\beta$  - D - マンノシルキューオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキシン、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピルウラシル、(acp3)w、および2, 6 - ジアミノプリンが挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンスの配向でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成させることができる。

#### 【0290】

アンチセンス核酸分子は、典型的には、それらが細胞 mRNA および / またはタンパク質（例えば VEGFR - 2）をコードするゲノム DNA とハイブリダイズするかまたは結合し、それによって（例えば、転写および / または翻訳を阻害することによって）タンパク質の発現を阻害するように、被験体に投与されるかまたは *in situ* で生成される。安定な二本鎖を形成するための通常のヌクレオチド相補性によって、または例えば、DNA 二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主溝における特異的相互作用を通して、ハイブリダイゼーションは起こり得る。

#### 【0291】

さらに別の実施形態では、タンパク質 RNA は、二本鎖 (dsRNA) (Fire et al., Nature 391: 806 - 811, 1998) または短い干渉 RNA (siRNA) 配列 (Yu et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 6047 - 52, 2002) を用いて RNA 干渉 (RNAi) を誘導するために用いることができる。「RNAi」は、dsRNA が相補的 mRNA の相同性依存分解を誘導するプロセスである。一実施形態では、本発明の核酸分子は、相補的塩基対形成によって本発明の「センス」リボ核酸とハイブリダイズして、二本鎖 RNA を形成する。少なくとも約 20、25、50、100、250、もしくは 500 ヌクレオチドまたは全タンパク質（例えば VEGFR - 2）コード鎖、またはその一部のみに対応する dsRNA アンチセンスおよびセンス核酸分子が提供される。代替実施形態では、siRNA は、2 ~ 3 ヌクレオチドの 3' オーバーハングを有する、30 ヌクレオチド長以下、より好ましくは、21 ~ 23 ヌクレオチドであり、これは、より長い dsRNA からリボヌクレアーゼ III 切断により生成する。例えば、Tuschl T. (Nat Biotechnol 20: 446 - 48, 2002) を参照されたい。RNAi 化合物の調製および使用は、米国特許出願公開第 2004 / 0023390 号明細書に記載されており、その開示全体は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0292】

小型 RNA 分子の細胞内転写は、核内低分子 RNA (snRNA) U6 またはヒト RN

A s e P R N A H 1を通常コードするRNAポリメラーゼIII ( P o l I I I ) 転写単位にs i R N A 鋳型をクローニングすることにより達成することができる。s i R N A を発現するために、2つのアプローチを用いることができる、すなわち、一実施形態では、s i R N A 二本鎖を構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖は、それぞれのプロモーターにより転写され ( L e e , e t a l . N a t . B i o t e c h n o l . 2 0 , 5 0 0 - 5 0 5 . 2 0 0 2 ) ; 代替実施形態では、s i R N A は、細胞内プロセッシング後にs i R N A を生じさせるステムループヘアピンRNA構造として発現される ( B r u m m e l k a m p e t a l . S c i e n c e 2 9 6 : 5 5 0 - 5 5 3 . 2 0 0 2 ) ( 参照により本明細書に組み込まれる ) 。

#### 【 0 2 9 3 】

d s R N A / s i R N A は、最も一般的には、生物に送達する前に、センスおよびアンチセンスRNA鎖をアニーリングすることによって投与される。代替実施形態では、RNA i は、投与前にアニーリングすることなく、同じ溶液中の本発明のセンスおよびアンチセンス核酸を投与することによって実施することができ、また極めて短い時間枠内で、別個のビヒクル中の核酸を投与することによって実施することもできる。タンパク質 ( 例えば、V E G F R - 2 など ) のフラグメント、ホモログ、誘導体、およびアナログをコードする核酸分子またはm V E G F R - 2 核酸配列に相補的なアンチセンス核酸も企図される。

#### 【 0 2 9 4 】

アプタマーは、例えば、V E G F R - 2 と V E G F - A ならびに P D G F R と P G D F など受容体とその同族リガンドの相互作用を干渉するための別の核酸ベースの方法である。アプタマーは、他の分子に結合する能力に基づいてランダムなプールから選択されたDNAまたはRNA分子である。核酸、タンパク質、小さな有機化合物、さらには生物全体に結合するアプタマーが選択されている。アプタマーを同定および作製するための方法および組成物は、当業者に公知であり、例えば、その内容全体がそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 5 , 8 4 0 , 8 6 7 号明細書および米国特許第 5 , 5 8 2 , 9 8 1 号明細書に記載されている。

#### 【 0 2 9 5 】

コンビナトリアル科学の分野の最近の進歩により、所与の標的に対して高い親和性および特異性を有する短いポリマー配列が同定されている。例えば、S E L E X 技術を用いて、哺乳動物抗体と競合する結合特性を有するDNAおよびRNAのアプタマーを同定することができ、免疫学の分野では、多種多様の化合物に結合する抗体または抗体フラグメントが作製および単離されており、またファージディスプレイを利用して、極めて好ましい結合特性を有する新規ペプチド配列が発見されている。これらの分子進化技術の成功に基づいて、確かに、任意の標的分子に結合する分子を生成させることができる。相補的な塩基対形成のない短い領域から生成するヘアピンループを利用することが多いアプタマー、ループ状超可変領域のコンビナトリアル配列を利用する、天然由来の抗体、および直鎖状ペプチドのファージディスプレイ結果と比較すると、改善された結果を示している環状ペプチドを利用する新規ファージディスプレイライブラリーの場合のように、ループ構造は、多くの場合、所望の結合属性の提供に関与する。したがって、高親和性リガンドがコンビナトリアル分子進化技術によって作製および同定され得ることを示唆する十分な証拠が得られている。本発明のために、分子進化技術を用いて、本明細書に記載するリガンドに特異的なリガンド結合分子を単離することができる。アプタマーに関する詳細について、全般的には、G o l d , L . , S i n g e r , B . , H e , Y . Y . , B r o d y . E . , “ A p t a m e r s A s T h e r a p e u t i c A n d D i a g n o s t i c A g e n t s , ” J . B i o t e c h n o l . 7 4 : 5 - 1 3 ( 2 0 0 0 ) を参照されたい。アプタマーを作製するための関連技術は、その内容全体が参照により組み込まれる米国特許第 6 , 6 9 9 , 8 4 3 号明細書に見出すことができる。

#### 【 0 2 9 6 】

一部の実施形態では、アプタマーは、核酸ライブラリーを準備することと、核酸ライブ

10

20

30

40

50

ラリーを増殖因子と接触させることにより作製することができ、増殖因子に対して（他のライブラリー核酸に比較して）より高い結合親和性を有する核酸を選択し増幅して、増殖因子への結合に対して相対的に高い親和性および特異性を有する核酸が濃縮された核酸の混合物を得る。このプロセスは反復することができ、選択された核酸を突然変異させて再スクリーニングし、それによって増殖因子アプタマーを同定する。

#### 【0297】

さらに別の変更形態では、VEGF-A阻害剤製剤は、VEGFに結合し、VEGFR-2へのVEGF結合を阻害する、VEGFR-1の可溶性ECDフラグメントを含む。VEGFR-1のcDNAおよびアミノ酸配列は、配列番号10および11に示す。VEGFR-1の例示的なECDフラグメントは、米国特許出願公開第2006/0030000号明細書および国際公開第2005/087808号パンフレットに記載されており、これらの開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0298】

##### 抗炎症剤

別の実施形態では、本明細書に記載する方法は、任意選択で、1つまたは複数の抗炎症剤を被験体に投与することを含む。一部の実施形態では、抗炎症剤およびリガンド結合分子は、単一組成物で同時投与される。他の実施形態では、抗炎症剤は、リガンド結合分子とは別個の組成物として投与される。リガンド結合分子、VEGF-A阻害剤製剤、および抗炎症剤を含む組合せが、具体的に企図される。本明細書で使用する場合、「抗炎症剤」という用語は、一般に、被験体の炎症または腫脹を軽減する任意の薬剤を指す。いくつかの例示的な抗炎症剤を本明細書に列挙するが、本明細書に具体的には列挙されないが本明細書に包含される、さらなる適切な抗炎症剤があり得ることは認識されよう。

20

#### 【0299】

一変形形態では、抗炎症剤は、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）である。代表的なNSAIDとしては、以下に限定されるものではないが、アスピリン、スルファサラジン（商標）、アサコール（商標）、ジペンドタム（Dipendtum）（商標）、ペンタサ（商標）、アナプロックス（商標）、アナプロックスDS（商標）（ナプロキセンナトリウム）；アンセイド（商標）（フルルビプロフェン）；オルソテック（商標）（ジクロフェナクナトリウム+ミソプロスチル（misoprostil））；カタフラム（商標）/ボルタレン（商標）（ジクロフェナクカリウム）；クリノリル（商標）（スリンダク）；デイプロ（Daypro）（商標）（オキサプロジン）；ジサルシド（Disalcid）（商標）（サルサラート）；ドロビッド（Dolobid）（商標）（ジフルニサル）；ECナプロシン（商標）（ナプロキセンナトリウム）；フェルデン（商標）（ピロキシカム）；インドシン（商標）、インドシンSR（商標）（インドメタシン）；ロディン（Lodine）（商標）、ロディンXL（商標）（エトドラック）；モトリン（商標）（イブプロフェン）；ナブレラン（Naprelan）（商標）（ナプロキセン）；ナプロシン（商標）（ナプロキセン）；オルヂス（商標）（ケトプロフェン）；オルベール（Oruvail）（商標）（ケトプロフェン）；レラフェン（Relafen）（商標）（ナブメトン）；トレクティン（商標）（トルメチンナトリウム）、；トリリセート（Trilisate）（商標）（トリサリチル酸コリンマグネシウム）；Cox-1阻害剤；ピオックス（商標）（ロフェコキシブ）などのCox-2阻害剤；アルコキシア（Arcoxia）（商標）（エトリコキシブ）、セブレックス（Celebrex）（商標）（セロコキシブ）；モービック（商標）（メロキシカム）；ベクストラ（商標）（バルデコキシブ）、ダイナスタット（Dynastat）（商標）パラコキシブナトリウム）；プレキサジ（Prexige）（商標）（ルミラコキシブ）、およびナンプメトン（nambumetone）が挙げられる。さらなる適切なNSAIDとしては、これらに限定されないが、下記のもものが挙げられる：5-アミノサリチル酸（aminosalicylic acid）（5-ASA、メサラミン、レサラジン（lesalazine））、-アセトアミドカプロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン、アニトラザフェン（anitrazafeen）、ア

30

40

50

ントラフェニン (antrafenine)、ベンダザック、ベンダザックリシネート、ベンジダミン、ベプロジン (beprozine)、ブオペラモール (broperamole)、ブコローム、ブフェゾラック (bufezolac)、シプロクアゾン (ciproquazone)、クロキシマート、ダジダミン (dazidamine)、デボキサメット (deboxamet)、デトミジン (detomidine)、ジフェンピラミド、ジフェンピラミド (difenpyramide)、ジフィサラミン (difisalamine)、ジタゾール (ditazole)、エモルファゾン、ファネチゾールメシレート (fanetizole mesylate)、フェンフルミゾール (fenflumizole)、フロクタフェニン、フルミゾール (flumizole)、フルニキシン、フルプロクアゾン (fluproquazone)、ホピルトリン (fopirtoline)、ホスホサル (fosfosal)、グアイメサル、グアイアゾレン (guaiazolene)、イソニキシリン (isonixirine)、レフェタミンHCl、レフルノミド、ロフェミゾール (lofemizole)、ロティファゾール (lotifazole)、リジンクロニキシネート (lysine clonixinate)、メセクラゾン (mesecrazone)、ナブメトン、ニクチンドール (nictindole)、ニメスリド、オルゴテイン、オルパノキシン、オキサセプロルム (oxaceprolme)、オキサパドール、パラニリン (paranyline)、ペリソキサール、クエン酸ペリソキサール、ピフォキシム (pifoxime)、ピプロキセン (piproxen)、ピラゾラック (pirazolac)、ピルフェニドン、プロカゾン、プロキサゾール、チエラビンB (thielavine B)、チフラミゾール (tiflamizole)、チメガジン (timegadine)、トレクティン、トルパドール (tolpadol)、トリプタミド (tryptamid)、ならびに480156S、AA861、AD1590、AFP802、AFP860、AI77B、AP504、AU8001、BPPC、BW540C、CHINOIN、CN100、EB382、EL508、F1044、FK-506、GV3658、ITF182、KCNTIEI6090、KME4、LA2851、MR714、MR897、MY309、ONO3144、PR823、PV102、PV108、R830、RS2131、SCR152、SH440、SIR133、SPAS510、SQ27239、ST281、SY6001、TA60127、TAI-901(4-ベンゾイル-1-インダンカルボン酸)、TVX2706、U60257、UR2301、およびWY41770などの企業コード番号によって命名されるもの。

#### 【0300】

別の変更形態では、抗炎症剤は、炎症性サイトカインとその受容体との相互作用を阻害する化合物を含む。本発明の特異的結合薬剤との併用で有用なサイトカイン阻害剤の例としては、例えば、TGFのアンタゴニスト(抗体など)(例えば、レミケード)、および炎症に關与するインターロイキンに向けられたアンタゴニスト(抗体など)が挙げられる。そのようなインターロイキンは本明細書に記載され、好ましくは、以下に限定されるものではないが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17、およびIL-18を含む。Feghali, et al., Frontiers in Biosci., 2:12-26 (1997)を参照されたい。

#### 【0301】

別の変更形態では、抗炎症剤はコルチコステロイドである。例示的なコルチコステロイドとしては、以下に限定されるものではないが、ジフロロアソンジアセテート (difloroasone diacetate)、プロピオン酸クロベタゾール、プロピオン酸ハロベタゾール、ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、ブデソニド、コルチゾン、デキサメタゾン、フルオシノニド、ハルシノニド、デソキマタゾン (desoximethasone)、トリアムシノロン、プロピオン酸フルチカゾン、フルオシノロンアセトニド、フルランドレノロン、フランカルボン酸モメタゾン、ベタメトゾン (betamethosone)、プロピオン酸フルチカゾン、フルオシノロンアセトニド、アクロ

10

20

30

40

50

メタゾンジプロピオネート (acclometasome dipropionate)、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアミノロン (triamcinolone)、デソニド、およびヒドロコルチゾンが挙げられる。

#### 【0302】

別の変更形態では、抗炎症剤はサイクロスポリンである。

#### 【0303】

##### 抗生物質

別の実施形態では、本明細書に記載する方法は、任意選択で、抗生物質を被験体に投与することをさらに含む。一部の実施形態では、抗生物質およびリガンド結合分子は、単一組成物で同時投与される。他の実施形態では、抗生物質は、リガンド結合分子とは別個の組成物として投与される。例示的な抗生物質としては、以下に限定されるものではないが、テトラサイクリン、アミノグリコシド、ペニシリン、セファロスポリン、スルホンアミド薬、コハク酸クロラムフェニコールナトリウム、エリスロマイシン、バンコマイシン、リンコマイシン、クリンダマイシン、ナイスタチン、アンホテリシンB、アマンチジン、イドクスウリジン、p-アミノサリチル酸、イソニアジド、リファンピン、アンチノマイシンD、ミトラマイシン、ダウノマイシン、アドリアマイシン、ブレオマイシン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、プロカルバジン、およびイミダゾールカルボキサミドが挙げられる。

#### 【0304】

##### チロシンキナーゼ阻害剤

別の実施形態では、本明細書に記載する方法は、任意選択で、VEGFR-2および/またはVEGFR-3活性を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤を投与することをさらに含む。

#### 【0305】

本明細書に記載する方法で使用される例示的なチロシンキナーゼ阻害剤としては、以下に限定されるものではないが、AEE788 (TKI、VEGFR-2、EGFR: Novartis); ZD6474 (TKI、VEGFR-1、-2、-3、EGFR: ザクチマ (Zactima): AstraZeneca); AZD2171 (TKI、VEGFR-1、-2: AstraZeneca); SU11248 (TKI、VEGFR-1、-2、PDGFR: スニチニブ: Pfizer); AG13925 (TKI、VEGFR-1、-2: Pfizer); CEP-7055 (TKI、VEGFR-1、-2、および-3: Cephalon); CP-547,632 (TKI、VEGFR-1、-2: Pfizer); GW756024 (TKL VEGFR-1、-2、-3: GlaxoSmithKline); GW786034 (TKI、VEGFR-1、-2、-3: GlaxoSmithKline); ソラフェニブ (TKI、Bay43-9006、VEGFR-1、-2、PDGFR: Bayer/Onyx); SU4312 (TKI、VEGFR-2、PDGFR: Pfizer); AMG706 (TKI、VEGFR-1、-2、-3: Amgen); XL647 (TKI、EGFR、HER2、VEGFR、ErbB4: Exelixis); XL999 (TKI、FGFR、VEGFR、PDGFR、FLT3: Exelixis); PKC412 (TKI、KIT、PDGFR、PKC、FLT3、VEGFR-2: Novartis); AEE788 (TKI、EGFR、VEGFR2、VEGFR-1: Novartis); OSI-030 (TKI、c-kit、VEGFR: OSI Pharmaceuticals); OSI-817 (TKI c-kit、VEGFR: OSI Pharmaceuticals); DMPQ (TKI、ERGF、PDGFR、ErbB2、p56.pkA、pkC); MLN518 (TKI、FLT3、PDGFR、c-KIT (T53518: Millennium Pharmaceuticals); レスタウリニブ (lestaurinib) (TKI、FLT3、CEP-701、Cephalon); ZD1839 (TKI、EGFR: ゲフィチニブ、イレッサ: AstraZeneca); OSI-774 (TKI、EGFR: エ

10

20

30

40

50

ルロチニブ (Erlotinib) : タルセバ : OSI Pharmaceuticals ; ラパチニブ (TKI、ErbB-2、EGFR、およびGD-2016 : タイケルブ : GlaxoSmithKline) が挙げられる。

### 【0306】

一部の実施形態では、本明細書に記載する方法は、血管新生を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤を被験体に投与することをさらに含む。例示的な抗血管新生チロシンキナーゼは阻害しおよびその標的を下記の表2に示す。

表2. 抗血管新生チロシンキナーゼ受容体阻害剤およびその標的						
薬剤	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	PDGFR	EGFR	他の標的
バンデタニブ		●			●	RET
スニチニブ	●	●	●	●		KIT, FLT3, RET
アキシチニブ	●	●	●			
ソラフェニブ	●	●	●	●		KIT, RAF, FLT3
パタラニブ	●	●	●	●		KIT
セジラニブ	●	●	●	●		KIT
モテサニブ	●	●	●	●		KIT, RET
パゾパニブ	●	●	●	●		KIT
BIBF 1120		●		●		EGFR

略語: FGFR, 線維芽細胞様増殖因子受容体; FLT3, FMS様チロシンキナーゼ3; KIT, 幹細胞因子受容体; RET, 膠細胞株由来神経栄養因子受容体; VEGFR, 血管内皮増殖因子受容体

### 【0307】

リガンド結合分子は、2つ以上の追加の活性化合物または治療と併用して投与することができる。一実施形態では、本発明のリガンド結合分子は、PDGF阻害剤製剤およびVEGF-A阻害剤製剤と併用して投与される。例えば、リガンド結合分子（配列番号3のアミノ酸配列を含むものなど）は、(i) アフリベルセプト (Eylea (登録商標))、および(ii) PDGFR抗体（眼の適応症についてRegeneron Inc.により開発されているものなど）と併用して、またはPDGFアパタマー（眼の適応症についてOphthotech Inc.により開発されているE10030 (Fovista (商標)) など）と併用して投与することができる。

### 【0308】

併用療法の投与

本明細書に記載する追加の活性薬剤の1つまたは複数との併用療法は、リガンド結合分子および1つまたは複数の追加の活性薬剤を含む単一の組成物もしくは医薬製剤を被験体に投与することによって、または2つ（またはそれを超える数）の別個の組成物もしくは製剤（1つの組成物はリガンド結合分子を含み、他の組成物は追加の活性薬剤を含む）を同時に被験体に投与することによって達成することができる。

### 【0309】

あるいは、本明細書に記載するリガンド結合分子を用いる併用療法は、数分から数週間の範囲の間隔を置いて、第2の薬剤に先行してまたはその後に投与してもよい。第2の薬剤およびリガンド結合分子が別々に投与される実施形態では、一般に、薬剤およびリガンド結合分子が依然として有利に併用効果を発揮することができるように、各送達時間の間の意味ある時間が終了していないことを確認することになる。そのような例では、互いの約12~24時間以内に、より好ましくは互いの6~12時間以内に、最も好ましくは約12時間ほどの遅延時間で、両方の治療を施すことが企図される。一部の状況では、しかしながら、それぞれの投与の間に数日（2、3、4、5、6、または7日）~数週間（1、2、3、4、5、6、または8週間）が経過する場合、治療期間を顕著に延長することが望ましいことがある。一方または両方の薬剤による反復治療が具体的に企図される。

### 【0310】

製剤および薬学的に許容される担体

本発明はまた、本発明のリガンド結合分子を含む医薬組成物を提供する。そのような組

成物は、治療有効量の1つまたは複数のリガンド結合分子および薬学的に許容される担体を含む。一実施形態では、そのような組成物は、1つまたは複数のリガンド結合分子および任意選択で、1つまたは複数の追加の活性薬剤（併用療法の場合）を含む。一実施形態では、そのような組成物は、1つまたは複数のリガンド結合分子ならびに任意選択でPDGF阻害剤製剤およびVEGF-A阻害剤製剤から選択される1つまたは複数の追加の活性薬剤を含む。別の実施形態では、本発明の1つまたは複数のリガンド結合分子を含む組成物と、PDGF阻害剤製剤またはVEGF-A阻害剤製剤を含む別の組成物とが投与される。

#### 【0311】

「医薬として許容される」という用語は、動物およびより具体的にはヒトにおける使用に対して、連邦政府もしくは州政府の規制当局により承認されたもの、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に収載されたものを意味する。「担体」という用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、補助剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような医薬担体は、水、および例えばピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等の、鉱油、動物、植物、または合成起源のものを含む油などの滅菌液体であってもよい。適切な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が挙げられる。本組成物は、必要に応じて、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤をさらに含むことができる。

#### 【0312】

組成物は、溶液、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、ヒドロゲル剤を含むゲル剤、ペースト剤、軟膏剤、クリーム剤、送達装置、除放剤、坐剤、注射剤、インプラント、噴霧剤、点眼剤、エアゾール剤等の形態であってもよい。リガンド結合分子、1つもしくは複数の追加の活性薬剤、またはその両方を含む組成物は、従来の医薬手段に従って製剤化することができる（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (第20版) ed. A. R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. および Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 編者 J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-2002, Marcel Dekker, New York を参照のこと）。適切な医薬担体の例は、E. W. Martin による "Remington's Pharmaceutical Sciences" に記載されている。

#### 【0313】

特定の疾患または障害の治療または予防に有効なリガンド結合分子および/または追加の活性薬剤の量をもたらす任意の適切な手段によって、組成物を投与することができる。各リガンド結合分子は、例えば、適切な担体物質と混合することができ、一般に、組成物の総重量の1~95重量%の量で存在する。組成物は、点眼、経口、非経口（例えば、静脈内、筋肉内、皮下）、直腸、経皮、経鼻、または吸入による投与に適した剤形で提供することができる。一実施形態では、組成物は、眼への直接注射に適した形態である。

#### 【0314】

本発明のリガンド結合分子および併用療法の場合には1つまたは複数の追加の活性薬剤は、中性形態または塩形態として製剤化することができる。薬学的に許容される塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来するものなど、遊離アミノ基と形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来するものなど、遊離カルボキシル基と形成されるものが挙げられる。

#### 【0315】

本発明のリガンド結合分子および追加の活性薬剤は、いくつかの無機酸および有機酸の

何れかと反応して薬学的に許容される塩を形成し得る十分塩基性の官能基を有し得る。当技術分野で周知のように、薬学的に許容される酸付加塩は薬学的に許容される酸から形成される。そのような塩には、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977) および *The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (編), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002 に収載されている薬学的に許容される塩が含まれる。

#### 【0316】

薬学的に許容される塩としては、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酒石酸水素塩、アスコビル酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルカル酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、樟脳スルホン酸塩、パモ酸塩、フェニル酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、アエリレート (aery late)、クロロ安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、o-アセトキシ安息香酸塩、ナフタレン-2-安息香酸塩、イソ酪酸塩、フェニル酪酸塩、-ハイドロキシ酪酸塩、ブチン-1,4-ジカルボン酸塩、ヘキシン-1,4-ジカルボン酸塩、カプリン酸塩、カプリル酸塩、桂皮酸塩、グリコール酸塩、ヘプタン酸塩、馬尿酸塩、リンゴ酸塩、ヒドロキシマレイン酸塩、マロン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、ニコチン酸塩、フタル酸塩、テレフタル酸塩、プロピオール酸塩、プロピオン酸塩、フェニルプロピオン酸塩、セバシン酸塩、スベリン酸塩、p-プロモベンゼンスルホン酸塩、クロロベンゼンスルホン酸塩、エチルスルホン酸塩、2-ヒドロキシエチルスルホン酸塩、メチルスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、ナフタレン-1,5-スルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、および酒石酸塩が挙げられる。

#### 【0317】

「薬学的に許容される塩」という用語はまた、カルボン酸官能基などの酸性官能基を有するリガンド結合分子および追加の活性薬剤と塩基との塩を指す。適切な塩基としては、以下に限定されるものではないが、ナトリウム、カリウム、およびリチウムなどのアルカリ金属の水酸化物；カルシウムおよびマグネシウムなどのアルカリ土類金属の水酸化物；アルミニウムおよび亜鉛などの他の金属の水酸化物；アンモニア、および有機アミン、例えば、無置換またはヒドロキシ置換モノ-、ジ-、またはトリ-アルキルアミン、ジシクロヘキシルアミン；トリブチルアミン；ピリジン；N-メチル、N-エチルアミン；ジエチルアミン；トリエチルアミン；モノ-、ビス-、またはトリス-(2-OH-低級アルキルアミン)、例えば、モノ-、ビス-、またはトリス-(2-ヒドロキシエチル)アミン、2-ヒドロキシ-tert-ブチルアミン、またはトリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン、N,N-ジ-低級アルキル-N(ヒドロキシル-低級アルキル)-アミン、例えば、N,N-ジメチル-N-(2-ヒドロキシエチル)アミンまたはトリ-(2-ヒドロキシエチル)アミン；N-メチル-D-グルカミン；ならびにアミノ酸、アルギニン、リジン等が挙げられる。「薬学的に許容される塩」という用語はまた、本発明の化合物の水和物を含む。

#### 【0318】

組成物は、有用な一態様では、非経口的に（例えば、筋肉内、腹腔内、静脈内、眼内、硝子体内、眼球後、結膜下、眼球鞘下、もしくは皮下への注射またはインプラントによって）または全身に投与される。非経口投与または全身投与の製剤としては、滅菌の水溶液または非水溶液、懸濁液、または乳剤が挙げられる。種々の水性担体、例えば、水、緩衝水溶液、生理食塩水等を使用することができる。他の適切なビヒクルの例としては、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、ゼラチン、ヒドロゲル、水素



化ナファレン ( n a p h a l e n e )、およびオレイン酸エチルなど注射可能な有機エステルが挙げられる。そのような製剤はまた、保存剤、湿潤剤、緩衝剤、乳化剤、および/または分散剤などの補助物質を含有することができる。生体適合性、生分解性のラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーは、有効成分の放出を制御するために用いることができる。

【 0 3 1 9 】

あるいは、組成物は経口摂取により投与することができる。経口使用を意図した組成物は、医薬組成物の製造技術分野で公知の任意の方法に従って、固体形態または液体形態で調製することができる。

【 0 3 2 0 】

10

経口投与のための固体剤形としては、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、および顆粒剤が挙げられる。一般に、これらの医薬品は、無毒な薬学的に許容される賦形剤と混合した有効成分を含有する。これらの例としては、不活性な希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、セルロース、デンプン、リン酸カルシウム、リン酸ナトリウム、カオリン等が挙げられる。結合剤、緩衝剤、および/または平滑剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウム) も用いることができる。さらに、腸溶性コーティングした錠剤および丸剤を調製することができる。組成物は、任意選択で、より美味な調製物を提供するために、甘味料、調味料、着色料、香料、および保存料を含有することができる。

【 0 3 2 1 】

20

固体剤形は眼障害の治療に有用になり得る。眼使用に有用な組成物には、薬学的に許容される賦形剤との混合で1つまたは複数のリガンド結合分子を含む錠剤が含まれる。これらの賦形剤は、例えば、不活性な希釈剤または充填剤 (例えば、スクロースおよびソルビトール)、平滑剤、流動促進剤、および抗接着剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、水素添加植物油、またはタルク) であってよい。

【 0 3 2 2 】

本発明の組成物は、眼の硝子体内注射によって、また結膜下および眼球鞘下注射によって眼内投与することができる。他の投与経路としては、経強膜、眼球後、腹腔内、筋肉内、および静脈内が挙げられる。あるいは、組成物は薬物送達装置または眼内インプラントを用いて投与することができる。

30

【 0 3 2 3 】

経口投与のための液体剤形としては、薬学的に許容される乳剤、溶液、懸濁液、シロップ剤、およびゼラチンカプセル剤が挙げられる。これらの剤形は、水または油媒体など、当技術分野で一般に知られている不活性な希釈剤を含有することができ、湿潤剤、乳化剤、および懸濁剤などの補助剤を含むこともできる。

【 0 3 2 4 】

一部の例では、組成物はまた、例えば、パッチによって、または血管新生障害に感受性のあるもしくはそれに冒されている上皮もしくは眼などの部位への直接適用によって、あるいはイオン導入法によって局所的に投与することができる。

40

【 0 3 2 5 】

本発明の併用療法の場合には、リガンド結合分子および1つまたは複数の追加の活性薬剤は、錠剤または他のビヒクルの中で混合してもよく、または分割してもよい。一例では、含有されるリガンド結合分子の放出前に追加の活性薬剤が放出されるように、リガンド結合分子は錠剤の内部に、追加の活性薬剤はその外側に含有される。

【 0 3 2 6 】

一実施形態では、リガンド結合分子 (および任意選択で1つまたは複数の追加の活性薬剤) を含む組成物は、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。一実施形態では、そのような賦形剤としては、以下に限定されるものではないが、緩衝剤、非イオン性界面活性剤、防腐剤、等張化剤、アミノ酸、糖、およびpH調整剤が挙げら

50

れる。適切な緩衝剤としては、以下に限定されるものではないが、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、および酢酸ナトリウムが挙げられる。適切な非イオン性界面活性剤としては、以下に限定されるものではないが、ポリソルベート20およびポリソルベート80などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルが挙げられる。適切な防腐剤としては、以下に限定されるものではないが、ベンジルアルコールが挙げられる。適切な等張化剤としては、以下に限定されるものではないが、塩化ナトリウム、マンニトール、およびソルビトールが挙げられる。適切な糖としては、以下に限定されるものではないが、 $\alpha$ -D-トレハロース脱水物が挙げられる。適切なアミノ酸としては、以下に限定されるものではないが、グリシンおよびヒスチジンが挙げられる。適切なpH調整剤としては、以下に限定されるものではないが、塩酸、酢酸、および水酸化ナトリウムが挙げられる。一実施形態では、pH調整剤は、約3~約8、約4~約7、約5~約6、約6~約7、または約7~約7.5のpHを提供するために有効な量で与えられる。一実施形態では、リガンド結合分子を含む組成物は防腐剤を含まない。別の実施形態では、リガンド結合分子を含む組成物は抗微生物剤を含まない。別の実施形態では、リガンド結合分子を含む組成物は静菌剤を含まない。

10

#### 【0327】

一実施形態では、リガンド結合分子（および任意選択で1つまたは複数の追加の活性薬剤）を含む組成物は、注射に適した水溶液の形態である。一実施形態では、組成物は、リガンド結合分子、緩衝剤、pH調整剤、および注射用水を含む。別の実施形態では、組成物は、リガンド結合分子、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、塩酸、および水酸化ナトリウムを含む。別の実施形態では、組成物は、リガンド結合分子、リン酸塩（例えば、リン酸二水素ナトリウム）、トレハロース、塩化ナトリウム、およびポリソルベートを含む。

20

#### 【0328】

眼に関して本発明の方法を実施するために有用な水性組成物は、眼に適合するpHおよび重量オスモル濃度を有する。1つまたは複数の眼に許容されるpH調整剤および/または緩衝剤、例えば、酢酸、ホウ酸、クエン酸、乳酸、リン酸、および塩酸などの酸；水酸化ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、および乳酸ナトリウムなどの塩基；ならびにクエン酸塩/デキストロース、炭酸水素ナトリウム、および塩化アンモニウムなどの緩衝剤は、本発明の組成物に含むことができる。そのような酸、塩基、および緩衝剤は、眼に許容される範囲に組成物のpHを維持するために必要な量で含まれる。1つまたは複数の眼に許容される塩は、眼に許容される範囲に組成物の重量オスモル濃度をもたらすために十分な量で組成物に含むことができる。そのような塩としては、ナトリウム、カリウム、またはアンモニウムのカチオン、および塩化物、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、ホウ酸塩、リン酸塩、重炭酸塩、硫酸塩、チオ硫酸塩、または亜硫酸水素塩のアニオンを有するものが挙げられる。

30

#### 【0329】

一部の実施形態では、本発明のリガンド結合分子を含む組成物は、被験体の眼への送達用に製剤化される。適切な眼科用担体は、当業者に公知であり、そのような従来の担体はすべて本発明で用いることができる。眼組織または付属器組織への局所組成物の経皮送達を促進および推進するために組み込まれる例示的な化合物としては、以下に限定されるものではないが、アルコール（エタノール、プロパノール、およびノナノール）、脂肪アルコール（ラウリルアルコール）、脂肪酸（吉草酸、カプロン酸、およびカプリン酸）、脂肪酸エステル（ミリスチン酸イソプロピルおよびn-ヘキサン酸イソプロピル）、アルキルエステル（酢酸エチルおよび酢酸ブチル）、ポリオール（プロピレングリコール、プロパンジオン、およびヘキサントリオール）、スルホキシド（ジメチルスルホキシドおよびデシルメチルスルホキシド）、アミド（尿素、ジメチルアセトアミド、およびピロリドン誘導体）、界面活性剤（ラウリル硫酸ナトリウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、ポラキサマー（polaxamer）、スパン、トウイーン、胆汁酸塩、およびレシチン）、テルペン（d-リモネン、 $\alpha$ -テルペノール、1,8-シネオール、およびメントン

40

50

）、ならびにアルカノン（N - ヘプタンおよびN - ノナン）が挙げられる。さらに、局所投与される組成物は、以下に限定されるものではないが、カドヘリンアンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、およびインテグリンアンタゴニストを含む、表面接着分子調節剤を含む。したがって、特定の担体は、滅菌の眼軟膏、クリーム、ゲル、溶液、または分散液の形態を取り得る。適切な眼科用担体として含まれるものには、除放性ポリマー、例えば「Ocuser t」ポリマー、「Hydron」ポリマー等もある。

#### 【0330】

本製剤で用いることができる例示的な眼科用粘性促進剤としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム；メチルセルロース；ヒドロキシプロピルセルロース；ヒドロキシプロピルメチルセルロース；ヒドロキシエチルセルロース；ポリエチレングリコール300；ポリエチレングリコール400；ポリビニルアルコール；およびプロピドンが挙げられる。

10

#### 【0331】

ビーガム、アルギネート、キサンタンガム、ゼラチン、アラビアゴム、およびトラガカントなど、天然物の一部も、点眼液の粘性を増大させるために用いることができる。

#### 【0332】

低張の点眼剤は角膜の浮腫を引き起こし、高張の点眼剤は角膜の変形を引き起こすので、浸透圧は重要である。理想的な浸透圧は、約300 mO s Mである。浸透圧は、当業者に公知のRemington: The Science and Practice of Pharmacyに記載の方法によって達成することができる。

20

#### 【0333】

安定剤、例えばキレート剤、例えばEDTAなども用いることができる。抗酸化剤、例えば、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、8 - ヒドロキシキノリン、またはアスコルビン酸も用いることができる。滅菌状態は、典型的には、従来の眼科用防腐剤、例えば、水性製剤についてはチオルブタノール（chlorbutanol）、塩化ベンザルコニウム、塩化セチルピリジニウム、フェニル第二水銀塩、チメロサル等によって維持され、これらは、無毒であり、かつ一般に、水溶液の約0.001 ~ 約0.1重量%の範囲で変動する量で用いられる。軟膏剤用の従来の防腐剤としては、メチルパラベンおよびプロピルパラベンが挙げられる。典型的な軟膏基剤としては、白色ワセリン、鉱油、または流動パラフィンが挙げられる。しかしながら、防腐済み水性担体が好ましい。溶液は、適切な剤形（例えば点眼剤）で眼に手作業で送達することも、典型的には一定量の薬剤を供給する、適切な微小滴または噴霧装置により送達することもできる。適切な眼科用担体の例としては、微量、すなわち約5重量%未満でヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、グリセリン、およびEDTAを含有する、滅菌状態で実質的に等張の水溶液が挙げられる。溶液は、好ましくは、従来の緩衝剤（例えば、リン酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩、トリス）の適切な量によって、実質的に中性のpHでかつ等張に維持される。

30

#### 【0334】

一部の実施形態では、浸透促進剤が眼科用担体に加えられる。

#### 【0335】

目的とする治療用途に有効となるリガンド結合分子の量は、本明細書に基づく標準的な臨床技術により決定することができる。加えて、任意選択で、最適な投薬量範囲の同定を補助するためにin vitroアッセイを用いることができる。単回投薬量を生成するために担体物質と混合されるリガンド結合分子の量は、治療される哺乳動物および特定の投与方法に応じて異なり得る。

40

#### 【0336】

リガンド結合分子の投薬量は、症状の重症度、症状の治療であるか予防であるか、ならびに治療される人の年齢、体重、および健康状態を含む、いくつかの要因に依存し得る。加えて、特定の患者に関する薬理ゲノミクス（治療剤の薬物動態学、薬力学、または効力プロファイルに対する遺伝子型の影響）情報が、使用される投薬量に影響を与える場合も

50

ある。さらに、正確な個体投薬量は、施される特定の併用療法、投与時間、投与経路、製剤の性質、排泄速度、治療される特定の疾患（例えば、治療される特定の眼障害）、障害の重症度、および血管新生障害の解剖学的位置を含む、種々の要因に応じていくぶん調節することができる。投薬量のある程度の変動は予想され得る。

#### 【0337】

一般に、哺乳動物に経口投与される場合、本発明のリガンド結合分子の投薬量は、通常、 $0.001\text{ mg/kg/day} \sim 100\text{ mg/kg/day}$ 、 $0.01\text{ mg/kg/day} \sim 50\text{ mg/kg/day}$ 、または $0.1\text{ mg/kg/day} \sim 10\text{ mg/kg/day}$ である。一般に、ヒトに経口投与される場合、本発明のアンタゴニストの投薬量は、通常、1日当たり $0.001\text{ mg} \sim 300\text{ mg}$ 、1日当たり $1\text{ mg} \sim 200\text{ mg}$ 、または1日当たり $5\text{ mg} \sim 50\text{ mg}$ である。1日当たり $200\text{ mg}$ までの投薬量が必要になる場合もある。

10

#### 【0338】

非経口注射による本発明のアンタゴニストの投与については、投薬量は、通常、1日当たり $0.1\text{ mg} \sim 250\text{ mg}$ 、1日当たり $1\text{ mg} \sim 20\text{ mg}$ 、または1日当たり $3\text{ mg} \sim 5\text{ mg}$ である。注射は、毎日4回まで行うことができる。

#### 【0339】

一般に、経口的または非経口的に投与される場合、本発明で使用されるリガンド結合分子の投薬量は、通常、1日当たり $0.1\text{ mg} \sim 1500\text{ mg}$ 、または1日当たり $0.5\text{ mg} \sim 10\text{ mg}$ 、または1日当たり $0.5\text{ mg} \sim 5\text{ mg}$ である。1日当たり $3000\text{ mg}$ までの投薬量を投与することができる。

20

#### 【0340】

ヒトに対して眼科的に、例えば硝子体内に投与される場合、1投与当たり1眼当たりのリガンド結合分子の投薬量は、通常、 $0.003\text{ mg}$ 、 $0.03\text{ mg}$ 、 $0.03\text{ mg}$ 、 $0.1\text{ mg}$ 、もしくは $0.5\text{ mg} \sim 5.0\text{ mg}$ 、 $4\text{ mg}$ 、 $3\text{ mg}$ 、 $2\text{ mg}$ 、もしくは $1\text{ mg}$ の範囲、または $0.5\text{ mg} \sim 1.0\text{ mg}$ である。リガンド結合分子の投薬量は、通常、1投与当たり1眼当たり $0.003\text{ mg} \sim 5.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $0.03\text{ mg} \sim 4.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $0.1\text{ mg} \sim 4.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $0.03\text{ mg} \sim 3.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $0.1\text{ mg} \sim 3.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $0.1\text{ mg} \sim 1.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $0.5\text{ mg} \sim 4.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $0.5\text{ mg} \sim 3.0\text{ mg}$ 、1投与当たり1眼当たり $0.5\text{ mg} \sim 2.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $1.0\text{ mg} \sim 4.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $1.0\text{ mg} \sim 3.0\text{ mg}$ 、または1投与当たり1眼当たり $1.0\text{ mg} \sim 2.0\text{ mg}$ の範囲である。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、1眼当たり1投与当たり約 $1\text{ mg}$ 、または約 $2\text{ mg}$ 、または約 $3\text{ mg}$ 、または約 $4\text{ mg}$ 、または約 $5\text{ mg}$ 、または約 $6\text{ mg}$ の濃度で投与される。リガンド結合分子は、一部の実施形態では、 $10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $15\text{ }\mu\text{L}$ 、 $20\text{ }\mu\text{L}$ 、 $25\text{ }\mu\text{L}$ 、 $30\text{ }\mu\text{L}$ 、 $35\text{ }\mu\text{L}$ 、 $40\text{ }\mu\text{L}$ 、 $45\text{ }\mu\text{L}$ 、 $50\text{ }\mu\text{L}$ 、 $60\text{ }\mu\text{L}$ 、 $70\text{ }\mu\text{L}$ 、 $80\text{ }\mu\text{L}$ 、 $90\text{ }\mu\text{L}$ 、 $95\text{ }\mu\text{L}$ 、または $100\text{ }\mu\text{L}$ の容量で、上記に記載の濃度の何れかで存在する。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、約 $2 \sim 4\text{ mg} / 50\text{ }\mu\text{L}$ の濃度で投与される。投薬容量は、1眼当たり $0.01\text{ mL} \sim 0.2\text{ mL}$ 投与、または $0.03\text{ mL} \sim 0.15\text{ mL}$ 投与、または $0.05\text{ mL} \sim 0.10\text{ mL}$ 投与の範囲とすることができる。

30

40

#### 【0341】

一部の実施形態では、硝子体内注射により投与される場合、リガンド結合分子は、1眼当たり約 $2\text{ mg} \sim 4\text{ mg}$ （または1眼当たり約 $1\text{ mg} \sim 3\text{ mg}$ 、または約 $1\text{ mg} \sim 4\text{ mg}$ 、または約 $3\text{ mg} \sim 4\text{ mg}$ 、または約 $1\text{ mg} \sim 2\text{ mg}$ ）の濃度で投与される。一部の実施形態では、リガンド結合分子は、1眼当たり約 $1\text{ mg}$ 、または約 $2\text{ mg}$ 、または約 $3\text{ mg}$ 、または約 $4\text{ mg}$ 、または約 $5\text{ mg}$ 、または約 $6\text{ mg}$ の濃度で投与される。リガンド結合分子は、一部の実施形態では、 $10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $15\text{ }\mu\text{L}$ 、 $20\text{ }\mu\text{L}$ 、 $25\text{ }\mu\text{L}$ 、 $30\text{ }\mu\text{L}$ 、 $35\text{ }\mu\text{L}$ 、 $40\text{ }\mu\text{L}$ 、 $45\text{ }\mu\text{L}$ 、 $50\text{ }\mu\text{L}$ 、 $60\text{ }\mu\text{L}$ 、 $70\text{ }\mu\text{L}$ 、 $80\text{ }\mu\text{L}$ 、 $90\text{ }\mu\text{L}$ 、 $95\text{ }\mu\text{L}$ 、または $100\text{ }\mu\text{L}$ の容量で、上記に記載の濃度の何れかで存在する。

50

一部の実施形態では、リガンド結合分子は、約 2 ~ 4 mg / 50 µl の濃度で投与される。

#### 【0342】

一般に、静脈内投与に適した投薬量範囲は、キログラム体重当たり約 50 ~ 5000 マイクログラムの活性化化合物である。鼻腔内投与に適した投薬量範囲は、一般に、約 0.01 pg / kg 体重 ~ 1 mg / kg 体重である。有効用量は、*in vitro* または動物モデル試験系から得られる用量応答曲線から外挿することができる。

#### 【0343】

全身投与の場合、治療有効用量は、*in vitro* アッセイから最初に評価することができる。例えば、細胞培養で決定された IC50 を含む循環濃度を達成するように、動物モデルで用量を処方することができる。そのような情報を用いて、ヒトに有用な用量をより正確に決定することができる。初期用量も、当技術分野で周知の技術を用いて、*in vivo* データ、例えば動物モデルから評価することができる。当業者は、動物データに基づいて、ヒトへの投与を容易に最適化することができる。

10

#### 【0344】

投薬の量および間隔は、治療効果を維持するために十分な化合物血漿レベルを提供するように個々に調節することができる。局所投与または選択的摂取の場合には、化合物の有効局所濃度は血漿濃度に関連しない可能性がある。当業者は、過度に実験することなく、治療上有効な局所投薬量を最適化することができる。

#### 【0345】

20

投与される化合物の量は、当然、治療される被験体、被験体の体重、病気の重症度、投与様式、および処方医師の判断に応じて異なることになる。治療は、症候が検出可能である間、または症候が検出可能でない場合でも、断続的に繰り返すことができる。治療は、単独でまたは他の薬物と併用して施すことができる。

#### 【0346】

リガンド結合分子および併用療法の場合の追加の薬剤の投与は、独立して、1日に1回 ~ 4回、または1ヶ月に1回 ~ 4回、または1年に1回 ~ 6回、または2年、3年、4年、もしくは5年ごとに1回とすることができる。投与は、1日、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年、2年、3年の期間、また患者の生涯にわたっても行うことができる。一実施形態では、投与は3ヶ月間毎月1回行なわれる。常習的な長期投与は多くの症例で指示される。投薬は、単回用量としてまたは複数回用量に分割して行うことができる。一般に、所望の投薬は、数ヶ月または数年以上のより長い投与期間が必要となる場合もあるが、通常は少なくとも数週間または数ヶ月にわたる期間、一定間隔で行うべきである。

30

#### 【0347】

既存の障害を治療することに加えて、組成物は、これらの障害の発症を防止または遅延させるために予防的に投与することができる。予防的な用途では、組成物は、眼障害などの特定の障害に罹患しやすいかまたはそのリスクのある患者に投与することができる。

#### 【0348】

投与経路

40

本明細書に記載するリガンド結合分子を含有する組成物は、投与される薬剤タイプならびに患者の病歴、リスクファクター、および症候に部分的に依存する種々の手段によって、患者に投与することができる。本発明の方法に適した投与経路は、局所投与と全身投与の両方を含む。本明細書で使用する場合、「全身投与」という用語は、基本的に患者の全身に医薬組成物を送達させる投与方法を意味する。全身投与の例示的な方法としては、限定されるものではないが、静脈内注射および経口投与が挙げられる。「局所投与」という用語は、本明細書で使用する場合、眼（または腫瘍もしくは他の標的組織）から遠位の領域よりも眼（または腫瘍もしくは他の標的組織）またはその周辺に、顕著に多くの医薬組成物の送達をもたらす投与方法を意味する。

#### 【0349】

50

本発明の方法に有用な全身および局所の投与経路には、限定されるものではないが、経口胃管栄養；静脈内注射；腹腔内注射；筋肉内注射；皮下注射；経皮拡散および電気泳動；局所用の点眼剤および軟膏剤；結膜下注射を含む眼周囲および眼内の注射；局所的にインプラントされる持続放出装置を含む持続放出送達装置；ならびに生体内分解性でリザーバーベースのインプラントを含む、眼内および眼周囲のインプラントが包含される。

#### 【0350】

したがって、一態様では、網膜血管新生に関連した眼障害を治療する方法は、リガンド結合分子の被験体への局所投与により実行される。例えば、一部の実施形態では、リガンド結合分子を含む医薬組成物は、局所的にもしくは局所注射（例えば、眼内注射、例えば硝子体内注射）により投与されるか、または生体内分解性もしくはリザーバーベースのインプラントなどの眼内もしくは眼周囲のインプラントから放出される。組成物は、好ましくは、被験体の眼において、眼の細胞または眼の脈管で発現されるVEGFR-2および/またはVEGFR-3へのVEGF-Cおよび/またはVEGF-Dの結合もしくは刺激を阻害するために有効な量で投与される。

10

#### 【0351】

併用療法の場合には、リガンド結合分子および追加の薬剤の投与は、時間内に逐次的にまたは同時に行うことができる。逐次的に投与される場合、それぞれの投与は同じ経路であっても異なる経路であってもよい。一実施形態では、追加の薬剤（例えば、VEGF-AまたはPDGF阻害物質製剤）は、リガンド結合分子の投与の90日、30日、10日、5日、24時間、1時間、30分、10分、5分、または1分以内に投与される。追加の薬剤がリガンド結合分子の前に投与される場合、リガンド結合分子は、時間内に、かつ追加の薬剤とリガンド結合分子の合計量が標的適応症、例えば眼障害の治療または予防に有効になるような量で投与される。リガンド結合分子が追加の薬剤の前に投与される場合、追加の薬剤は、時間内に、かつ追加の薬剤とリガンド結合分子の合計量が標的適応症、例えば眼障害の治療または予防に有効になるような量で投与される。

20

#### 【0352】

本発明に記載の医薬組成物は、リガンド結合分子および任意選択で併用療法における追加の薬剤を、放出制御製剤を用いて、実質的に投与直後にまたは投与後任意の所定時間に放出するように製剤化することができる。例えば、医薬組成物は徐放性製剤で提供することができる。即時放出性組成物または徐放性組成物の使用は、治療される症状の性質に依存する。症状が急性障害からなる場合には、即時放出形態が持続性放出組成物よりも利用されることが多くなり得る特定の予防または長期間治療の場合には、除放性組成物もまた適切になり得る。

30

#### 【0353】

単独または併用の何れかでのリガンド結合分子が、(i)狭い治療係数（例えば、有害な副作用または毒性反応をもたらす血漿濃度と治療効果をもたらす血漿濃度との間の差が小さい；一般に、治療係数(TI)は、半有効量(ED50)に対する半致死量(LD50)の比として定義される）；(ii)胃腸管における狭い吸収ウィンドウ；または(iii)短い生物学的半減期（その結果、血漿レベルを治療レベルに維持するために一日中の頻繁な投薬が必要になる）を有する場合、放出制御製剤におけるリガンド結合分子またはリガンド結合分子と1つまたは複数の追加の薬剤の両方の投与が有用となり得る。

40

#### 【0354】

放出速度が活性成分の分解速度または代謝速度よりも速い放出制御を得るために、多くの戦略を追求することができる。例えば、放出制御は、例えば適切な放出制御組成およびコーティングを含む、製剤パラメーターおよび成分の適切な選択によって得ることができる。例としては、単回または複数回の単位錠剤またはカプセル剤組成物、油剤、懸濁剤、乳剤、マイクロカプセル、マイクロスフェア、ナノ粒子、パッチ、およびリポソームが挙げられる。このような除放性製剤または放出制御製剤を調製するための方法は、当技術分野で周知である。

#### 【0355】

50

リガンド結合分子および存在する場合追加の薬剤はまた、インプラントなどの薬物送達装置を用いて送達することができる。本明細書で使用する場合、「インプラント」という用語は、インプラントされた後挿入部位からあまり移動しない任意の物質を指す。インプラントは、生分解性材料、非生分解性材料、または生分解性と非生分解性の両方の材料で構成することができる。非生分解性のインプラントは、所望により、補充可能なリザーバーを含むことができる。本発明の方法に有用なインプラントは、例えば、パッチ、粒子、シート、ブランク、マイクロカプセル等を含み、限定されるものではないが、後眼房、前眼房、脈絡膜上、または結膜下であり得る、選択された挿入部位に適合する任意の形状およびサイズを有し得る。本発明に有用なインプラントは、一般に、長期間にわたり、患者の眼に有効量で、インプラントされた医薬組成物を放出すると理解されている。眼放出に適した種々の眼のインプラントおよび持続放出性製剤は、例えば、その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,869,079号明細書および同第5,443,505号明細書に記載されるように、当技術分野で周知である。眼の薬物送達装置は、前眼房または後眼房などの眼の房に挿入することができるか、または強膜、脈絡膜腔、もしくは硝子体液の外側の無血管化された領域の中もしくはその上にインプラントすることができる。一実施形態では、インプラントは、リガンド結合分子および任意の追加の薬剤の所望の治療部位、例えば眼の眼内腔および斑への経強膜拡散が可能になるように、強膜上など無血管領域上に位置させることができる。さらに、経強膜拡散の部位は、斑に近位の部位など血管新生部位に近位であり得る。適切な薬物送達装置は、例えば米国特許出願公開第2008/0286334号明細書；同第2008/0145406号明細書；同第2007/0184089号明細書；同第2006/0233860号明細書；同第2005/0244500号明細書；同第2005/0244471号明細書；および同第2005/0244462号明細書、ならびに米国特許第6,808,719号明細書および同第5,322,691号明細書に記載されており、これらのそれぞれの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0356】

他の実施形態では、本明細書に記載するリガンド結合分子はリボソームを介して眼に適用される。さらに別の実施形態では、リガンド結合分子は、連続的放出装置または選択的放出装置、例えば、以下に限定されるものではないが、Ocuser System (Alza Corp., Palo Alto, Calif.) で用いられるものなどの膜の中に含有される。追加の実施形態として、リガンド結合分子は、眼の上に置かれたコンタクトレンズの中に含有されるか、それによって担持されるか、またはそれに付着される。さらに別の実施形態では、リガンド結合分子は、眼の表面に適用することができるスワブまたはスポンジの中に含有される。本発明の別の実施形態は、眼の表面に適用することができる液体噴霧剤の中に含有されたリガンド結合分子を含む。

#### 【0357】

一実施形態では、インプラントは、生分解性ポリマーマトリックス中に分散されたりリガンド結合分子および任意選択で、存在する場合の追加の薬剤を含む。マトリックスは、PLGA (ポリ乳酸-ポリグリコール酸コポリマー)、エステル末端キャッピングされたポリマー、またはそれらの混合物を含む。別の実施形態では、インプラントは、リガンド結合分子および任意選択で、存在する場合の追加の薬剤、界面活性剤、ならびに親油性化合物を含む。親油性化合物は、インプラントの約80~99重量%の量で存在させることができる。適切な親油性化合物としては、以下に限定されるものではないが、グリセリルパルミトステアレート、ジエチレングリコールモノステアレート、プロピレングリコールモノステアレート、グリセリルモノステアレート、グリセリルモノリノレート、グリセリルモノオレート、グリセリルモノパルミテート、グリセリルモノラウレート、グリセリルジラウレート、グリセリルモノミリステート、グリセリルジミリステート、グリセリルモノパルミテート、グリセリルジパルミテート、グリセリルモノステアレート、グリセリルジステアレート、グリセリルモノオレート、グリセリルジオレート、グリセリルモノリノレート、グリセリルジリノレート、グリセリルモノアラキデート、グリセリルジアラキデ

ート、グリセリルモノベヘネート、グリセリルジベヘネート、およびそれらの混合物が挙げられる。別の実施形態では、インプラントは、中空のスリーブの中に収容されるリガンド結合分子および任意選択で、存在する場合の追加の薬剤を含む。リガンド結合分子および任意選択で、存在する場合の追加の薬剤は、眼の中にスリーブを挿入し、スリーブから眼の中にインプラントを放出させ、次いで、スリーブを眼から取り出すことによって、眼に送達される。この送達装置の一例が、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2005/0244462号明細書に記載されている。

#### 【0358】

一実施形態では、インプラントは、リガンド結合分子および任意選択で、存在する場合の追加の薬剤の眼の中への制御された持続性放出に適合したフレキシブルな眼用挿入装置である。一実施形態では、この装置は、リガンド結合分子および任意選択で、存在する場合の追加の薬剤を含有するロッドまたはチューブの形態で、かつ本体から放射状に外側に伸びる、少なくとも2つの繫留用突出部を有する、ポリマー材料の細長い本体を含む。装置の長さは、少なくとも8mmとすることができ、突出部を含むその本体部分の直径は1.9mmを超えない。徐放性機序は、例えば、拡散によるものであっても、浸透もしくは生侵食によるものであってもよい。挿入装置は、円蓋解剖学による眼の移動に依存しないように、眼の上部円蓋または下部円蓋に挿入することができる。突出部は、例えば、肋骨、ねじ山、くぼみまたは隆起、円錐台形セグメントまたは巻線組紐セグメント(winding braid segment)などの種々の形状であり得る。さらなる実施形態では、本体のポリマー材料は、液体環境で膨潤するものとして選択される。したがって、最初のサイズがより小さい装置を用いることができる。挿入装置は、上部円蓋または下部円蓋の中に挿入すると、長期の使用にわたり、その場所に十分保持され、またレシピエントにより気づかれないように視野の外側に存続するようなサイズおよび配置にすることができる。この装置は、上部円蓋または下部円蓋の中に7~14日間以上保持することができる。この装置の一例は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,322,691号明細書に記載されている。

#### 【0359】

別の態様では、リガンド結合分子の被験体への局所投与により実行される腫瘍を有すると診断された被験体における血管新生を阻害する方法。例えば、一部の実施形態では、リガンド結合分子を含む医薬組成物は、腫瘍に対して、または腫瘍が外科的に除去された器官もしくは組織に対して、局所投与される。そのような実施形態では、組成物は、好ましくは、腫瘍における血管新生を阻害するために有効な量で投与される。

#### 【0360】

リガンド結合分子が核酸分子である例では、核酸分子を含有する医薬組成物の投与は、遺伝子治療の技術分野で周知の数多くの方法の1つを用いて行なうことができる。そのような方法としては、以下に限定されるものではないが、レンチウイルス形質転換、アデノウイルス形質転換、サイトメガロウイルス形質転換、マイクロインジェクション、およびエレクトロポレーションが挙げられる。

#### 【0361】

キットおよび単位用量

本発明はまた、1つまたは複数の医薬組成物および使用説明書を含むキットに関する。リガンド結合分子は、同時投与を可能にするように、別のリガンド結合分子または本明細書に記載する他の治療剤と一緒に、例えばキットもしくはパッケージの中に、または単位用量でパッケージされても製剤化されてもよく；これらの2つの成分は、一緒に(すなわち、混合して)、または別個の組成物で(すなわち、混合しないで)、かつ個々の投薬量で製剤化することができる。キットの組成物のそれぞれは、容器に含有することができる。一部の実施形態では、キット/単位用量の2つの成分は、本明細書に記載する障害および疾患の1つを治療するためのヒト被験体への2つの化合物の投与のための説明書と一緒にパッケージされる。

#### 【0362】



キットは容器を含むことができる。容器は成分を分離するために用いることができ、例えば、分割ボトルまたは分割ホイルパッケージを含む。別個の組成物はまた、所望により、単一の非分割容器の中に含有することができる。キットはまた、成分の投与のための指示を含むことができる。別個の成分が異なる剤形で投与され、異なる投薬レベルで投与される場合、または個々のアンタゴニストの用量設定が望ましい場合、キットは特に有利になる。

#### 【0363】

本明細書に記述のすべての刊行物および特許は、あたかも個々の刊行物または特許がそれぞれ、具体的かつ個別に参照により組み込まれるように指示されたかのように、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。矛盾がある場合は、本出願が、本明細書のいかなる定義も含めて、優先するものとする。

10

#### 【実施例】

#### 【0364】

実施例1 - VEGFRタンパク質のECDフラグメント

VEGF-Cおよび/またはVEGF-Dおよび/またはVEGF-Aなどの標的リガンドへの結合に有効である、VEGFR-3および/またはVEGFR-2および/またはVEGFR-1のフラグメントおよび変異体および融合体を特徴づけるために実験を実施した。国際公開第2005/087808号パンフレット、国際公開第2005/000895号パンフレット、国際公開第2006/088650号パンフレット、国際公開第2006/099154号パンフレット、国際公開第2004/106378号パンフレット、国際公開第2005/123104号パンフレット、および米国特許第7,855,178号明細書を参照のこと。これらのすべては、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。これらの試験から、これらの受容体のECDを短縮することができること、さらに、異なる受容体からのドメインを再結合してリガンド結合分子を形成させることができることが実証される。

20

#### 【0365】

実施例2 - VGX-301 - N2リガンド結合分子の作製

VEGFR-3(「VGX-300」としても本明細書で言及される)のIg様ドメインI~IIIを含むリガンド結合分子を、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれるMakinen et al., Nat. Med., 7:199-205, 2001に記載されるように調製した。

30

#### 【0366】

VGX-300分子の重要な特徴は、それが12個の糖鎖付加部位; 2×6個の潜在的なN連結糖鎖付加部位、各受容体フラグメント(VEGFR-3のIg様ドメイン、I、II、およびIII)上に5個および各Fc領域 鎖上に1個を含有することである。O連結糖鎖付加についての証拠はない。

#### 【0367】

糖鎖付加特性はPKに影響を及ぼし得るが、FcグリカンはPKにほとんど影響を及ぼさない(Jones et al., Glycobiology, 17(5), 2007 pp. 529-540)。手短に言えば、アシアロ糖タンパク質受容体は、2つ以上のシアル酸が欠如し、内在するガラクトース(Gal)残基が末端の糖になる複合体型N連結グリカン構造に結合する。加えて、マンノース(Man)受容体は、高-Man N連結グリカンおよび末端N-アセチルグルコサミン(tGlcNAc)残基を認識する。これらの受容体は両方とも、タンパク質の迅速な代謝クリアランスを引き起こすことができる。

40

#### 【0368】

いずれの糖鎖付加部位が生成物活性にとって重要であるかを同定するために、5個の推定上のN連結部位のそれぞれを順次欠失させることを試みた。5個のN連結グリカン(N-Q)のそれぞれについてのコンセンサス結合配列を破壊するために、5つのプライマーペアを用いてVGX-300コード領域に単一突然変異を導入した。

50

## 【 0 3 6 9 】

用いたプライマーペアは以下のとおりである：

N 1 センス：

5' GACCCCCCGACCTTGCAGATCACGGAGGAGTCACAC 3'

( 配列番号 1 2 )

N 1 アンチセンス：

5' GTGTGACTCCTCCGTGATCTGCAAGGTCGGGGGGGTC 3'

( 配列番号 1 3 )

N 2 センス：

5' CTGCACGAGGTACATGCCCAGGACACAGGCAGCTACGTC 3'

( 配列番号 1 4 )

N 2 アンチセンス：

5' GACGTAGCTGCCTGTGTCCTGGGCATGTACCTCGTGCAG 3'

( 配列番号 1 5 )

N 3 センス：

5' GTCCATCCCCGGCCTCCAAGTCACGCTGCGCTCGC 3'

( 配列番号 1 6 )

N 3 アンチセンス：

5' GCGAGCGCAGCGTGACTTGGAGGCCGGGGATGGAC 3'

( 配列番号 1 7 )

N 4 センス：

5' GGGAGAAGCTGGTCCTCCAGTGCACCGTGTGGGCTGA 3'

( 配列番号 1 8 )

N 4 アンチセンス：

5' TCAGCCCACACGGTGCACTGGAGGACCAGCTTCTCCC 3'

( 配列番号 1 9 )

N 5 センス：

5' AGCATCCTGACCATCCACCAGGTCAGCCAGCACGACCT 3'

( 配列番号 2 0 )

N 5 アンチセンス：

5' AGGTCGTGCTGGCTGACCTGGTGGATGGTCAGGATGCT 3'

( 配列番号 2 1 )

## 【 0 3 7 0 】

突然変異の存在を配列決定により確認し、その後、プラスミドベクターを 2 9 3 T 細胞 ( H E K ) に一過性にトランスフェクトした。培養物試料をウエスタンブロットにより分析した。次いで、生存可能なコンストラクトを一過性の懸濁液適合 2 9 3 F 細胞 ( H E K ) に進め、上澄液を P r o S e p A クロマトグラフィーおよびゲル濾過により精製し、さらに酵素結合免疫吸着測定法 ( E L I S A ) および B a F / 3 バイオアッセイにより試験して収率および活性を測定した。下記の表 3 に、得られた突然変異体それぞれの発現データおよび活性を要約する。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 7 1 】

表 3.

突然変異体	ゲル濾過プロファイル	収率	活性	
			ELISA	BaF/3
親	単量体は明白、一部凝集物	高	基準	基準
ΔN1	単量体は明白、かなりの凝集物	低	親より 1log 以上低い	親より 1log 以上低い
ΔN2	単量体は明白、一部凝集物	高	親と同等	親と同等
ΔN3	激しい凝集	低	親より 1log 以上低い	親より 1log 以上低い
ΔN4	一部の単量体は明白、かなりの凝集物	低	親より 1log 以上低い	親より 1log 以上低い
ΔN5	一部の単量体は明白、かなりの凝集物	低	親より 1log 以上低い	親より 1log 以上低い

10

## 【 0 3 7 2 】

表 3 では、N 2 突然変異体（「V G X - 3 0 1 - N 2」とも本明細書では呼ばれる）のみが、親分子（すなわち、V G X - 3 0 0）に比較して好ましい発現および活性特性を示した。V G X - 3 0 1 - N 2 および親 V G X - 3 0 0 を、一過性発現により C H O 細胞および H E K 細胞で生成させ、各分子の薬物動態（P K）を以下のように調べた。スプラグドローリーラットを、各実験において化合物ごとに 2、3、または 5 の何れかの群に割り当てた。各群のラットに、V G X - 3 0 0 または V G X - 3 0 1 - N 2 を、ボラス注射としての静脈内投与により 1 m g / k g の用量濃度で単回投与した。暫定の血液試料を、- 1 日目（投与前）および最初の処置後 5 分～14 日の範囲にある、合計 12 回の投与後時点で側尾静脈穿刺により採取した。各血液試料から血清試料を調製し、定量的 V E G F - C リガンド捕捉 E L I S A を用いて試験し、各化合物の循環濃度を決定した。次いで、これらの分析結果を用いて、薬物動態学パラメーターを算出した。V G X - 3 0 0 および V G X - 3 0 1 - N 2 の P K データを、下記の表 4 に示す。

20

30

## 【 0 3 7 3 】

表 4.

化合物	用量 (mg/kg)	AUC <sub>0～最後/用量</sub> (hr*ng/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>1/2</sub> (el) (hr)
一過性 CHO 発現(実験 1)				
VGX-300	1	15,115	5,702	16.9
VGX-301-ΔN2	1	23,236	12,076	22.6
一過性 CHO 発現(実験 2)				
VGX-300	1	35,310	16,000	46
VGX-301-ΔN2	1	55,071	20,000	42
一過性 HEK 発現				
VGX-300	1	18,738	8,500	6.4
VGX-301-ΔN2	1	90,750	13,250	15.3

40

## 【 0 3 7 4 】

P K 曲線を図 1 に示しているが、表 4 のデータから、V G X - 3 0 1 - N 2 は、同じ発現系で生成した V G X - 3 0 0 との比較によって、P K に対して有益な効果を有し得ることが示された。

## 【 0 3 7 5 】

実施例 3 - V G X - 3 0 1 - N 2 は V E G F - C および V E G F - D に結合する

50

VEGF-CおよびVEGF-DへのVGX-300およびVGX-301-Nの結合の特異性を決定するために、VEGF-CまたはVEGF-D ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) をELISAプレート上にプレコーティングし、捕捉抗原として用いた。濃度漸増させたVGX-300またはVGX-301-N ( $0 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ ) の何れかをプレートに加え、テトラメチルベンジジン基質キットを用いて、ウサギ抗ヒトIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートにより検出した。結果は、VGX-300およびVGX-301-Nは両方とも、VEGF-CとVEGF-Dの両方に結合することを示した。図2を参照されたい。驚くべきことに、VGX-301-N2は、VGX-300よりも両方のリガンドに対して強力に結合することが実証された。

【0376】

10

実施例4 - VGX-300およびVGX-301-N2の結合親和性

VGX-300またはVGX-301-N2に対するVEGF-CおよびVEGF-Dの結合を、Protein XPR36バイオセンサー (Bio-Rad) を用いて実施した表面プラズモン共鳴 (SPR) により分析した。VGX-300またはVGX-301-N2の何れかをGLMセンサチップ上に固定されたプロテインG'上で捕捉し、VEGF-CまたはVEGF-Dに対する分子の親和性を測定した。親和性実験の結果を下記の表5に示す。

【0377】

表5.

20

	ヒト VEGF-C		
	$k_a(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) \times 10^6$	$K_d(\text{s}^{-1}) \times 10^{-5}$	$K_D(\text{pM})$
<b>VGX-300</b>	2.18±0.05	1.11±0.12	<b>5.1±0.6</b>
<b>VGX-301-ΔN2</b>	2.79±0.04	1.03±0.08	<b>3.7±0.3</b>
	ヒト VEGF-D		
	$k_a(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) \times 10^6$	$K_d(\text{s}^{-1}) \times 10^{-5}$	$K_D(\text{pM})$
<b>VGX-300</b>	4.9±0.1	3.23±0.16	<b>625±21</b>
<b>VGX-301-ΔN2</b>	5.7±0.1	3.88±0.03	<b>677±12</b>

【0378】

30

上記の表5に示すデータから、VGX-300およびVGX-301-N2の試料は、ほぼ同一の親和性でヒトVEGF-CとVEGF-Dの両方に結合し、両分子とも、VEGF-DよりもVEGF-Cに対して強力に結合することが示された。

【0379】

実施例5 - VGX-301-N2は、VEGFR-3のVEGF-CおよびVEGF-D結合およびその架橋を遮断する

VEGFR-2およびVEGFR-3に結合し架橋する、VEGFファミリーリガンドの能力を評価するために、細胞ベースのアッセイが開発されている。これらのバイオアッセイを用いて、VGX-300およびVGX-301-N2の中和活性を試験した。バイオアッセイの細胞株は、マウスエリスロポエチン受容体の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインにインフレイムで融合した、VEGFR-2またはVEGFR-3のECDからなるキメラ受容体で安定にトランスフェクトされたマウスIL-3依存性プロB細胞株Ba/F3からなる(その開示内容全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2005/087808号パンフレットの実施例5に記載されるように)。IL-3の非存在下では、これらの細胞は、それぞれのVEGFRのECDに結合し架橋することができる増殖因子の存在下でのみ生存し増殖する。

40

【0380】

手短に言えば、VEGFR-2またはVEGFR-3 ( $10,000$  細胞/ウェル;  $96$  ウェルプレート) をトランスフェクトしたBa/F3細胞を、漸増させたVGX-301-N2のVGX-300相当濃度 ( $0 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ ) の存在下、VEGF-C

50

または V E G F - D を添加した培地で 3 7 で 4 8 時間培養した。W S T 1 試薬を用いて細胞増殖を測定した；細胞を W S T - 1 と共に 3 7 で 4 時間インキュベートし、吸光度を 4 5 0 n m で測定した ( n = 3 : エラーバー = 平均値の標準誤差、S E M )。

#### 【 0 3 8 1 】

結果から、V E G F R - 2 および V E G F R - 3 B a / F 3 バイオアッセイにおける、V E G F - C および V E G F - D の用量応答的阻害により実証されるように、V G X - 3 0 0 が V E G F - C および V E G F - D の活性を中和することが示された。V G X - 3 0 0 は、V E G F R - 2 および - 3 アッセイの両方において、V E G F - D に比較して V E G F - C の中和に高い効力を示した。図 3 および 4 を参照されたい。

#### 【 0 3 8 2 】

V G X - 3 0 1 - N 2 の分析から、この分子も、V E G F - C と V E G F - D の両方の V E G F R - 3 への結合を遮断することができることが実証された。V G X - 3 0 1 - N 2 の中和活性は V G X - 3 0 0 よりもわずかに強力であった。図 4 を参照されたい。表 6 に、V E G F R - 3 B a / F 3 バイオアッセイにおける、V E G F - C および V E G F - D に対する V G X - 3 0 0 および V G X - 3 0 1 - N 2 の結合 ( I C 5 0 ) を示す。

#### 【 0 3 8 3 】

表 6

	VGX-300 IC <sub>50</sub>	VGX-301-ΔN2 IC <sub>50</sub>
VEGF-D リガンド 300ng/mL	544.9	251.7
VEGF-C リガンド 5ng/mL	6.8	4.5

#### 【 0 3 8 4 】

実施例 6 - 硝子体内投与後の V G X - 3 0 0 および V G X - 3 0 1 N 2 の眼の分布および薬物動態

この試験は、色素性ウサギへの単回硝子体内投与後の、V G X - 3 0 0、V G X - 3 0 1 - N 2、およびアフリベルセプト ( E Y L E A ) の眼の分布および薬物動態を検討するために実施した。

#### 【 0 3 8 5 】

試験計画は、1 群に 8 匹の雌性ウサギを割り当てた 3 群からなった。放射標識した V G X - 3 0 0、V G X - 3 0 1 - N 2、またはアフリベルセプト 5 0 0 μ g を、両眼に 5 0 μ L ボーラス硝子体内注射をすることによって、動物に投与した。

#### 【 0 3 8 6 】

群	雌性ウサギの数	製剤	投与経路	標的用量レベル	標的用量容積 (μL/眼)	試料採取
1	8	[ <sup>125</sup> I]VGX-300	IVT	500 μg	50	血液および眼組織
2	8	[ <sup>125</sup> I] アフリベルセプト (EYLEA)	IVT	500 μg	50	血液および眼組織
3	8	[ <sup>125</sup> I]VGX-301-ΔN2	IVT	500 μg	50	血液および眼組織

#### 【 0 3 8 7 】

用量投与後 1 2、2 4、7 2、1 6 8、3 6 6、6 7 2 時間に 1 群当たり 1 匹の動物を安楽死させた。血液 ( 血清に処理 ) および選択した眼組織を各時点で採取し、放射化学分析により放射活性濃度を測定した。採取した眼組織には、房水、脈絡膜、角膜、虹彩 - 毛様体 ( I C B )、水晶体、視神経、網膜、網膜色素上皮 ( R P E )、強膜、線維柱帯、お

よび硝子体液が含まれた。図5に、モニターした時間にわたる、種々の組織および血清中の放射活性の平均濃度を示す。

#### 【0388】

被験物質である $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{VGX}-300$ 、 $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{アフリベルセプト(ELYLEA)}$ 、および $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{VGX}-301-\text{N2}$ は、十分な耐容性があり、硝子体液中で安定であり、後区と前区の両方の眼組織に対して長期間曝露した。硝子体内投与後の $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{VGX}-300$ および $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{VGX}-301-\text{N2}$ の血清曝露には差があるが、 $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{VGX}-300$ および $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{VGX}-301-\text{N2}$ は両方とも、アフリベルセプト(ELYLEA)に比較すると、おそらく脈絡膜中への吸収、さらに房水流出による吸収によるクリアランスの結果として、ほんのわずかな全身曝露であった。この試験で観察された $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{VGX}-300$ および $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{VGX}-301-\text{N2}$ のPKおよび生体内分布は、両方の化合物について同様であり、 $[^1\ ^2\ ^5\ \text{I}]\text{アフリベルセプト(ELYLEA)}$ と同等であった。

10

#### 【0389】

##### 実施例7 - 未熟児網膜症のモデル

以下の実施例は、ROPモデルを用いて、VGX-300およびVGX-301-N2について、網膜血管新生の発生を阻害するそれらの能力を評価するための例示的なアッセイである。このモデルでは、生後7日目(P7)のマウスを、高酸素(75%酸素)状態に5日間(P12まで)曝露した。高酸素曝露後に、P12マウスを正常酸素状態に戻し、ヒトアイソタイプ対照抗体、VGX-300、VGX-301-N2、Eylea(VEGF-Trap)、VGX-300+Eylea、またはVGX-301-N2+Eyleaの硝子体内注射を行った。次いで、すべてのマウスを正常酸素状態下に5日間収容した後、P17に屠殺し、眼球摘出し、10%ホルマリン/PBSで固定した。ヘマトキシリン-エオジン染色法および/またはIHC染色法を用いて、各群において脈管を定量した。

20

#### 【0390】

##### 実施例8 - アルゴンレーザー誘導の脈絡膜血管新生(CNV)

加齢黄斑変性症(AMD)のこのモデルでは、CNVは、0日目における、マウスのブルック膜のアルゴンレーザー誘導の破裂(マウス当たり3回の熱傷)によって誘導される。10匹のマウス群で試験し、処置は、ヒトアイソタイプ対照抗体、VGX-301-N2、VGX-300、Eylea(VEGF-Trap)、VGX-301-N2+Eylea、またはVGX-300+Eyleaの1週1回の硝子体内注射(0日目および7日目)によって行った。14日目に動物を屠殺し、脈絡膜の平坦マウントを調製し、ICAM-2で染色して、蛍光顕微鏡法による血管新生の視覚化を行った。

30

#### 【0391】

VGX-301-N2は、単剤として、Eylea(登録商標)により実証された効果と同等に、新生血管AMDのマウスモデルにおいて脈絡膜血管新生を顕著に阻害すると考えられる。

#### 【0392】

##### 実施例9 - VEGF-C媒介の腫瘍増殖および転移に対するリガンド結合分子の阻害効果

40

本明細書に記載するリガンド結合分子の、腫瘍増殖および/または転移を阻害する能力を実証するために、任意の容認された腫瘍モデルを用いることができる。例示的なモデルとしては、種々のタイプの癌を発症しやすくなっている動物、任意選択でVEGF-CまたはVEGF-Dなどの1つまたは複数の増殖因子を組換えで過剰発現するように形質転換された細胞を含む、同種または異種由来の腫瘍または腫瘍細胞または腫瘍細胞株を注射された動物が挙げられる。複数の増殖因子が検出可能である、in vivo腫瘍モデルを準備するために、複数の増殖因子の発現を引き起こす外来性DNAで腫瘍細胞株を形質転換することは可能である。

#### 【0393】

50

本明細書に記載するリガンド結合分子は、例えばタンパク質形態で直接、*i.v.* 輸注により、もしくは埋込型マイクロポンプにより投与するか、または核酸形態で遺伝子治療レジメンの一部として投与することができる。被験体は、好ましくは、被験体間の変動を最小限に抑える助けとなるように、性別、体重、年齢、および病歴によりグループ化する。

#### 【0394】

効力は、腫瘍のサイズ（容積）および重量の減少により測定する。腫瘍サイズ、拡散（転移）、および腫瘍の数に対する効果の性質について検討することもできる。例えば、特異的細胞マーカーの使用は、リンパ脈管新生に比較した血管新生に対する効果を示すために用いることができ、VEGF-A 結合コンストラクトは後者に対してより大きな効果が期待され、VEGF-C 結合コンストラクトは前者に対してより大きな効果が期待される。動物は、全体としては生存期間および体重変化について注目することができる。腫瘍および検体について、血管新生、リンパ脈管新生、および/または壊死の証拠を調べる。

#### 【0395】

SCID マウスは、本明細書に記載するリガンド結合分子の、腫瘍増殖を阻害する能力に関する被験体として用いることができる。治療で用いられるリガンド結合分子は、一般に、それが腫瘍細胞によって発現される増殖因子、特に、被験体の非腫瘍性細胞に比較して腫瘍細胞により過剰発現される増殖因子のリガンドに結合するように選択される。SCID モデルでは、腫瘍細胞、例えば MCF-7 細胞に、国際公開第 02/060950 号パンフレットに記載されているように、増殖因子の過剰発現を提供するプロモーターまたは他の発現制御配列の制御下で特定の増殖因子をコードするウイルスをトランスフェクトすることができる。あるいは、米国特許第 6,375,929 号明細書に記載されているように、他の細胞株、例えば HT-1080 を用いることができる。過剰発現を所望するものと同数の増殖因子リガンドを腫瘍細胞にトランスフェクトすることもでき、目的の 1 つまたは複数の増殖因子リガンドをすでに過剰発現する腫瘍細胞株を選ぶこともできる。被験体の 1 群に、mock、すなわち増殖因子リガンド挿入断片を欠くベクターをトランスフェクトされた細胞を移植する。

#### 【0396】

上記に記載の細胞の腫瘍移植の前、それと同時に、またはその後の何れかに、特定のリガンド結合分子で被験体を処置した。リガンド結合分子を投与するいくつかの異なる方法がある。*in vivo* および/または *ex vivo* 遺伝子治療を用いることができる。例えば、リガンド結合分子をコードするアデノウイルスまたは他のベクターを細胞にトランスフェクトし、その細胞を増殖因子を発現する腫瘍細胞と共に移植することができ、リガンド結合分子をトランスフェクトされた細胞は、増殖因子で形質転換された細胞（または増殖因子をすでに過剰発現している）と同じであってもよい。一部の実施形態では、リガンド結合分子をコードするアデノウイルスは、*in vivo* で、例えば静脈内に注射される。一部の実施形態では、リガンド結合分子それ自体（例えばタンパク質形態）は、例えばマイクロポンプを用いて、全身的または局所的に投与される。特定の結合コンストラクトの効力を試験する場合、通常、少なくとも 1 つの対照を用いる。例えば、ベクターベースの治療の場合、空の挿入断片または LacZ を有するベクターを用いるか、または挿入断片を、VEGF-C または VEGF-D を結合することができる VEGFR-3 の完全な ECD を含むリガンド結合分子とすることができ、そのような対照は、必要に応じて、2 つ以上の ECD コンストラクトを用いることができる（例えば、複数のリガンド結合親和性を有する結合コンストラクトを用いる場合、複数のリガンドを結合するため）。

#### 【0397】

##### A. 例示的な手法

プラスミド発現ベクターの調製、細胞のトランスフェクション、およびその試験

VEGF-C もしくは VEGF-D をコードする cDNA またはそれらの組合せは、pEBS7 プラスミドに導入される (Peterson and Legerski, Gene, 107: 279-84, 1991.)。この同じベクターを、リガンド結合分子の

10

20

30

40

50

発現に用いることができる。

#### 【0398】

以前に記載されるように (Egeblad and Jaattela, Int. J. Cancer, 86: 617-25, 2000)、ヒトMCF-7乳癌細胞株のMCF-7S1サブクローンに、エレクトロポレーションによりプラスミドDNAをトランスフェクトし、安定な細胞プールを選択し培養した。100  $\mu$ Ci/mlの[35S]-メチオニンおよび[35S]システインを添加した、メチオニンおよびシステインを含まないMEM (Gibco) 中で、細胞を代謝的に標識する (Redivue Pro-Mix, Amersham Pharmacia Biotech)。発現された増殖因子に対する抗体を用いて、馴化培地から標識された増殖因子を免疫沈殿させる。プロテインAセファロース (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、免疫複合体および結合複合体を沈殿させ、PBS中0.5% BSA、0.02% トウイーン20で2回、PBSで1回洗浄し、還元条件下にてSDS-PAGEで分析した。

10

#### 【0399】

被験体の準備および処置

細胞 (20,000個/ウェル) を4つ組で24ウェルに播種し、1、4、または8日後にレプリケートプレート上でトリプシン処理し、血球計数器を用いてカウントする。新鮮培地を4および6日後に提供する。腫瘍形成アッセイのために、サブコンフルエントな培養物をトリプシン処理により回収し、2回洗浄し、PBS中の $10^7$ 個の細胞を、0.72mgの17- $\beta$ -エストラジオール (Innovative Research of America) を含有する皮下60日間除放射性ペレットを担持する卵巢摘出SCIDマウスの第2 (腋窩) の乳腺の脂肪パッドに接種する。卵巢を摘出し、ペレットをインプラントすることは、腫瘍細胞接種の4~8日前に行なう。

20

#### 【0400】

結合コンストラクトをコードするcDNAを、pAdBg1IIプラスミドにサブクローニングし、以前に記載されるようにアデノウイルスを作製する (Laitinen et al., Hum. Gene Ther., 9: 1481-6, 1998)。リガンド結合分子またはLacZ対照 (Laitinen et al., Hum. Gene Ther., 9: 1481-6, 1998) アデノウイルス、 $10^9$  pfu/マウスを、腫瘍細胞接種の3時間前にSCIDマウスに静脈内注射する。

30

#### 【0401】

治療効力の分析

腫瘍の長さおよび幅は、盲検法で毎週2回測定し、腫瘍は半楕円体であり、その深さは幅と同じであると仮定して、腫瘍体積を長さ $\times$ 幅 $\times$ 深さ $\times 0.5$ として算出する (Benz et al., Breast Cancer Res. Treat., 24: 85-95, 1993)。

#### 【0402】

腫瘍を切除し、4%パラホルムアルデヒド (pH7.0) 中で24時間固定し、パラフィンに包埋する。切片 (7  $\mu$ m) を、例えば、PECAM-1 (Pharmingen)、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3 (Kubo et al., Blood, 96: 546-553, 2000) もしくはPCNA (Zymed Laboratories)、PDGFR- $\alpha$ 、PDGFR- $\beta$  に対するモノクローナル抗体、またはLYVE-1 (Banerji et al., J. Cell Biol., 144: 789-801, 1999)、VEGF-C (Joukov et al., EMBO J., 16: 3898-911, 1997)、公開されたプロトコールによるラミニン (Partanen et al., Cancer, 86: 2406-12, 1999)、もしくは任意の増殖因子に対するポリクローナル抗体で免疫染色する。PECAM-1陽性脈管の数の平均を、切片中の最大脈管密度の3領域 (倍率60倍) から決定する。組織学的分析はすべて盲検化腫瘍試料を用いて行なう。

40

#### 【0403】

50



アデノウイルスコンストラクトおよび／またはタンパク質療法の注射後3週間に、各群からの4匹のマウスに麻酔をかけ、腹側皮膚を開き、PBS中の3%エバン青色色素(Sigma)を数マイクロリットル腫瘍内に注入する。腫瘍からの色素のドレナージを肉眼で追跡する。

【0404】

被験体の健康状態および腫瘍血管の程度の指標を提供するために血液および血液タンパク質のイメージングおよびモニタリングを実施することもできる。

【0405】

実施例10 - リガンド結合分子と化学療法剤の併用療法を用いる、被験体の腫瘍進行に対する効果

この試験は、他の抗癌療法と併用して、本明細書に記載するリガンド結合分子を用いることの効力を試験するために実施する。そのような療法には、癌標的に対する化学療法、放射線療法、アンチセンス療法、RNA干渉、およびモノクローナル抗体が含まれる。組合せ効果は相加的であり得るが、好ましくは、その抗癌効果、例えば、癌の予防、抑制、退縮、および消失、生存期間の延長、および／または副作用の低減において相乗的である。

【0406】

被験体は、定期間隔、例えば毎日、毎週、または毎月1回で、化学療法剤を投与される1群、リガンド結合分子を投与される1群、および化学療法剤とリガンド結合分子の両方を投与される1群の複数の群に分配される。ヒトの試験では、被験体は、一般に、被験体間の変動を最小限に抑える助けとなるように、性別、体重、年齢、および病歴によりグループ化される。理想的には、被験体は同じタイプの癌と診断されている。ヒトまたは非ヒト被験体では、腫瘍サイズ、転移、体重増加／減少、腫瘍の血管新生、および白血球数の測定により、進行を追跡することができる。

【0407】

腫瘍の生検は、治療開始前および治療開始後の両方にて定期間隔で行われる。例えば、生検は、治療の直前、1週目、次いで、その後1ヶ月間隔で、または例えば腫瘍が切除されるような可能な場合にいつでも行われる。細胞マーカー、ならびに細胞全体および組織形態についての生検を行って、治療の有効性を評価する。追加的または代替的に、イメージング技術を用いることができる。

【0408】

非ヒト動物試験の場合には、さらにプラセボ対照を用いることができる。NIHガイドラインに従って実施される動物試験はまた、比較的均一の癌細胞集団およびリガンド結合分子により標的にされる1つまたは複数の増殖因子を選択的に過剰生産する腫瘍の挿入という利点を備えている。

10

20

30

【 図 1 】

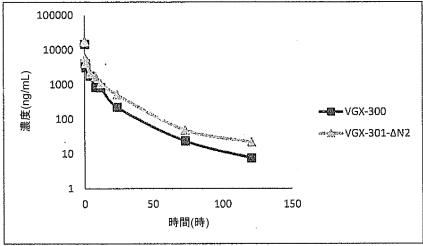


図1a:

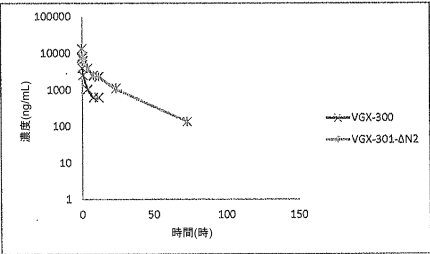
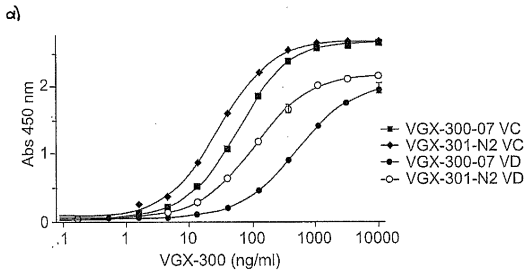


図1b:

図1

【 図 2 】



b)

	VGX-300-07 VC	VGX-301-N2 VC	VGX-300-07 VD	VGX-301-N2 VD
最低	0.06295	0.09009	0.04496	0.04462
最高	2.650	2.677	2.052	2.178
LOGEC50	1.734	1.469	2.703	2.021
斜率勾配	1.091	1.057	0.9355	0.9812
EC50	58.05	29.45	504.5	105.0
スロパン	2.597	2.597	2.017	2.133

図2

【 図 3 - 1 】

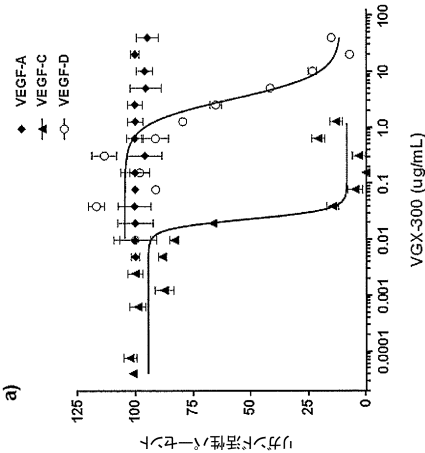


図3

【 図 3 - 2 】

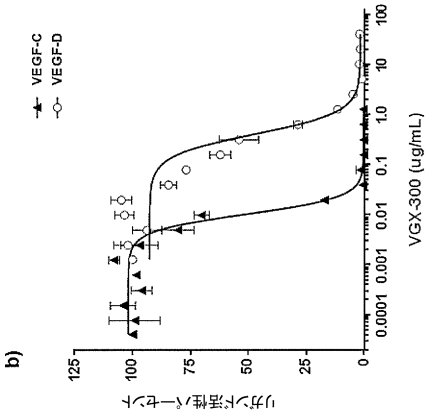


図3 (続き)

【図 4 - 1】

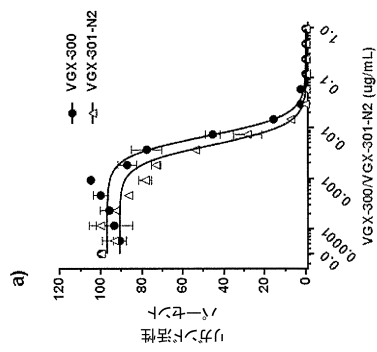


図4

【図 4 - 2】

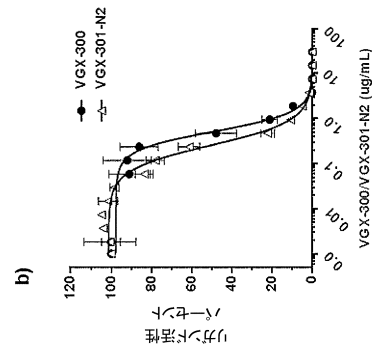
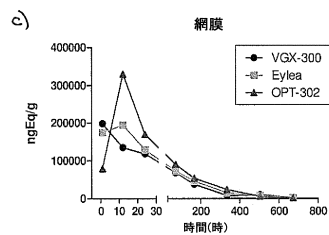
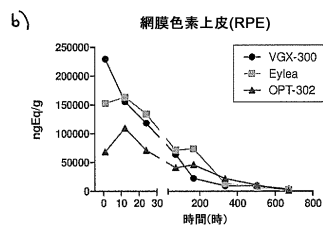
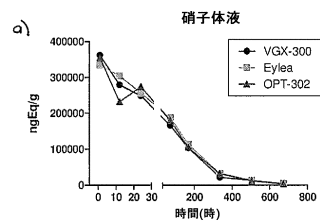


図4 (続き)

【図 5 - 1】



【図 5 - 2】

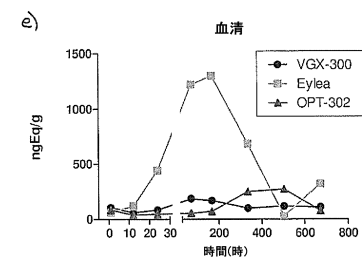
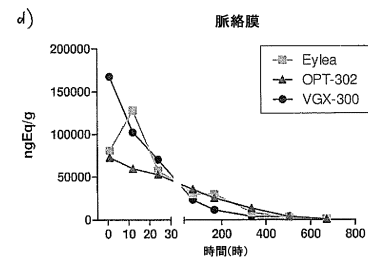


図5(続き)

図5

【配列表】

0006408492000001.xml

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
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 0 7 K	14/71	(2006.01)	C 0 7 K	14/71	
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 K	9/107	(2006.01)	A 6 1 K	9/107	
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	9/12	(2006.01)	A 6 1 K	9/12	
A 6 1 K	9/20	(2006.01)	A 6 1 K	9/20	
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	9/06	(2006.01)	A 6 1 K	9/06	
A 6 1 K	9/70	(2006.01)	A 6 1 K	9/70	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	31/7036	(2006.01)	A 6 1 K	31/7036	

(72)発明者 アダムス, ティモシー

オーストラリア連邦 ビクトリア州 3 0 9 3, ロウアーブレンティー, オールドエルサムロード  
1 9 3

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特開2010-088433(JP, A)  
国際公開第2005/087808(WO, A1)  
米国特許出願公開第2006/0110364(US, A1)  
特表2005-508623(JP, A)  
特表2012-509872(JP, A)  
Nature Medicine, 2001, Vol.7, No.2, pp.199-205

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0  
P u b M e d  
U n i P r o t / G e n e S e q  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )