(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-513644
(P2024-513644A)
(43)公表日　令和6年3月27日(2024.3.27)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		４Ｂ０６４
Ｃ１２Ｎ	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/63*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*1/15*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15		４Ｃ０８５
Ｃ１２Ｎ	*1/19*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		４Ｃ０８６

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全84頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-550275(P2023-550275)
(86)(22)出願日　令和4年2月18日(2022.2.18)
(85)翻訳文提出日　令和5年10月12日(2023.10.12)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/054137
(87)国際公開番号　WO2022/175481
(87)国際公開日　令和4年8月25日(2022.8.25)
(31)優先権主張番号　10202101681W
(32)優先日　令和3年2月19日(2021.2.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
シンガポール(SG)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　523315267
ドットバイオ プライベート リミテッド
シンガポール国 １１７６０４ シンガポール，リサーチ・リンク １，ナンバー０５－３０
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100187540
弁理士　國枝 由紀子
(72)発明者　アシアル，イグナシオ
シンガポール国 １１７６０４ シンガポール
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＶＥＧＦＡ結合分子

(57)【要約】
ＶＥＧＦＡ結合分子が開示されている。また、ＶＥＧＦＡ結合分子をコードする核酸および発現ベクター、ＶＥＧＦＡ結合分子を含む組成物、ならびにＶＥＧＦＡ結合分子を使用する方法も開示されている。
【選択図】図１

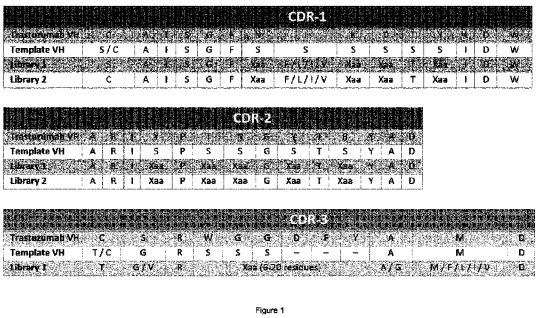


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
任意選択で単離された、ＶＥＧＦＡに結合する抗原結合分子であって、以下のＣＤＲ：
配列番号４５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号４６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号４８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む、抗原結合分子。
【請求項２】
配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１に記載の抗原結合分子。
【請求項３】
以下のＦＲ：
配列番号４０のアミノ酸配列を有するＦＲ１
配列番号４１のアミノ酸配列を有するＦＲ２
配列番号４７のアミノ酸配列を有するＦＲ３
配列番号４４のアミノ酸配列を有するＦＲ４
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む、請求項１または請求項２に記載の抗原結合分子。
【請求項４】
以下のＣＤＲ：
配列番号５０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号５１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号５２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項５】
配列番号５３のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１から４のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項６】
（ｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号１９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｉｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列
を含む、請求項１から５のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項７】
配列番号１６、５または１２のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１から６のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項８】

以下のＣＤＲ：
配列番号５４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号５５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号５６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項９】
配列番号５７のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１から３または請求項８のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１０】
（ｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号２１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号２２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号２３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号２５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号２６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号２７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｉｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号２９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号３１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｖ）以下のＣＤＲ：
配列番号３３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号３５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｖ）以下のＣＤＲ：
配列番号３７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号３９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列
を含む、請求項１から３、請求項８または請求項９のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１１】
配列番号２０、２４、２８、３２、または３６のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１から３または請求項８から１０のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１２】
以下のＣＤＲ：
配列番号２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１３】

配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１から３または請求項１２のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１４】
以下のＣＤＲ：
配列番号２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１５】
配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項１から３または請求項１４のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１６】
以下のＦＲ：
配列番号４０のアミノ酸配列を有するＦＲ１
配列番号４１のアミノ酸配列を有するＦＲ２
配列番号４２のアミノ酸配列を有するＦＲ３
配列番号４４のアミノ酸配列を有するＦＲ４
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む、請求項１から１３のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１７】
以下のＦＲ：
配列番号４０のアミノ酸配列を有するＦＲ１
配列番号４１のアミノ酸配列を有するＦＲ２
配列番号４３のアミノ酸配列を有するＦＲ３
配列番号４４のアミノ酸配列を有するＦＲ４
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む、請求項１から３、請求項１５または請求項１６のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１８】
ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲの間の相互作用を阻害する、請求項１から１７のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項１９】
多重特異的抗原結合分子であり、ＶＥＧＦＡ以外の標的抗原に特異的な抗原結合ドメインをさらに含む、請求項１から１８のいずれか一項に記載の抗原結合分子。
【請求項２０】
請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子を含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）。
【請求項２１】
任意選択で単離された、請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子、または請求項２０に記載のＣＡＲをコードする核酸。
【請求項２２】
請求項２１に記載の核酸を含む発現ベクター。
【請求項２３】
請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子、請求項２０に記載のＣＡＲ、請求項２１に記載の核酸、または請求項２２に記載の発現ベクターを含む細胞。
【請求項２４】
ＶＥＧＦＡに結合する抗原結合分子を生産する方法であって、請求項２３に記載の細胞を、細胞による抗原結合分子またはＣＡＲの発現に適した条件下で培養するステップを含

む、方法。
【請求項２５】
請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子、請求項２０に記載のＣＡＲ、請求項２１に記載の核酸、請求項２２に記載の発現ベクター、または請求項２３に記載の細胞と、薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤またはアジュバントを含む組成物。
【請求項２６】
医学的治療または予防の方法において使用するための、請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子、請求項２０に記載のＣＡＲ、請求項２１に記載の核酸、請求項２２に記載の発現ベクター、請求項２３に記載の細胞、または請求項２５に記載の組成物。
【請求項２７】
ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達が病理学的に関与する疾患の治療または予防の方法において使用するための、請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子、請求項２０に記載のＣＡＲ、請求項２１に記載の核酸、請求項２２に記載の発現ベクター、請求項２３に記載の細胞、または請求項２５に記載の組成物。
【請求項２８】
ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達が病理学的に関与する疾患を治療または予防するための医薬の製造における、請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子、請求項２０に記載のＣＡＲ、請求項２１に記載の核酸、請求項２２に記載の発現ベクター、請求項２３に記載の細胞、または請求項２５に記載の組成物の使用。
【請求項２９】
ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達が病理学的に関与する疾患の治療または予防の方法であって、請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子、請求項２０に記載のＣＡＲ、請求項２１に記載の核酸、請求項２２に記載の発現ベクター、請求項２３に記載の細胞、または請求項２５に記載の組成物の治療的または予防的有効量を対象に投与するステップを含む、方法。
【請求項３０】
疾患が、病理学的血管新生を特徴とする疾患、がん、ＶＥＧＦＡ発現がん、ＶＥＧＦＲ発現がん、眼疾患、網膜症、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、加齢黄斑変性症、滲出型加齢黄斑変性症、網膜静脈閉塞症、近視性脈絡膜血管新生、未熟児網膜症、血管新生緑内障、中心性漿液性網膜症、眼腫瘍、角膜血管新生、炎症性疾患、自己免疫疾患、関節炎、関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、多発性硬化症、敗血症、運動ニューロン疾患および筋萎縮性側索硬化症から選択される、請求項２７に記載の使用、請求項２８に記載の使用、または請求項２９に記載の方法のための、抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物。
【請求項３１】
任意選択で単離された、ＶＥＧＦＡに結合した請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子を含むｉｎ　ｖｉｔｒｏ複合体。
【請求項３２】
試料中のＶＥＧＦＡを検出するための方法であって、ＶＥＧＦＡを含有するか、または含有することが疑われる試料を、請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子と接触させステップと、抗原結合分子とＶＥＧＦＡの複合体の形成を検出するステップを含む、方法。
【請求項３３】
ＶＥＧＦＡ、またはＶＥＧＦＡを含むか、もしくは発現する細胞を検出、局在化または画像化するための方法における、請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子の使用。
【請求項３４】
ＶＥＧＦＡ標的薬による治療のための対象を選択または層別化する方法であって、対象からの試料を請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子とｉｎ　ｖｉｔｒｏ

で接触させるステップと、抗原結合分子とＶＥＧＦＡの複合体の形成を検出するステップを含む、方法。
【請求項３５】
ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏでの診断薬または予後判定薬としての、請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子の使用。
【請求項３６】
ＶＥＧＦＡの発現を特徴とする疾患／状態を検出、局在化または画像化するための方法における、請求項１から１９のいずれか一項に記載の抗原結合分子の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０２２年２月１９日に出願されたＳＧ１０２０２１０１６８１Ｗの優先権を主張するものであり、その内容および要素はあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本開示は、分子生物学の分野に関し、より詳しくは、抗原結合分子技術の分野に関する。本発明はまた、医学的治療および予防の方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
抗ＶＥＧＦ療法は、特に腫瘍学および眼科学の分野において、様々な状態を治療するために用いられている（１～３）。ＶＥＧＦに対するヒト化および安定化抗体ドメインを開発することが、それらのサイズの小ささとモジュール性から望まれている。眼科用途では、サイズが小さく安定性が高いことが、薬物の局所送達を可能にすることができるので望ましい（４、５）。モジュール性、すなわちドメイン抗体が自律的にフォールドされ、その完全性を損なうことなく他のドメイン抗体または他のタンパク質に融合する能力は、多価分子および多重特異的分子の開発にとって非常に望ましい。実際、抗体ドメインをモノクローナル抗体または他の任意の融合タンパク質にタンデムに融合させることにより結合価および特異性を高めるプロセスを簡素化する（６～８）。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
第１の態様では、本開示は、任意選択で単離された、ＶＥＧＦＡに結合する抗原結合分子であって、以下のＣＤＲ：
配列番号４５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号４６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号４８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む、抗原結合分子を提供する。
【０００５】
一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下のＦＲ：
配列番号４０のアミノ酸配列を有するＦＲ１
配列番号４１のアミノ酸配列を有するＦＲ２
配列番号４７のアミノ酸配列を有するＦＲ３
配列番号４４のアミノ酸配列を有するＦＲ４
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む。
【０００６】
一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下のＣＤＲ：
配列番号５０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号５１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２

配列番号５２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む。
【０００７】
一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号５３のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
一部の実施形態では、抗原結合分子は、
（ｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号１９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｉｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列
を含む。
【０００８】
一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号１６、５または１２のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下のＣＤＲ：
配列番号５４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号５５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号５６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む。
【０００９】
一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号５７のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
一部の実施形態では、抗原結合分子は、
（ｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号２１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号２２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号２３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号２５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号２６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号２７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｉｉ）以下のＣＤＲ：
配列番号２９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号３１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｉｖ）以下のＣＤＲ：

配列番号３３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号３５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列；または
（ｖ）以下のＣＤＲ：
配列番号３７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号３９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列
を含む。

【００１０】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号２０、２４、２８、３２、または３６のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００１１】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下のＣＤＲ：
配列番号２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む。

【００１２】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下のＣＤＲ：
配列番号２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む。

【００１３】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下のＦＲ：
配列番号４０のアミノ酸配列を有するＦＲ１
配列番号４１のアミノ酸配列を有するＦＲ２
配列番号４２のアミノ酸配列を有するＦＲ３
配列番号４４のアミノ酸配列を有するＦＲ４
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む。

【００１４】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下のＦＲ：
配列番号４０のアミノ酸配列を有するＦＲ１
配列番号４１のアミノ酸配列を有するＦＲ２
配列番号４３のアミノ酸配列を有するＦＲ３
配列番号４４のアミノ酸配列を有するＦＲ４
を組み込んだ単一ドメイン抗体配列を含む。

【００１５】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲの間の相互作用を阻害する。
一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ以外の標的抗原に特異的な抗原結合ドメインをさらに含む多重特異的抗原結合分子である。

【００１６】

本開示はまた、本明細書に記載の抗原結合分子を含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）も提供する。

本開示はまた、任意選択で単離された、本明細書に記載の抗原結合分子またはＣＡＲをコードする核酸も提供する。

【００１７】

本開示はまた、本明細書に記載の核酸を含む発現ベクターも提供する。

本開示はまた、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、または発現ベクターを含む細胞も提供する。

【００１８】

本開示はまた、ＶＥＧＦＡに結合する抗原結合分子を生産する方法であって、本明細書に記載の細胞を、細胞による抗原結合分子の発現に適した条件下で培養するステップを含む、方法も提供する。

【００１９】

本開示はまた、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクターまたは細胞と、薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤またはアジュバントを含む組成物も提供する。

【００２０】

本開示はまた、医学的治療または予防の方法において使用するための、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物も提供する。

本開示はまた、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達が病理学的に関与する疾患の治療または予防の方法において使用するための、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物も提供する。

【００２１】

本開示はまた、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達が病理学的に関与する疾患を治療または予防するための医薬の製造における、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物の使用も提供する。

【００２２】

本開示はまた、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達が病理学的に関与する疾患を治療または予防する方法であって、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物の治療的または予防的有効量を対象に投与するステップを含む、方法も提供する。

【００２３】

一部の実施形態では、疾患は、病理学的血管新生を特徴とする疾患、がん、ＶＥＧＦＡ発現がん、ＶＥＧＦＲ発現がん、眼疾患、網膜症、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、加齢黄斑変性症、滲出型加齢黄斑変性症、網膜静脈閉塞症、近視性脈絡膜血管新生、未熟児網膜症、血管新生緑内障、中心性漿液性網膜症、眼腫瘍、角膜血管新生、炎症性疾患、自己免疫疾患、関節炎、関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、多発性硬化症、敗血症、運動ニューロン疾患および筋萎縮性側索硬化症から選択される。

【００２４】

本開示はまた、任意選択で単離された、ＶＥＧＦＡに結合した本明細書に記載の抗原結合分子を含むｉｎ　ｖｉｔｒｏ複合体も提供する。

本開示はまた、試料中のＶＥＧＦＡを検出する方法であって、ＶＥＧＦＡを含有するか、または含有することが疑われる試料を、本明細書に記載の抗原結合分子と接触させるステップと、抗原結合分子とＶＥＧＦＡの複合体の形成を検出するステップを含む、方法も提供する。

【００２５】

本開示はまた、ＶＥＧＦＡ、またはＶＥＧＦＡを含むか、もしくは発現する細胞を検出、局在化または画像化するための方法における、本明細書に記載の抗原結合分子の使用も提供する。

【００２６】

本開示はまた、ＶＥＧＦＡ標的薬による治療のための対象を選択または層別化する方法であって、対象からの試料を本明細書に記載の抗原結合分子とｉｎ　ｖｉｔｒｏで接触させるステップと、抗原結合分子とＶＥＧＦＡの複合体の形成を検出するステップを含む、方法も提供する。

【００２７】

本開示はまた、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでの診断薬または予後判定薬としての、本明細書に記載の抗原結合分子の使用も提供する。

本開示はまた、ＶＥＧＦＡの発現を特徴とする疾患／状態を検出、局在化または画像化するための方法における、本明細書に記載の抗原結合分子の使用も提供する。

【発明を実施するための形態】

【００２８】

本発明者らは、ヒトＶＥＧＦＡおよびマウスＶＥＧＦＡを高親和性で標的とし、ＶＥＧＦ－ＶＥＧＦＲ相互作用を強い効力で遮断することができる、ヒト化、安定化および自律性ＶＨドメイン抗体の生成についてここに記載する。これらのＶＥＧＦ結合分子は、２つのＶＨドメイン抗体のタンデムとして構築された二価抗ＶＥＧＦＡ分子に例示されるように、多価および多重特異的分子を生成するためのビルディングブロックとして使用することができる。

【００２９】

ＶＥＧＦＡ

血管内皮増殖因子Ａ（ＶＥＧＦＡ）は、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２によって同定されたタンパク質である。ヒトＶＥＧＦＡ遺伝子によってコードされるｍＲＮＡの選択的スプライシングにより、４種類の主要なＶＥＧＦＡアイソフォーム：ＶＥＧＦ２０６（配列番号６０）、ＶＥＧＦ１８９（配列番号６１）、ＶＥＧＦ１６５（配列番号６２）およびＶＥＧＦ１２１（配列番号６３）が得られる。Ｎ末端２６アミノ酸シグナルペプチド（配列番号６８）を除去するプロセッシングの後、ＶＥＧＦ２０６、ＶＥＧＦ１８９、ＶＥＧＦ１６５およびＶＥＧＦ１２１は、それぞれ、配列番号６４～６７に示したアミノ酸配列を含む。ＶＥＧＦ１６５は、主要ＶＥＧＦＡアイソフォームであると思われる。

【００３０】

ＶＥＧＦＡは増殖因子であり、例えば、ＨｏｌｍｅおよびＺａｃｈａｒｙ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．（２００５年）６（２）：２０９頁、ならびにＣｌａｅｓｓｏｎ－ＷｅｌｓｈおよびＷｅｌｓｈ，Ｊ　Ｉｎｔｅｒｎ　Ｍｅｄ．（２０１３年）２７３（２）：１１４～２７頁に記載されており、それらは両方とも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００３１】

血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）は、保存された受容体結合シスチンノット構造を有する分泌ポリペプチドのファミリーである。ＶＥＧＦＡモノマーは、鎖間ジスルフィド結合を介して結合し、ホモ二量体を形成する。ＶＥＧＦＡは、内皮細胞によって発現される同族受容体キナーゼファミリーを介して作用し、血管形成を刺激する。

【００３２】

ＶＥＧＦＡは、正常な血管の発達において重要な役割を果たすだけでなく、血管の異常な増殖を伴う疾患（例えば、がん）においても重要な役割を果たす。ＶＥＧＦＡは、動脈、静脈、およびリンパ系に由来する血管内皮細胞の増殖を刺激し、様々なｉｎ　ｖｉｖｏモデルにおいて血管新生（すなわち、薄壁内皮が覆った構造の形成）を誘導し、微小血管透過性の急速な上昇を誘導する。

【００３３】

本明細書では、「ＶＥＧＦＡ」とは、いずれかの種由来のＶＥＧＦＡを指し、いずれかの種由来のアイソフォーム、フラグメント、バリアント、またはホモログを含む。一部の実施形態では、ＶＥＧＦＡは、哺乳動物（例えば、真獣類、胎盤類、上皮類、顕獣類、古人類（ａｒｃｈｏｎｔａｎ）、霊長類（アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長類またはヒト））由来のＶＥＧＦＡである。一部の実施形態では、ＶＥＧＦＡは、ヒトＶＥＧＦＡ

またはマウスＶＥＧＦＡである。
【００３４】
本明細書で使用される場合、所定の参照タンパク質のアイソフォーム、フラグメント、バリアントまたはホモログは、参照タンパク質のアミノ酸配列に対して、少なくとも７０％の配列同一性、好ましくは８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するものと特徴付けることができる。「フラグメント」とは、一般に、参照タンパク質の一部分を指す。「バリアント」とは、一般に、参照タンパク質のアミノ酸配列に対して１つまたは複数のアミノ酸置換、挿入、欠失、または他の改変を含むが、参照タンパク質のアミノ酸配列に対してかなりの程度（例えば、少なくとも６０％）の配列同一性を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を指す。「アイソフォーム」とは、一般に、参照タンパク質の種と同じ種によって発現される参照タンパク質のバリアントを指す。「ホモログ」とは、一般に、参照タンパク質の種と比較して、異なる種によって産生される参照タンパク質のバリアントを指す。ホモログは、オーソログを含む。
【００３５】
ＶＥＧＦＡのアイソフォームは、当然、ＶＥＧＦ２０６（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１）、ＶＥＧＦ１８９（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－２）、ＶＥＧＦ１６５（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－４）、およびＶＥＧＦ１２１（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－９）を含む。ＶＥＧＦＡのアイソフォームはまた、ＶＥＧＦ１８３（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－３）、ＶＥＧＦ１４８（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－５）、ＶＥＧＦ１４５（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－６）、ＶＥＧＦ１６５Ｂ（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－８）、ＶＥＧＦ１１１（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１０）、Ｌ－ＶＥＧＦ１６５（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１１）、Ｌ－ＶＥＧＦ１２１（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１２）、Ｌ－ＶＥＧＦ１８９（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１３）、Ｌ－ＶＥＧＦ２０６（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１４）、ＶＥＧＦＡアイソフォーム１５（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１５）、ＶＥＧＦＡアイソフォーム１６（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１６）、ＶＥＧＦＡアイソフォーム１７（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１７）、およびＶＥＧＦＡアイソフォーム１８（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５６９２－１８）を含む。
【００３６】
ＶＥＧＦＡのアイソフォーム、フラグメント、バリアントまたはホモログは、任意選択で、所定の種、例えばヒト由来の未成熟または成熟ＶＥＧＦＡアイソフォームのアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性を有するものと特徴付けることができる。
【００３７】
一部の実施形態では、ＶＥＧＦＡはヒトＶＥＧＦＡである。一部の実施形態では、ＶＥＧＦＡはマウスＶＥＧＦＡである。
アイソフォーム、フラグメント、バリアント、またはホモログは、任意選択で、例えば、機能的特性／活性に関する適切なアッセイによる分析によって決定される、参照ＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）の機能的特性／活性を有する、機能的アイソフォーム、フラグメント、バリアント、またはホモログであり得る。例えば、ＶＥＧＦＡのアイソフォーム、フラグメント、バリアントまたはホモログは、ＶＥＧＦ受容体（例えば、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２および／またはＶＥＧＦＲ３）との結合を示し得る。
【００３８】
一部の実施形態では、ＶＥＧＦＡは、配列番号６０、６１、６２または６３と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００３９】

一部の実施形態では、ＶＥＧＦＡまたはそのフラグメントは、配列番号６４、６５、６６または６７と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００４０】

ＶＥＧＦは、ＶＥＧＦ受容体（ＶＥＧＦＲ）であるＶＥＧＦＲ１（ＡＡＨ３９００７．１　ＧＩ：２４６６０３７２）、ＶＥＧＦＲ２（Ｐ３５９６８．２　ＧＩ：９０８７２１８）およびＶＥＧＦＲ３（ＡＡＡ８５２１５．１　ＧＩ：１１５０９９１）と結合することを介してその生物学的効果を発揮する。各受容体は、ＶＥＧＦに対する細胞外結合ドメイン、膜貫通配列、および細胞内チロシンキナーゼ部分を有する。ＶＥＧＦの細胞外受容体ドメインへの結合により、受容体が二量体化し、細胞内チロシンキナーゼ部分がリン酸化される。ＶＥＧＦＡは、主としてＶＥＧＦＲ１およびＶＥＧＦＲ２を介してその生物学的効果を発揮することが示されている。

【００４１】

本明細書では、「ＶＥＧＦＲ１」、「ＶＥＧＦＲ２」および「ＶＥＧＦＲ３」は、それぞれ、任意の種由来のＶＥＧＦＲ１／ＶＥＧＦＲ２／ＶＥＧＦＲ３を指し、任意の種由来のアイソフォーム、フラグメント、バリアントまたはホモログを含む。一部の実施形態では、ＶＥＧＦＲ１／ＶＥＧＦＲ２／ＶＥＧＦＲ３は、哺乳動物（例えば、真獣類、胎盤類、上皮類、顕獣類、古人類、霊長類（アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長類またはヒト））由来である。一部の実施形態では、ＶＥＧＦＲ１／ＶＥＧＦＲ２／ＶＥＧＦＲ３は、ヒトまたはマウスのＶＥＧＦＲ１／ＶＥＧＦＲ２／ＶＥＧＦＲ３である。

【００４２】

ＶＥＧＦＲ１／ＶＥＧＦＲ２／ＶＥＧＦＲ３のアイソフォーム、フラグメント、バリアントまたはホモログは、任意選択で、所定の種、例えばヒト由来の関連分子の未成熟または成熟アイソフォームのアミノ酸配列と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するものとして特徴付けることができる。

【００４３】

本明細書では、「ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達」とは、ＶＥＧＦＡがＶＥＧＦ受容体に結合することによって開始されるシグナル伝達を指す。「シグナル伝達」とは、細胞活性を支配するシグナル伝達および他の細胞プロセスを指す。

【００４４】

ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達は、例えば、Ｇｅｉｎｄｒｅａｕら，　Ｉｎｔ　Ｊ　Ｍｏｌ　Ｓｃｉ．　（２０２１年）　２２（９）：４８７１頁に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達は、ＰＩ３Ｋ／ＡＫＴ、ＭＡＰＫ／ＥＲＫ、およびＰＬＣ－γ経路を介して、さらにまた、ＳＣＲおよびＦＡＫを介して細胞内で進行し、細胞の生存、増殖、細胞骨格の再構成を促進し、血管透過性、血管拡張における変化に影響を及ぼし、血管新生を促進する。

【００４５】

抗原結合分子

本開示は、ＶＥＧＦＡに結合することができる（すなわち、ＶＥＧＦＡに結合する）抗原結合分子を提供する。本開示は、ＶＥＧＦＡに特異的に結合する抗原結合分子を提供する。本開示に記載の抗原結合分子は、精製された形態または単離された形態で、すなわち、他の天然に存在する生物学的材料から提供することができる。

【００４６】

本明細書で使用される場合、「抗原結合分子」とは、標的抗原に結合することができる分子を指す。「抗原結合分子」という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体

、単一特異的抗体および多重特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）、および抗体フラグメント（例えば、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、ｓｃＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ$_2$、ダイアボディ、トリアボディ、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、ミニボディ、単一ドメイン抗体（ＶＨＨ）など）およびアプタマーを包含する。

【００４７】

より詳しくは、本開示に記載の抗原結合分子は、抗原結合ポリペプチド部分を含み、それは「抗原結合ドメイン」とも呼ばれ得る。好ましい実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡに特異的に結合する単一ドメイン抗体を含むか、またはそれからなる。

【００４８】

単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）は、当技術分野では「重鎖抗体上の単一可変ドメイン」、「ＶＨＨ」、「ナノボディ」、および「重鎖のみの抗体（ＨｃＡｂ）」と様々に呼ばれ、本明細書では時々「ＤｏｔＢｏｄｙ」と呼ぶこともあるが、これらは、例えば、ＨｅｎｒｙおよびＭａｃＫｅｎｚｉｅ，Ｆｒｏｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０１８年）９：４１頁、ならびにＢｅｖｅｒら，Ａｎａｌ Ｂｉｏａｎａｌ Ｃｈｅｍ．（２０１６年）４０８（２２）：５９８５～６００２頁に記載されており、この両文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００４９】

単一ドメイン抗体は、単一の単量体抗体可変ドメインで形成される。最初の単一ドメイン抗体はラクダ類において確認される重鎖抗体から作製されたが、軟骨魚類もまた重鎖抗体を有する。

【００５０】

本開示に記載の単一ドメイン抗体は、一般に、３つの相補性決定領域ＣＤＲ：ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む。３つのＣＤＲは、一緒になって、標的抗原に結合する部分である分子のパラトープを規定する。

【００５１】

単一ドメイン抗体は、各ＣＤＲの両側にフレームワーク領域（ＦＲ）をさらに含み、ＣＤＲの足場を提供する。Ｎ末端からＣ末端まで、単一ドメイン抗体は、以下の構造：Ｎ末端－［ＦＲ１］－［ＣＤＲ１］－［ＦＲ２］－［ＣＤＲ２］－［ＦＲ３］－［ＣＤＲ３］－［ＦＲ４］－Ｃ末端を含む。

【００５２】

抗体のＣＤＲおよびＦＲの定義には、Ｋａｂａｔら，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版 Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１年）、Ｃｈｏｔｈｉａら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１～９１７頁（１９８７年）に記載されているものなど、またＶＢＡＳＥ２には、Ｒｅｔｔｅｒら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２００５年）３３（上掲１）：Ｄ６７１～Ｄ６７４頁に記載されているものなど、いくつかの異なる規定がある。

【００５３】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、本明細書に記載のＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のＣＤＲを含むか、または本明細書に記載のＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体に由来するＣＤＲを含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、本明細書に記載のＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のＦＲを含むか、または本明細書に記載のＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体に由来するＦＲを含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、本明細書に記載のＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のＣＤＲおよびＦＲを含むか、または本明細書に記載のＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体に由来するＣＤＲおよびＦＲを含む。すなわち、一部の実施形態では、抗原結合分子は、本明細書に記載のＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のアミノ酸配列を含むか、または本明細書に記載のＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体に由来するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、本明細書で言及される抗原結合分子のＣ

ＤＲおよびＦＲは、ＩＭＧＴ情報システム（国際ＩＭＧＴ（ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ）情報システム（ＬｅＦｒａｎｃら，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２０１５年）４３（Ｄａｔａｂａｓｅ ｉｓｓｕｅ）：Ｄ４１３～２２頁に記載）、これはＬｅｆｒａｎｃら，Ｄｅｖ．Ｃｏｍｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２００３年）２７：５５～７７頁に記載されているＩＭＧＴ Ｖ－ＤＯＭＡＩＮ番号付与規則を使用）、Ｋａｂａｔシステム（Ｋａｂａｔら，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版 Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１年）に記載）またはＣｈｏｔｈｉａシステム（Ｃｈｏｔｈｉａら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１～９１７頁（１９８７年）に記載）に従い規定される。

【００５４】

一部の実施形態では、本明細書で言及される抗原結合分子（例えば、単一ドメイン抗体）のＣＤＲおよびＦＲは、Ｋａｂａｔシステムに従って規定される。一部の実施形態では、配列番号１、５、９、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４９、５３および５７のアミノ酸配列において、ＦＲ１は、１位～３１位のアミノ酸配列によって形成される；ＣＤＲ１は、３２位～３６位のアミノ酸配列によって形成される；ＦＲ２は、３７位～５０位のアミノ酸配列によって形成される；ＣＤＲ２は、５１位～６７位のアミノ酸配列によって形成される；ＦＲ３は、６８位～９９位のアミノ酸配列によって形成される；ＣＤＲ３は、１００位～１１９位のアミノ酸配列によって形成される；ＦＲ４は、１２０位～１３０位のアミノ酸配列によって形成される。

【００５５】

本明細書で使用される場合、参照アミノ酸配列／ドメインに「由来する」アミノ酸配列／ドメインは、参照配列と少なくとも６０％の配列同一性、例えば、少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む。

【００５６】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、１３Ａ６、１６Ａ２．１、１６Ａ６．１、２０Ａ２．１、２０Ａ３．１、２１Ａ１．１、２１Ａ８．１、２１Ｄ９．１、２１Ｅ６．１および２３Ｄ５．１から選択されるＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のＣＤＲ、ＦＲおよび／または完全アミノ酸配列を含む。

【００５７】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号１、５、９、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４９、５３、または５７のうちの１つに記載のアミノ酸配列を有するＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のＣＤＲ、ＦＲおよび／または完全アミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号１、５、９、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４９、５３または５７のうちの１つに記載のアミノ酸配列を有するＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のＣＤＲ（すなわちＣＤＲ１、２および３）を含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号１、５、９、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４９、５３または５７のうちの１つに記載のアミノ酸配列を有するＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のＦＲ（すなわちＦＲ１、２、３および４）を含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号１、５、９、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４９、５３または５７のうちの１つに記載のアミノ酸配列を有するＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のＣＤＲ（すなわちＣＤＲ１、２および３）ならびにＦＲ（すなわちＦＲ１、２、３および４）を含む。

【００５８】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下の（１）～（１３）のうちの１つに記載の単一ドメイン抗体配列を含むか、またはそれからなる：

（１）（ＣｏｎＡＩＩ）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：

配列番号４５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号４６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号４８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（２）（Ｃｏｎ１６Ａ２．１由来）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号５０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号５１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号５２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（３）（Ｃｏｎ２１／２３）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号５４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号５５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号５６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（４）（１３Ａ６）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（５）（１６Ａ２．１）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（６）（１６Ａ６．１）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（７）（２０Ａ２．１）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（８）（２０Ａ３．１）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号１８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号１９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（９）（２１Ａ１．１）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号２１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号２２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２

配列番号２３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（１０）（２１Ａ８．１）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号２５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号２６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号２７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（１１）（２１Ｄ９．１）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号２９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号３１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（１２）（２１Ｅ６．１）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号３３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号３５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（１３）（２３Ｄ５．１）以下のＣＤＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号３７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１
配列番号３８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２
配列番号３９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３
またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２、もしくはＣＤＲ３のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
【００５９】
一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下の（１４）～（１６）のうちの１つに記載の単一ドメイン抗体配列を含むか、またはそれからなる：
（１４）（ＣｏｎＡＩＩ）以下のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号４０のアミノ酸配列を有するＦＲ１
配列番号４１のアミノ酸配列を有するＦＲ２
配列番号４７のアミノ酸配列を有するＦＲ３
配列番号４４のアミノ酸配列を有するＦＲ４
またはＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、もしくはＦＲ４のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（１５）（１３Ａ６、１６Ａ２．１、２０Ａ２．１、２０Ａ３．１、２１Ａ１．１、２１Ａ８．１、２１Ｄ９．１、２１Ｅ６．１）以下のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号４０のアミノ酸配列を有するＦＲ１
配列番号４１のアミノ酸配列を有するＦＲ２
配列番号４２のアミノ酸配列を有するＦＲ３
配列番号４４のアミノ酸配列を有するＦＲ４
またはＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、もしくはＦＲ４のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。
（１６）（１６Ａ６．１）以下のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列：
配列番号４０のアミノ酸配列を有するＦＲ１
配列番号４１のアミノ酸配列を有するＦＲ２
配列番号４３のアミノ酸配列を有するＦＲ３
配列番号４４のアミノ酸配列を有するＦＲ４

またはＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、もしくはＦＲ４のうちの１つもしくは複数の中の１つもしくは２つもしくは３つのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されているそのバリアント。

【００６０】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、上記（１）～（１３）のうちの１つに記載のＣＤＲ、および上記（１４）～（１６）のうちの１つに記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列を含むか、またはそれからなる。

【００６１】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下の（１７）～（２９）のうちの１つに記載の単一ドメイン抗体配列を含むか、またはそれからなる：

（１７）（ＣｏｎＡＩＩ）（１）に記載のＣＤＲおよび（１４）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（１８）（Ｃｏｎ１６Ａ２．１由来）（２）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（１９）（Ｃｏｎ２１／２３）（３）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２０）（１３Ａ６）（４）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２１）（１６Ａ２．１）（５）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２２）（１６Ａ６．１）（６）に記載のＣＤＲおよび（１６）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２３）（２０Ａ２．１）（７）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２４）（２０Ａ３．１）（８）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２５）（２１Ａ１．１）（９）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２６）（２１Ａ８．１）（１０）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２７）（２１Ｄ９．１）（１１）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２８）（２１Ｅ６．１）（１２）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

（２９）（２３Ｄ５．１）（１３）に記載のＣＤＲおよび（１５）に記載のＦＲを含む単一ドメイン抗体配列。

【００６２】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、以下の（３０）～（４２）のうちの１つに記載の単一ドメイン抗体配列を含むか、またはそれからなる：

（３０）（ＣｏｎＡＩＩ）配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。

（３１）（Ｃｏｎ１６Ａ２．１由来）配列番号５３のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。

（３２）（Ｃｏｎ２１／２３）配列番号５７のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８

９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（３３）（１３Ａ６）配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（３４）（１６Ａ２．１）配列番号５のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（３５）（１６Ａ６．１）配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（３６）（２０Ａ２．１）配列番号１２のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（３７）（２０Ａ３．１）配列番号１６のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（３８）（２１Ａ１．１）配列番号２０のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（３９）（２１Ａ８．１）配列番号２４のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（４０）（２１Ｄ９．１）配列番号２８のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（４１）（２１Ｅ６．１）配列番号３２のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。
（４２）（２３Ｄ５．１）配列番号３６のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％

、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む単一ドメイン抗体配列。

【００６３】

１つまたは複数のアミノ酸が別のアミノ酸で置換される本開示に記載の実施形態では、置換は、例えば以下の表による、保存的置換であり得る。一部の実施形態では、中央の列の同じブロック内のアミノ酸が置換される。一部の実施形態では、右端の列の同じ行のアミノ酸が置換される：

【００６４】

【表１】

脂肪族	非極性	ＧＡＰ
		ＩＬＶ
	極性－非荷電	ＣＳＴＭ
		ＮＱ
	極性－荷電	ＤＥ
		ＫＲ
芳香族		ＨＦＷＹ

【００６５】

一部の実施形態では、置換は、機能的に保存的であり得る。すなわち、一部の実施形態では、置換は、同等の非置換分子と比較して、置換を含む抗原結合分子の１つまたは複数の機能的特性（例えば標的結合）に影響を与えない可能性がある（または実質的に影響を与えない可能性がある）。

【００６６】

一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、免疫グロブリン重鎖定常配列の１つまたは複数の領域（例えば、ＣＨ１、ＣＨ２および／またはＣＨ３）を含む。一部の実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常配列は、ＩｇＧ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、ＩｇＡ（例えば、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２）、ＩｇＤ、ＩｇＥ、またはＩｇＭ、例えば、ヒトＩｇＧ（例えば、ｈＩｇＧ１、ｈＩｇＧ２、ｈＩｇＧ３、ｈＩｇＧ４）、ｈＩｇＡ（例えば、ｈＩｇＡ１、ｈＩｇＡ２）、ｈＩｇＤ、ｈＩｇＥ、またはｈＩｇＭの重鎖定常配列であるか、またはそれに由来する。一部の実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常配列は、ヒトＩｇＧ１アロタイプ（例えば、Ｇ１ｍ１、Ｇ１ｍ２、Ｇ１ｍ３またはＧ１ｍ１７）の重鎖定常配列であるか、またはそれに由来する。

【００６７】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号６９のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む。

【００６８】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号７０のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むＣＨ１領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号７１のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むヒンジ領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号７

２のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むＣＨ２領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、配列番号７３のアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むＣＨ３領域を含む。

【００６９】

一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、Ｆｃ領域を含む。Ｆｃ領域は、１つのポリペプチド由来のＣＨ２領域およびＣＨ３領域と、別のポリペプチド由来のＣＨ２領域およびＣＨ３領域で構成される。２つのポリペプチド由来のＣＨ２領域とＣＨ３領域は、一緒になってＦｃ領域を形成する。

【００７０】

Ｆｃ領域は、Ｆｃ受容体および免疫系の他の分子との相互作用を提供し、機能的効果をもたらす。ＩｇＧ　Ｆｃ媒介性エフェクター機能は、例えば、Ｊｅｆｆｅｒｉｓら，　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｒｅｖ　１９９８年　１６３：５９～７６頁（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）において概説されており、Ｆｃ領域と免疫細胞によって発現されるＦｃ受容体との間の相互作用、Ｆｃ領域と補体タンパク質Ｃ１ｑとの結合を介した補体経路成分の動員、およびその結果としての補体カスケードの活性化を通じて、免疫細胞（例えば、マクロファージ、樹状細胞、好中球、好塩基球、好酸球、血小板、マスト細胞、ＮＫ細胞およびＴ細胞）のＦｃ媒介性の動員および活性化を介してもたらされる。Ｆｃ媒介性機能には、Ｆｃ受容体結合、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞媒介性食作用（ＡＤＣＰ）、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、膜攻撃複合体（ＭＡＣ）の形成、細胞脱顆粒、サイトカインおよび／またはケモカインの産生、ならびに抗原のプロセシングおよび提示が含まれる。

【００７１】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞（例えば、ＶＥＧＦＡを発現する細胞、および／または細胞表面にＶＥＧＦＡを含む複合体）に対するＡＤＣＣ、ＡＤＣＰ、ＣＤＣのうちの１つまたは複数を増強／誘導すること、および／または細胞上のＭＡＣの形成もしくは細胞脱顆粒を増強することができるＦｃ領域を含む。

【００７２】

Ｆｃ媒介性機能に影響を及ぼす抗体Ｆｃ領域への改変は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｗａｎｇら，　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｅｌｌ　（２０１８年）９（１）：６３～７３頁に記載されているものなど、当技術分野において公知である。抗体エフェクター機能に影響を及ぼすことが公知である例示的なＦｃ領域改変は、Ｗａｎｇら，　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｅｌｌ　（２０１８年）　９（１）：６３～７３頁の表１に要約されている。

【００７３】

多重特異的抗原結合分子もまた企図されている。「多重特異的」とは、抗原結合分子が複数の標的に対して特異的結合を示すことを意味する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、二重特異的抗原結合分子である。一部の実施形態では、抗原結合分子は、少なくとも２つの異なる抗原結合ドメインを含む。

【００７４】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡおよび別の標的（例えば、ＶＥＧＦＡ以外の抗原）に結合するので、少なくとも二重特異的である。「二重特異的」という用語は、抗原結合分子が少なくとも２つの異なる抗原決定基に特異的に結合できることを意味する。

【００７５】

本開示に記載の抗原結合分子（例えば、多重特異的抗原結合分子）は、抗原結合分子が特異的である標的に結合することが可能な抗原結合分子を含み得ることは理解されよう。例えば、ＶＥＧＦＡおよびＶＥＧＦＡ以外の抗原に結合する抗原結合分子は、（ｉ）ＶＥＧＦＡに結合する抗原結合分子、および（ｉｉ）ＶＥＧＦＡ以外の抗原に結合する抗原結合分子を含み得る。一部の実施形態では、より大きな抗原結合分子（例えば、多重特異的抗原結合分子）の構成成分の抗原結合分子は、例えば、より大きな抗原結合分子の「抗原結合ドメイン」または「抗原結合領域」と呼ぶことができる。

【００７６】

また、本開示に記載の抗原結合分子（例えば、多重特異的抗原結合分子）は、抗原結合分子が特異的である標的に結合することが可能な抗原結合ポリペプチドまたは抗原結合ポリペプチド複合体を含んでいてもよいことも理解されよう。

【００７７】

一部の実施形態では、多重特異的抗原結合分子中のＶＥＧＦＡ以外の抗原は、免疫細胞表面分子である。一部の実施形態では、抗原はがん細胞抗原である。一部の実施形態では、抗原は、受容体分子、例えば細胞表面受容体である。一部の実施形態では、抗原は、細胞シグナル伝達分子、例えば、サイトカイン、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、またはリンホカインである。一部の実施形態では、抗原は、増殖因子またはホルモンである。

【００７８】

がん細胞抗原は、がん細胞によって発現または過剰発現される抗原である。がん細胞抗原は、任意のペプチド／ポリペプチド、糖タンパク質、リポタンパク質、グリカン、糖脂質、脂質、またはそれらのフラグメントであり得る。がん細胞抗原の発現は、がんに関連している可能性がある。がん細胞抗原は、がん細胞によって異常に発現され得る（例えば、がん細胞抗原は異常な局在化をもって発現され得る）か、またはがん細胞によって異常な構造をもって発現され得る。がん細胞抗原は、免疫応答を誘発できる可能性があり得る。一部の実施形態では、抗原は、がん細胞の細胞表面で発現される（すなわち、がん細胞抗原は、がん細胞表面抗原である）。一部の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合分子によって結合される抗原の部分は、がん細胞の外表面上に提示される（すなわち、細胞外である）。がん細胞抗原は、がん関連抗原であり得る。一部の実施形態では、がん細胞抗原は、その発現ががんの症状の発症、進行、または重症度に関連する抗原である。がん関連抗原は、がんの原因もしくは病理に関連している可能性があるか、またはがんの結果として異常に発現され得る。一部の実施形態では、がん細胞抗原は、例えば、同等の非がん性細胞（例えば、同じ組織／細胞型に由来する非がん性細胞）による発現レベルと比較した場合に、がん細胞によって発現が（例えば、ＲＮＡおよび／またはタンパク質レベルで）上方調節される抗原である。一部の実施形態では、がん関連抗原は、がん性細胞によって優先的に発現され、同等の非がん性細胞（例えば、同じ組織／細胞型に由来する非がん性細胞）によっては発現されないことがある。一部の実施形態では、がん関連抗原は、変異したがん遺伝子または変異した腫瘍抑制遺伝子の産物であり得る。一部の実施形態では、がん関連抗原は、過剰発現された細胞タンパク質の産物、発がん性ウイルスによって産生されるがん抗原、がん胎児性抗原、または細胞表面の糖脂質もしくは糖タンパク質であり得る。

【００７９】

免疫細胞表面分子は、免疫細胞の細胞表面でまたは細胞表面上に発現される任意のペプチド／ポリペプチド、糖タンパク質、リポタンパク質、グリカン、糖脂質、脂質、またはそれらのフラグメントであり得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子によって結合される免疫細胞表面分子の部分は、免疫細胞の外表面上にある（すなわち、細胞外にある）。免疫細胞表面分子は、任意の免疫細胞の細胞表面で発現され得る。一部の実施形態では、免疫細胞は、造血起源の細胞、例えば、好中球、好酸球、好塩基球、樹状細胞、リンパ球、または単球であり得る。リンパ球は、例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＮＫＴ細胞もしくは自然リンパ球（ＩＬＣ）、またはそれらの前駆体

（例えば、胸腺細胞もしくはプレＢ細胞）であり得る。一部の実施形態では、抗原は、ＣＤ３ポリペプチド（例えば、ＣＤ３ε、ＣＤ３δ、ＣＤ３γまたはＣＤ３ζ）である。

【００８０】

一部の実施形態では、本明細書に記載の多重特異的抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡに対して少なくとも一価の結合を示し、またＶＥＧＦＡ以外の抗原に対して少なくとも一価の結合を示す。結合価とは、所定の抗原決定基に対する抗原結合分子内の結合部位の数を指す。

【００８１】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡに結合することが可能な単一ドメイン抗体（例えば、本明細書に記載のもの）、およびＶＥＧＦＡ以外の抗原に結合することが可能な抗原結合領域（例えば、ポリペプチド（例えば、単一ドメイン抗体）、Ｆｖ、Ｆａｂまたは抗体）を含む。

【００８２】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、免疫細胞エンゲージング部分を含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、免疫細胞エンゲージャーである。免疫細胞エンゲージャーは、例えば、ＧｏｅｂｅｌｅｒおよびＢａｒｇｏｕ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．（２０２０年）１７：４１８～４３４頁、ならびにＥｌｌｅｒｍａｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ（２０１９年）１５４：１０２～１１７頁において概説されており、その両方とも、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００８３】

免疫細胞エンゲージャー分子は、目的の標的抗原に対する抗原結合領域と、目的の免疫細胞をリクルート／エンゲージするための抗原結合領域とを含む。免疫細胞エンゲージャーは、免疫細胞表面分子に特異的な抗原結合領域を通じて免疫細胞をリクルート／エンゲージする。

【００８４】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＣＤ３ポリペプチド結合部分（例えば、ＣＤ３ポリペプチドに結合することが可能な抗原結合ドメイン）を含む。最もよく研究されている免疫細胞エンゲージャーは、二重特異的Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）であり、これは標的抗原結合ドメインとＣＤ３ポリペプチド（典型的にはＣＤ３ε）結合ドメインを含み、ＢｉＴＥはこれを通してＴ細胞をリクルートする。ＢｉＴＥがその標的抗原およびＴ細胞によって発現されるＣＤ３ポリペプチドに結合すると、Ｔ細胞が活性化され、最終的に標的抗原を発現する細胞に対するＴ細胞エフェクター活性が指示される。他の種類の免疫細胞エンゲージャーは当技術分野において周知であり、ＮＫ細胞をリクルートして活性化する二重特異的キラーエンゲージャー（ＢｉＫＥ）などのナチュラルキラー細胞エンゲージャーを含む。

【００８５】

一部の実施形態では、免疫細胞エンゲージャーによりエンゲージされる免疫細胞は、Ｔ細胞またはＮＫ細胞である。一部の実施形態では、免疫細胞エンゲージャーは、Ｔ細胞エンゲージャーである。

【００８６】

抗原結合分子の特定の例示的な実施形態

一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号４９と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００８７】

一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号５３と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００８８】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号５７と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００８９】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号１と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００９０】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号５と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００９１】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号９と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００９２】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号１２と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００９３】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号１６と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００９４】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号２０と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００９５】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号２４と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００９６】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号２８と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００９７】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号３２と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【００９８】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、配列番号３６と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【００９９】
リンカーおよび追加の配列
抗原結合分子は、標的抗原への結合に必要なアミノ酸配列に加えて、追加のアミノ酸／アミノ酸の配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのような追加のアミノ酸／アミノ酸の配列は、本開示に記載の単一ドメイン抗体配列のＮ末端に提供される。一部の実施形態では、そのような追加のアミノ酸／アミノ酸の配列は、本開示に記載の単一ドメイン抗体配列のＣ末端に提供される。一部の実施形態では、そのような追加のアミノ酸／アミノ酸の配列は、本開示に記載の単一ドメイン抗体配列のＮ末端およびＣ末端に提供される。
【０１００】
一部の実施形態では、抗原結合分子は、アミノ酸サブ配列間に１つまたは複数のリンカー配列を含む。例えば、リンカー配列は、本開示に記載の抗原結合分子の抗原結合ドメインの一端または両端に提供され得る。
【０１０１】
リンカー配列は当業者に公知であり、例えば、Ｃｈｅｎら，　Ａｄｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ　Ｒｅｖ　（２０１３年）　６５（１０）：１３５７～１３６９頁に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、リンカー配列は、フレキシブルリンカー配列であり得る。フレキシブルリンカー配列により、リンカー配列によって連結されたアミノ酸配列の相対的な移動が可能になる。フレキシブルリンカーは当業者に公知であり、いくつかはＣｈｅｎら，　Ａｄｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ　Ｒｅｖ　（２０１３年）　６５（１０）：　１３５７～１３６９頁において同定されている。フレキシブルリンカー配列は、多くの場合、グリシン残基および／またはセリン残基を高い割合で含む。
【０１０２】
一部の実施形態では、リンカー配列は、少なくとも１つのグリシン残基および／または少なくとも１つのセリン残基を含む。一部の実施形態では、リンカー配列は、グリシン残基およびセリン残基からなる。一部の実施形態では、リンカー配列は、グリシン残基およびセリン残基からなる配列モチーフ、例えばG_4Sの１つまたは複数（例えば、１、２、３、４、５、６または７つのうちの１つ）のコピーを（例えばタンデムに）含む。一部の実施形態では、リンカー配列は、１～２、１～３、１～４、１～５、１～１０、１～１５、１～２０、１～２５、または１～３０アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、リンカー配列は、配列番号５８のアミノ酸配列と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％のアミノ酸配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。
【０１０３】
本開示の抗原結合分子およびポリペプチドは、さらなるアミノ酸またはアミノ酸の配列を追加的に含んでいてもよい。例えば、抗原結合分子およびポリペプチドは、抗原結合分子／ポリペプチドの発現、フォールディング、輸送、プロセシング、精製、または検出を容易にするためのアミノ酸配列（複数可）を含み得る。例えば、抗原結合分子／ポリペプチドは、Ｈｉｓ（例えば６ＸＨｉｓ）、Ｍｙｃ、ＧＳＴ、ＭＢＰ、ＦＬＡＧ、ＨＡ、Ｅ、またはビオチンタグをコードする配列を、任意選択で抗原結合分子／ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に含み得る。一部の実施形態では、抗原結合分子／ポリペプチドは、検出可能な部分、例えば、蛍光標識、発光標識、免疫検出可能標識、放射性標識、化学標識、核酸標識、または酵素標識を含む。

【０１０４】
本開示の抗原結合分子およびポリペプチドは、シグナルペプチド（リーダー配列またはシグナル配列としても公知である）を追加的に含み得る。シグナルペプチドは、通常、５～３０個の疎水性アミノ酸の配列からなり、１本のアルファヘリックスを形成する。分泌タンパク質および細胞表面で発現されるタンパク質は、多くの場合、シグナルペプチドを含む。
【０１０５】
シグナルペプチドは、抗原結合分子／ポリペプチドのＮ末端に存在し得る。シグナルペプチドは、抗原結合分子／ポリペプチドの効率的な輸送および分泌を提供することができる。シグナルペプチドは、典型的には、切断によって除去されるため、抗原結合分子を発現する細胞から分泌される成熟抗原結合分子／ポリペプチドには含まれない。
【０１０６】
シグナルペプチドは多くのタンパク質で知られ、ＧｅｎＢａｎｋ、ＵｎｉＰｒｏｔ、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ、ＴｒＥＭＢＬ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ、Ｅｎｓｅｍｂｌ、ＩｎｔｅｒＰｒｏなどのデータベースに記録されており、および／または、例えばＳｉｇｎａｌＰ（Ｐｅｔｅｒｓｅｎら，２０１１年 Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ８：７８５～７８６頁）もしくはＳｉｇｎａｌ－ＢＬＡＳＴ（ＦｒａｎｋおよびＳｉｐｐｌ，２００８年 Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２４：２１７２～２１７６頁）などのアミノ酸配列解析ツールを使用して同定／予測することができる。
【０１０７】
標識およびコンジュゲート
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、検出可能な部分を追加的に含む。
一部の実施形態では、抗原結合分子は、検出可能な部分、例えば、蛍光標識、リン光標識、発光標識、免疫検出可能な標識（例えばエピトープタグ）、放射性標識、化学標識、核酸標識、または酵素標識を含む。抗原結合分子は、検出可能な部分で共有結合的または非共有結合的に標識され得る。
【０１０８】
蛍光標識には、例えば、フルオレセイン、ローダミン、アロフィコシアニン、エオシンおよびＮＤＢ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ユーロピウム（Ｅｕ）、テルビウム（Ｔｂ）およびサマリウム（Ｓｍ）などの希土類キレート、テトラメチルローダミン、テキサスレッド、４－メチルウンベリフェロン、７－アミノ－４－メチルクマリン、Ｃｙ３、およびＣｙ５が含まれる。放射性標識には、ヨウ素^{123}、ヨウ素^{125}、ヨウ素^{126}、ヨウ素^{131}、ヨウ素^{133}、臭素^{77}、テクネチウム^{111}、インジウム^{111}、インジウム^{113m}、ガリウム^{67}、ガリウム^{68}、ルテニウム^{95}、ルテニウム^{97}、ルテニウム^{103}、ルテニウム^{105}、水銀^{207}、水銀^{203}、レニウム^{99m}、レニウム^{101}、レニウム^{105}、スカンジウム^{47}、テルル^{121m}、テルル^{122m}、テルル^{125m}、ツリウム^{165}、ツリウム^{167}、ツリウム^{168}、銅^{67}、フッ素^{18}、イットリウム^{90}、パラジウム^{100}、ビスマス^{217}、アンチモン^{211}などの放射性同位体が含まれる。発光標識には、放射性発光標識、化学発光標識（例えば、アクリジニウムエステル、ルミノール、イソルミノール）および生物発光標識が含まれる。免疫検出可能な標識には、ハプテン、ペプチド／ポリペプチド、抗体、受容体およびリガンド、例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンまたはジゴキシゲニンが含まれる。核酸標識には、アプタマーが含まれる。酵素標識には、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ－ガラクトシダーゼ、およびルシフェラーゼが含まれる。
【０１０９】
一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、化学部分にコンジュゲートされる。化学的部分は、治療効果を提供するための部分であり得る。抗体医薬コンジュゲートは、例えば、Ｐａｒｓｌｏｗら，Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅｓ．２０１６年９月；４（３）：１４頁において概説されている。一部の実施形態では、化学部分は、抗原結合分子がＶＥ

ＧＦＡを含む／発現する細胞（例えば、ＶＥＧＦＡを発現する細胞および／またはＶＥＧＦＡを細胞表面に含む複合体）に対して細胞傷害性を示すような薬物部分（例えば、細胞傷害剤）であり得る。一部の実施形態では、薬物部分は、化学療法剤であり得る。一部の実施形態では、薬物部分は、カリケアマイシン、ＤＭ１、ＤＭ４、モノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）、モノメチルオーリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）、ＳＮ－３８、ドキソルビシン、デュオカルマイシン、Ｄ６．５、およびＰＢＤから選択される。

【０１１０】

抗原結合分子の機能特性

本明細書に記載の抗原結合分子は、ある特定の機能特性を参照することによって特徴付けることができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合分子は、以下の特性のうちの１つまたは複数を保持し得る：

ＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦＡおよび／またはマウスＶＥＧＦＡ）に結合する；

ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ（すなわち、ＶＥＧＦＡの受容体、例えばＶＥＧＦＲ１）の間の相互作用を阻害する；

ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲによって媒介されるシグナル伝達を阻害する；

熱処理後もＶＥＧＦＡへの結合を維持する；

ＶＥＧＦＡを発現する細胞の数／割合を減少させる；

ＶＥＧＦＡを発現する細胞の細胞死滅を増加させる。

【０１１１】

所定の抗原結合分子は、前段落で述べた特性のうちの複数を示し得ることは理解されよう。所定の抗原結合分子は、適切なアッセイを使用して、前段落で述べた特性について評価され得る。アッセイは、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイであってもよく、それは無細胞アッセイであっても細胞ベースのアッセイであってもよい。あるいは、アッセイは、例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏアッセイであってもよく、すなわち、ヒト以外の動物において実施される。アッセイでは、検出を容易にするために、検出可能な実体で標識された種を用いることができる。

【０１１２】

このようなアッセイの結果の分析は、関連する活性の最大レベルの５０％が達成される濃度を決定することを含み得る。関連する活性の最大レベルの５０％が達成される抗原結合分子の濃度は、関連する活性に関して抗原結合分子の「半最大有効濃度」と呼ばれることがあり、これはまた、「EC_{50}」とも呼ばれ得る。例として、ＶＥＧＦＡへの結合に関する所定の抗原結合分子のEC_{50}は、関連する種への結合の最大レベルの５０％が達成される濃度であり得る。

【０１１３】

特性に応じて、EC_{50}は「半最大阻害濃度」または「IC_{50}」とも呼ばれる場合があり、これは、所定の性質の最大阻害レベルの５０％が観察される抗原結合分子の濃度である。例として、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ（例えばＶＥＧＦＲ１）の間の相互作用の阻害に関する所定の抗原結合分子のIC_{50}は、最大阻害レベルの５０％が達成される濃度であり得る。

【０１１４】

本明細書に記載の抗原結合分子および抗原結合ドメインは、好ましくは、ＶＥＧＦＡへの特異的結合を示す。本明細書で使用される場合、「特異的結合」とは、抗原に対して選択的であり、非標的抗原に対する非特異的結合と区別することができる結合を指す。標的分子に特異的に結合する抗原結合分子／ドメインは、好ましくは、他の非標的分子に結合するよりも高い親和性で、および／またはより長い持続時間で、標的に結合する。

【０１１５】

所定のポリペプチドが所定の分子に特異的に結合する能力は、当技術分野において公知の方法、例えば、ＥＬＩＳＡ、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ；Ｈｅａｒｔｙら，　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　（２０１２年）　９０７：４１１～４４２頁）、バイオレイヤー干渉法（例えば、Ｌａｄら，　（２０１５年）　Ｊ　Ｂｉｏｍｏｌ　Ｓｃｒｅｅｎ

２０（４）：４９８～５０７頁）、フローサイトメトリー、または放射性標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）酵素結合免疫吸着アッセイによる分析によって決定することができる。このような分析によって、所定の分子への結合を測定および定量化することができる。一部の実施形態では、結合は、所定のアッセイにおいて検出される応答であってもよい。

【０１１６】

一部の実施形態では、非標的分子に対する抗原結合分子の結合の程度は、例えば、ＥＬＩＳＡ、ＳＰＲ、バイオレイヤー干渉法によって、またはＲＩＡによって測定される標的分子に対する抗体の結合の約１０％未満である。あるいは、結合特異性は、抗原結合分子が、非標的分子に対する抗原結合分子のＫＤよりも少なくとも０．１桁（すなわち、０．１×１０^{n}、式中、ｎは桁を表す整数である）大きい解離定数（ＫＤ）で結合する結合親和性の観点から反映され得る。これは、任意選択で、少なくとも０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．５、または２．０のうちの１つであってもよい。

【０１１７】

ＶＥＧＦＡへの結合は、例えば、本開示の実施例１０に記載されているように、バイオレイヤー干渉法によって決定することができる。

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡに結合する。一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含むポリペプチド複合体に結合する。

【０１１８】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合分子は、マイクロモル未満の親和性で、すなわちK_D＜１ｘ１０$^{-6}$ＭでＶＥＧＦＡに結合する。一部の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合分子は、ナノモル範囲の親和性で、すなわちK_D＝９．９×１０$^{-7}$～１×１０$^{-9}$ＭでＶＥＧＦＡに結合する。一部の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合分子は、ナノモル未満の親和性で、すなわちK_D＜１ｘ１０$^{-9}$ＭでＶＥＧＦＡに結合する。一部の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合分子は、ピコモル範囲の親和性で、すなわちK_D＝９．９×１０$^{-10}$～１×１０$^{-12}$ＭでＶＥＧＦＡに結合する。一部の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合分子は、ピコモル未満の親和性で、すなわちK_D＜１ｘ１０$^{-12}$ＭでＶＥＧＦＡに結合する。

【０１１９】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合分子は、５μＭ以下、好ましくは≦５μＭ、≦２μＭ、≦１μＭ、≦５００ｎＭ、≦１００ｎＭ、≦７５ｎＭ、≦５０ｎＭ、≦４０ｎＭ、≦３０ｎＭ、≦２０ｎＭ、≦１５ｎＭ、≦１２．５ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦９ｎＭ、≦８ｎＭ、≦７ｎＭ、≦６ｎＭ、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ、≦５００ｐＭ、≦４００ｐＭ、≦３００ｐＭ、≦２００ｐＭ、≦１００ｐＭ、≦７５ｐＭ、≦５０ｐＭ、≦４５ｐＭ、≦４０ｐＭ、≦３５ｐＭ、≦３０ｐＭ、≦２５ｐＭ、≦２０ｐＭ、≦１５ｐＭ、または≦１０ｐＭのK_DでＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、K_D＝≦１ｎＭ、≦５００ｐＭ、≦４００ｐＭ、≦３００ｐＭ、≦２００ｐＭ、≦１００ｐＭ、≦７５ｐＭ、≦５０ｐＭ、≦４５ｐＭ、≦４０ｐＭ、≦３５ｐＭ、≦３０ｐＭ、≦２５ｐＭ、≦２０ｐＭ、≦１５ｐＭ、または≦１０ｐＭの親和性でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。

【０１２０】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、同じアッセイにおいて、ラニビズマブ（すなわち、配列番号７４および７５のポリペプチドの結合によって形成される分子）について決定されたK_Dと同様のK_D（例えば、本開示の実施例１０に記載されているように、例えば、ＢＬＩによって決定される）でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。同じアッセイにおいて、ラニビズマブについて決定されたK_Dの０．５倍以上で２倍以下、例えば、０．５５倍以上で１．９倍以下、０．６倍以上で１．８倍以下、０．６５倍以上で１．７倍以下、０．７倍以上で１．６倍以下、０．７５倍以上で

１．５倍以下、０．８倍以上で１．４倍以下、０．８５倍以上で１．３倍以下、０．９倍以上で１．２倍以下、０．９５倍以上で１．１倍以下のうちの１つであるK_D（例えば、本開示の実施例１０に記載されているように、例えば、ＢＬＩによって決定される）でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。

【０１２１】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、同じアッセイにおいて、ラニビズマブについて決定されたK_Dよりも低いK_D（例えば、本開示の実施例１０に記載されているように、例えば、ＢＬＩによって決定される）でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、同じアッセイにおいて、ラニビズマブについて決定されたK_Dの１倍未満、例えば、≦０．９９倍、≦０．９５倍、≦０．９倍、≦０．８５倍、≦０．８倍、≦０．７５倍、≦０．７倍、≦０．６５倍、≦０．６倍、≦０．５５倍、または≦０．５倍のうちの１つであるK_D（例えば、本開示の実施例１０に記載されているように、例えば、ＢＬＩによって決定される）でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。

【０１２２】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、同じアッセイにおいて、ベバシズマブ（すなわち、配列番号７６および７７のポリペプチドの結合によって形成される分子）について決定されたK_Dと同様のK_D（例えば、本開示の実施例１０に記載されているように、例えば、ＢＬＩによって決定される）でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。同じアッセイにおいて、ベバシズマブについて決定されたK_Dの０．５倍以上で２倍以下、例えば、０．５５倍以上で１．９倍以下、０．６倍以上で１．８倍以下、０．６５倍以上で１．７倍以下、０．７倍以上で１．６倍以下、０．７５倍以上で１．５倍以下、０．８倍以上で１．４倍以下、０．８５倍以上で１．３倍以下、０．９倍以上で１．２倍以下、０．９５倍以上で１．１倍以下のうちの１つであるK_D（例えば、本開示の実施例１０に記載されているように、例えば、ＢＬＩによって決定される）でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。

【０１２３】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、同じアッセイにおいて、ベバシズマブについて決定されたK_Dよりも低いK_D（例えば、本開示の実施例１０に記載されているように、例えば、ＢＬＩによって決定される）でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、同じアッセイにおいて、ベバシズマブについて決定されたK_Dの１倍未満、例えば、≦０．９９倍、≦０．９５倍、≦０．９倍、≦０．８５倍、≦０．８倍、≦０．７５倍、≦０．７倍、≦０．６５倍、≦０．６倍、≦０．５５倍、または≦０．５倍のうちの１つであるK_D（例えば、本開示の実施例１０に記載されているように、例えば、ＢＬＩによって決定される）でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦ１６５）に結合する。

【０１２４】

本開示の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡの目的の特定領域に結合し得る。本開示に記載の抗原結合分子は、アミノ酸の連続配列（すなわち、アミノ酸一次配列）からなる、ＶＥＧＦＡの直鎖エピトープに結合し得る。一部の実施形態では、抗原結合分子は、アミノ酸配列のアミノ酸の不連続配列からなる、ＶＥＧＦＡの立体構造エピトープに結合し得る。

【０１２５】

抗原結合分子が結合する所定の標的分子の領域は、抗体－抗原複合体のＸ線共結晶解析、ペプチドスキャニング、突然変異誘発マッピング、質量分析による水素－重水素交換解析、ファージディスプレイ、競合ＥＬＩＳＡ、およびタンパク質分解に基づく「保護」法を含む、当技術分野で周知の様々な方法を使用して、当業者により決定され得る。そのような方法は、例えば、Ｇｅｒｓｈｏｎｉら，ＢｉｏＤｒｕｇｓ，２００７年，２１（３）：１４５～１５６頁に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１２６】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡの同じ領域、またはＶＥＧＦＡの重複領域、または、１３Ａ６、１６Ａ２．１、１６Ａ６．１、２０Ａ２．１、２０Ａ３．１、２１Ａ１．１、２１Ａ８．１、２１Ｄ９．１、２１Ｅ６．１および２３Ｄ５．１から選択されるＶＥＧＦＡ結合単一ドメイン抗体のＣＤＲ、ＦＲおよび／または完全アミノ酸配列を含む抗原結合分子によって結合されるＶＥＧＦＡの領域に結合する。

【０１２７】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡがＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１および／またはＶＥＧＦＲ２）に結合するＶＥＧＦＡの領域に結合する。

【０１２８】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＲ（例えばＶＥＧＦＲ１）が結合している領域のＶＥＧＦＡに結合する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＲ（例えばＶＥＧＦＲ１）とＶＥＧＦＡとの間の相互作用を阻害する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＲ（例えばＶＥＧＦＲ１）のＶＥＧＦＡへの結合の競合的阻害剤である。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡがＶＥＧＦＲ（例えばＶＥＧＦＲ１）に結合するのを遮断する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＲ（例えばＶＥＧＦＲ１）が結合するＶＥＧＦＡの領域を占有し、それによりＶＥＧＦＲ（例えばＶＥＧＦＲ１）とＶＥＧＦＡとの間の相互作用が阻害される。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ（例えばＶＥＧＦＲ１）を含む複合体からＶＥＧＦＲ（例えばＶＥＧＦＲ１）を置き換える。

【０１２９】

２つの因子間の相互作用を阻害する抗原結合分子の能力は、例えば、抗体／フラグメントの存在下、または相互作用パートナーの一方もしくは両方と抗体／フラグメントとのインキュベーション後の相互作用を分析することによって決定することができる。所定の抗原結合分子が２つの相互作用パートナー間の相互作用を阻害するか否かを決定するための適切なアッセイの例は、競合ＥＬＩＳＡアッセイである。所定の相互作用（例えば、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲの間）を阻害する抗原結合分子は、抗原結合分子の非存在下（または適切な対照抗原結合分子の存在下）での相互作用レベルと比較して、抗原結合分子の存在下、または相互作用パートナー間の一方もしくは両方を抗原結合分子とインキュベーションした後に、相互作用パートナー間の相互作用レベルの減少／低下を観察することによって同定される。適切な分析は、例えば、組換え相互作用パートナーを使用して、または相互作用パートナーを発現する細胞を使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施することができる。相互作用パートナーを発現する細胞は、内因的に発現する場合があるか、または細胞に導入された核酸から発現することもあり得る。このようなアッセイの目的において、相互作用のレベルを検出および／または測定する目的で、相互作用パートナーおよび／または抗原結合分子の一方もしくは両方を標識するか、または検出可能な実体と組み合わせて使用することができる。

【０１３０】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１とヒトＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を、１０μＭ以下、好ましくは≦５μＭ、≦２μＭ、≦１μＭ、≦５００ｎＭ、≦１００ｎＭ、≦７５ｎＭ、≦５０ｎＭ、≦４０ｎＭ、≦３０ｎＭ、≦２０ｎＭ、≦１５ｎＭ、≦１２．５ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦９ｎＭ、≦８ｎＭ、≦７ｎＭ、≦６ｎＭ、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、または≦３ｎＭのうちの１つのIC_{50}（例えば、競合ＥＬＩＳＡ、例えば、本開示の実施例１１に記載の競合ＥＬＩＳＡによって決定される）で阻害する。

【０１３１】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１とヒトＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を、同じアッセイにおいて、ラニビズマブ（すなわち、配列番号７４および７５のポリペプチドの結合によって形成される分子）について決定された、そのような相互作用の阻害についてのIC_{50}と

同様のＩＣ５０（例えば、競合ＥＬＩＳＡ、例えば、本開示の実施例１１に記載の競合ＥＬＩＳＡによって決定される）で阻害する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１（例えばヒトＶＥＧＦ１２１とヒトＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を、同じアッセイにおいて、ラニビズマブによるそのような相互作用の阻害についてのＩＣ５０値の０．５倍以上で２倍未満、例えば、０．５５倍以上で１．９倍以下、０．６倍以上で１．８倍以下、０．６５倍以上で１．７倍以下、０．７倍以上で１．６倍以下、０．７５倍以上で１．５倍以下、０．８倍以上で１．４倍以下、０．８５倍以上で１．３倍以下、０．９倍以上で１．２倍以下、０．９５倍以上で１．１倍以下のうちの１つのＩＣ５０（例えば競合ＥＬＩＳＡ、例えば本開示の実施例１１に記載の競合ＥＬＩＳＡによって決定される）で阻害する。

【０１３２】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１とヒトＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を、同じアッセイにおいて、ラニビズマブについて決定された、そのような相互作用の阻害についてのＩＣ５０よりも低いＩＣ５０（例えば、競合ＥＬＩＳＡ、例えば、本開示の実施例１１に記載の競合ＥＬＩＳＡによって決定される）で阻害する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１（例えばヒトＶＥＧＦ１２１とヒトＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を、同じアッセイにおいて、ラニビズマブによるそのような相互作用の阻害についてのＩＣ５０値の１倍未満、例えば、≦０．９９倍、≦０．９５倍、≦０．９倍、≦０．８５倍、≦０．８倍、≦０．７５倍、≦０．７倍、≦０．６５倍、≦０．６倍、≦０．５５倍、または≦０．５倍のうちの１つのＩＣ５０（例えば競合ＥＬＩＳＡ、例えば本開示の実施例１１に記載の競合ＥＬＩＳＡによって決定される）で阻害する。

【０１３３】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１とヒトＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を、同じアッセイにおいて、ベバシズマブ（すなわち、配列番号７６および７７のポリペプチドの結合によって形成される分子）について決定された、そのような相互作用の阻害についてのＩＣ５０と同様のＩＣ５０（例えば、競合ＥＬＩＳＡ、例えば、本開示の実施例１１に記載の競合ＥＬＩＳＡによって決定される）で阻害する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１（例えばヒトＶＥＧＦ１２１とヒトＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を、同じアッセイにおいて、ベバシズマブによるそのような相互作用の阻害についてのＩＣ５０値の０．５倍以上で２倍未満、例えば、０．５５倍以上で１．９倍以下、０．６倍以上で１．８倍以下、０．６５倍以上で１．７倍以下、０．７倍以上で１．６倍以下、０．７５倍以上で１．５倍以下、０．８倍以上で１．４倍以下、０．８５倍以上で１．３倍以下、０．９倍以上で１．２倍以下、０．９５倍以上で１．１倍以下のうちの１つのＩＣ５０（例えば競合ＥＬＩＳＡ、例えば本開示の実施例１１に記載の競合ＥＬＩＳＡによって決定される）で阻害する。

【０１３４】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１とヒトＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を、同じアッセイにおいて、ベバシズマブについて決定された、そのような相互作用の阻害についてのＩＣ５０よりも低いＩＣ５０（例えば、競合ＥＬＩＳＡ、例えば、本開示の実施例１１に記載の競合ＥＬＩＳＡによって決定される）で阻害する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１（例えばヒトＶＥＧＦ１２１とヒトＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を、同じアッセイにおいて、ベバシズマブによるそのような相互作用の阻害についてのＩＣ５０値の１倍未満、例えば、≦０．９９倍、≦０．９５倍、≦０．９倍、≦０．８５倍、≦０．８倍、≦０．７５倍、≦０．７倍、≦０．６５倍、≦０．６倍、≦０．５５倍、または≦０．５倍のうちの１つのＩＣ５０（例えば競合ＥＬＩＳＡ、例えば本開示の実施例１１に記載の競合ＥＬＩＳＡによって決定される）で阻害する。

【０１３５】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達（すなわち、ＶＥＧＦＡのＶＥＧＦＲへの結合によって媒介されるシグナル伝達）を阻害する。ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達は、例えば、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達を検出および／または定量するアッセイにおいて、ＶＥＧＦＲ発現細胞を使用して分析され得る。

【０１３６】

ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達を調べるのに適切なアッセイには、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達の結果としてリン酸化／活性化／発現される因子のリン酸化／活性化／発現を検出するためのアッセイが含まれる。このようなアッセイは、ＶＥＧＦＡの存在下で、ＶＥＧＦＲ発現細胞を本開示に記載の抗原結合分子と接触させるステップを含み得る。ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達を調べるためのアッセイは、ＰＩ３Ｋ／ＡＫＴ、ＭＡＰＫ／ＥＲＫおよび／またはＰＬＣ－γ経路を介する、ならびに／あるいはＳＣＲおよび／またはＦＡＫを介するシグナル伝達を分析することを含み得る。

【０１３７】

一部の実施形態では、本開示の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１のヒトＶＥＧＦＲ１への結合によって媒介されるシグナル伝達）を、抗原結合分子の非存在下で（または適切な対照抗原結合分子の存在下で）、そのようなシグナル伝達のレベルの１倍未満、例えば、≦０．９９倍、≦０．９５倍、≦０．９倍、≦０．８５倍、≦０．８倍、≦０．７５倍、≦０．７倍、≦０．６５倍、≦０．６倍、≦０．５５倍、≦０．５倍、≦０．４５倍、≦０．４、≦０．４倍、≦０．３５倍、≦０．３倍、≦０．２５倍、≦０．２倍、≦０．１５倍、≦０．１倍、≦０．０５倍、または≦０．０１倍まで阻害することができる。

【０１３８】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１のヒトＶＥＧＦＲ１への結合によって媒介されるシグナル伝達）を、同じアッセイにおいて、ラニビズマブ（すなわち、配列番号７４および７５のポリペプチドの結合によって形成される分子）について決定された、そのような相互作用の阻害についてのＩＣ$_{50}$と同様のＩＣ$_{50}$で阻害する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１のヒトＶＥＧＦＲ１への結合によって媒介されるシグナル伝達）を、同じアッセイにおいて、ラニビズマブによるそのようなシグナル伝達の阻害についてのＩＣ$_{50}$値の０．５倍以上で２倍以下、例えば、０．５５倍以上で１．９倍以下、０．６倍以上で１．８倍以下、０．６５倍以上で１．７倍以下、０．７倍以上で１．６倍以下、０．７５倍以上で１．５倍以下、０．８倍以上で１．４倍以下、０．８５倍以上で１．３倍以下、０．９倍以上で１．２倍以下、０．９５倍以上で１．１倍以下のうちの１つのＩＣ$_{50}$で阻害する。

【０１３９】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１のヒトＶＥＧＦＲ１への結合によって媒介されるシグナル伝達）を、同じアッセイにおいて、ラニビズマブについて決定された、そのような相互作用の阻害についてのＩＣ$_{50}$よりも低いＩＣ$_{50}$で阻害する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１のヒトＶＥＧＦＲ１への結合によって媒介されるシグナル伝達）を、同じアッセイにおいて、ラニビズマブによるそのようなシグナル伝達の阻害についてのＩＣ$_{50}$値の１倍未満、例えば、≦０．９９倍、≦０．９５倍、≦０．９倍、≦０．８５倍、≦０．８倍、≦０．７５倍、≦０．７倍、≦０．６５倍、≦０．６倍、≦０．５５倍、または≦０．５倍のうちの１つのＩＣ$_{50}$で阻害する。

【０１４０】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性

シグナル伝達（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１のヒトＶＥＧＦＲ１への結合によって媒介されるシグナル伝達）を、同じアッセイにおいて、ベバシズマブ（すなわち、配列番号７６および７７のポリペプチドの結合によって形成される分子）について決定された、そのような相互作用の阻害についてのＩＣ$_{50}$と同様のＩＣ$_{50}$で阻害する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１のヒトＶＥＧＦＲ１への結合によって媒介されるシグナル伝達）を、同じアッセイにおいて、ベバシズマブによるそのようなシグナル伝達の阻害についてのＩＣ$_{50}$値の０．５倍以上で２倍以下、例えば、０．５５倍以上で１．９倍以下、０．６倍以上で１．８倍以下、０．６５倍以上で１．７倍以下、０．７倍以上で１．６倍以下、０．７５倍以上で１．５倍以下、０．８倍以上で１．４倍以下、０．８５倍以上で１．３倍以下、０．９倍以上で１．２倍以下、０．９５倍以上で１．１倍以下のうちの１つのＩＣ$_{50}$で阻害する。

【０１４１】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１のヒトＶＥＧＦＲ１への結合によって媒介されるシグナル伝達）を、同じアッセイにおいて、ベバシズマブについて決定された、そのような相互作用の阻害についてのＩＣ$_{50}$よりも低いＩＣ$_{50}$で阻害する。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達（例えば、ヒトＶＥＧＦ１２１のヒトＶＥＧＦＲ１への結合によって媒介されるシグナル伝達）を、同じアッセイにおいて、ベバシズマブによるそのようなシグナル伝達の阻害についてのＩＣ$_{50}$値の１倍未満、例えば、≦０．９９倍、≦０．９５倍、≦０．９倍、≦０．８５倍、≦０．８倍、≦０．７５倍、≦０．７倍、≦０．６５倍、≦０．６倍、≦０．５５倍、または≦０．５倍のうちの１つのＩＣ$_{50}$で阻害する。

【０１４２】

一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、熱処理の前後に、同様の親和性でＶＥＧＦＡ（例えば、ヒトＶＥＧＦＡ）に結合する。熱処理には、適切なバッファー（例えば、ＰＢＳ中に０．１％ＢＳＡおよび０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むバッファー）中、室温、６０℃、７０℃または８０℃で１時間インキュベートすることを含み得る。熱処理は、本開示の実施例１２に記載のようにして実施することができる。

【０１４３】

一部の実施形態では、抗原結合分子は、熱処理前、および室温で１時間の熱処理後に、ＶＥＧＦＡに対して同様の親和性を示す。一部の実施形態では、抗原結合分子は、熱処理前、および６０℃で１時間の熱処理後に、ＶＥＧＦＡに対して同様の親和性を示す。一部の実施形態では、抗原結合分子は、熱処理前、および７０℃で１時間の熱処理後にＶＥＧＦＡに対して同様の親和性を示す。一部の実施形態では、抗原結合分子は、熱処理前、および８０℃で１時間の熱処理後に、ＶＥＧＦＡに対して同様の親和性を示す。

【０１４４】

本明細書では、参照結合親和性と「同様の」結合親和性とは、同じアッセイで決定された参照結合親和性の５０％以内、例えば、４０％、４５％、３０％、２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、または１％のうちの１つの結合親和性を意味する。

【０１４５】

ＶＥＧＦＡ（例えばヒトＶＥＧＦＡ）への結合のＫ$_{D}$は、熱処理の前後で同様であり得る。本明細書では、参照値と「同様の」Ｋ$_{D}$値は、参照値の０．５倍以上で２倍以下、例えば、０．７倍以上で１．５倍以下、０．７５倍以上で１．２５倍以下、０．８倍以上で１．２倍以下、０．８５倍以上で１．１５倍以下、０．９倍以上で１．１倍以下、０．９１倍以上で１．０９倍以下、０．９２倍以上で１．０８倍以下、０．９３倍以上で１．０７倍以下、０．９４倍以上で１．０６倍以下、０．９５倍以上で１．０５倍以下、０．９６倍以上で１．０４倍以下、０．９７倍以上で１．０３倍以下、０．９８倍以上で１．０

２倍以下、または０．９９倍以上で１．０１倍以下のうちの１つであり得る。
【０１４６】
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞の細胞死滅を増強し得る（すなわち、上方調節し、強化し得る）。
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞の数／割合を低減することが可能である。一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、そのような細胞を枯渇させる／枯渇を強化することが可能である。
【０１４７】
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞の数／割合を、所定のアッセイにおいて、抗原結合分子の非存在下で、または同量の適切な対照抗原結合分子の存在下で観察されるそのような細胞の数／割合の１倍未満まで、例えば、≦０．９９倍、≦０．９５倍、≦０．９倍、≦０．８５倍、≦０．８倍、≦０．７５倍、≦０．７倍、≦０．６５倍、≦０．６倍、≦０．５５倍、≦０．５倍、≦０．４５倍、≦０．４倍、≦０．３５倍、≦０．３倍、≦０．２５倍、≦０．２倍、≦０．１５倍、≦０．１倍、≦０．０５倍、または≦０．０１倍まで低減する。
【０１４８】
本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞の数／割合の低減を増強するための１つまたは複数の部分を含み得る。例えば、本開示に記載の抗原結合分子は、例えば、Ｆｃ領域および／または薬物部分を含み得る。
【０１４９】
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞に対するＡＤＣＣ、ＡＤＣＰ、ＣＤＣのうちの１つもしくは複数を増強／誘導すること、および／またはＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞上のＭＡＣの形成もしくは細胞脱顆粒を増強することができるＦｃ領域を含む。
【０１５０】
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞に対するＡＤＣＣを増強する／誘導することが可能である。
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、薬物部分を含む。抗原結合分子は薬物部分にコンジュゲートしていてもよい。抗体－薬物コンジュゲートは、例えば、Ｐａｒｓｌｏｗら，Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅｓ．２０１６年９月；４（３）：１４頁（上記の参照により本明細書に組み込まれる）に概説されている。一部の実施形態では、薬物部分は、抗原結合分子がＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞に対して細胞傷害性を示すように、細胞傷害剤であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、薬物部分は、化学療法剤であるか、またはそれを含む。
【０１５１】
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、免疫細胞エンゲージング部分を含む。一部の実施形態では、抗原結合分子は、ＣＤ３ポリペプチド結合部分（例えば、ＣＤ３ポリペプチドに結合することが可能な抗原結合ドメイン）を含む。
【０１５２】
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞に対するＴ細胞媒介性細胞溶解活性を増強／誘導することが可能である。
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞の数／割合を、所定のアッセイにおいて、抗原結合分子の非存在下で、または同量の適切な対照抗原結合分子の存在下で観察されるそのような細胞の数／割合の１倍未満まで、例えば、≦０．９９倍、≦０．９５倍、≦０．９倍、≦０．８５倍、≦０．８倍、≦０．７５倍、≦０．７倍、≦０．６５倍、≦０．６倍、≦０．５５倍、≦０．５倍、≦０．４５倍、≦０．４倍、≦０．３５倍、≦０．３倍、≦０．２５倍、≦０．２倍、≦０．１５倍、≦０．１倍、≦０．０５倍、または≦０．０１倍まで低減する。
【０１５３】
一部の実施形態では、本開示に記載の抗原結合分子は、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細

胞の死滅レベルを、所定のアッセイにおいて、抗原結合分子の非存在下で、または同量の適切な対照抗原結合分子の存在下で観察されるそのような細胞の死滅レベルの１倍を超えて、例えば、≧１．５倍、≧２倍、≧３倍、≧４倍、≧５倍、≧６倍、≧７倍、≧８倍、≧９倍、≧１０倍、≧１５倍、≧２０倍、≧３０倍、≧４０倍、または≧５０倍を超えて増加させる。

【０１５４】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）

本開示はまた、本開示の抗原結合ポリペプチドを含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）も提供する。

【０１５５】

ＣＡＲは、抗原結合機能とＴ細胞活性化機能の両方を提供する組換え受容体である。ＣＡＲの構造および操作は、例えば、Ｄｏｔｔｉら，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ（２０１４年）２５７（１）に概説されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ＣＡＲは、細胞膜アンカー領域およびシグナル伝達領域に連結した抗原結合領域を含む。任意のヒンジ領域は、抗原結合領域と細胞膜アンカー領域との間の隔たりを提供することができ、フレキシブルリンカーとして機能し得る。

【０１５６】

本開示のＣＡＲは、本開示の抗原結合分子を含むか、もしくはそれからなるか、または本開示に記載の単一ドメイン抗体配列を含むか、もしくはそれからなる抗原結合領域を含む。すなわち、本開示に記載の抗原結合分子／単一ドメイン抗体配列は、ＣＡＲの抗原結合領域に含まれるか、またはＣＡＲの抗原結合領域を構成する。

【０１５７】

細胞膜アンカー領域は、ＣＡＲの抗原結合領域とシグナル伝達領域の間に提供され、抗原結合領域が細胞外スペースにあり、シグナル伝達領域が細胞内に存在する、ＣＡＲを発現する細胞の細胞膜にＣＡＲを固定するために提供される。一部の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ３－ζ、ＣＤ４、ＣＤ８、またはＣＤ２８のうちの１つの膜貫通領域アミノ酸配列を含むか、それからなるか、またはそれに由来するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる細胞膜アンカー領域を含む。本明細書で使用される場合、参照アミノ酸配列に「由来する」領域は、参照配列と少なくとも６０％、例えば、少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性のうちの１つを有するアミノ酸配列を含む。

【０１５８】

ＣＡＲのシグナル伝達領域は、Ｔ細胞を活性化することができる。ＣＡＲシグナル伝達領域は、ＣＤ３－ζの細胞内ドメインのアミノ酸配列を含んでいてもよく、これはＣＡＲ発現Ｔ細胞のリン酸化および活性化のための免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を提供する。ＦｃγＲＩなどの他のＩＴＡＭ含有タンパク質の配列を含むシグナル伝達領域もまた、ＣＡＲで用いられている（Ｈａｙｎｅｓら，２００１年 Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６６（１）：１８２～１８７頁）。ＣＡＲのシグナル伝達領域は、標的タンパク質に結合する際のＣＡＲ発現Ｔ細胞の活性化を促進するために、共刺激分子のシグナル伝達領域に由来する共刺激配列を含んでもよい。適切な共刺激分子には、ＣＤ２８、ＯＸ４０、４－１ＢＢ、ＩＣＯＳおよびＣＤ２７が含まれる。場合によっては、ＣＡＲは、異なる細胞内シグナル伝達経路の共刺激を提供するように操作される。例えば、ＣＤ２８共刺激に関連するシグナル伝達は、ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）経路を優先的に活性化するが、４－１ＢＢ媒介性シグナル伝達は、ＴＮＦ受容体関連因子（ＴＲＡＦ）アダプタータンパク質を介してである。したがって、ＣＡＲのシグナル伝達領域には、複数の共刺激分子のシグナル伝達領域に由来する共刺激配列が含まれることがある。一部の実施形態では、本開示のＣＡＲは、ＣＤ２８、０Ｘ４０、４－１ＢＢ、ＩＣＯＳおよびＣＤ２７のうちの１つまたは複数の細胞内ドメインのアミノ酸配列を含むか、それらからなるか、またはそれに由来するアミノ酸配列を含むか、またはそれか

らなる１つまたは複数の共刺激配列を含む。任意のヒンジ領域は、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に隔たりを提供することができ、フレキシブルリンカーとして機能し得る。ヒンジ領域は、ＩｇＧ１に由来し得る。一部の実施形態では、本開示のＣＡＲは、ＩｇＧ１のヒンジ領域のアミノ酸配列を含むか、それからなるか、またはそれに由来するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるヒンジ領域を含む。

【０１５９】

また、本開示に記載のＣＡＲを含む細胞も提供される。本開示に記載のＣＡＲは、ＣＡＲ発現免疫細胞、例えば、ＣＡＲ－Ｔ細胞またはＣＡＲ－ＮＫ細胞を生成するために使用することができる。免疫細胞へのＣＡＲの操作は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの培養中に実施され得る。

【０１６０】

本開示のＣＡＲの抗原結合領域は、任意の適切な形式、例えば、ｓｃＦｖ、ｓｃＦａｂなどで提供され得る。

核酸およびベクター

本開示は、本開示に記載の抗原結合分子およびＣＡＲをコードする核酸を提供する。一部の実施形態では、核酸は、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡを含むか、またはそれらからなる。

【０１６１】

本開示はまた、前段落に記載の核酸を含むベクターを提供する。

本開示に記載の核酸およびベクターは、精製された形態または単離された形態で、すなわち、他の核酸または天然の生物学的材料から提供され得る。

【０１６２】

本開示に記載の核酸のヌクレオチド配列は、ベクター、例えば、発現ベクターに含まれ得る。本明細書で使用される場合の「ベクター」は、外因性核酸を細胞に導入するためのビヒクルとして使用される核酸分子である。ベクターは、細胞内で核酸を発現させるためのベクターであり得る。このようなベクターは、発現される配列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含んでいてもよい。ベクターはまた、終止コドンおよび発現エンハンサーも含み得る。当技術分野で公知の任意の適切なベクター、プロモーター、エンハンサーおよび終止コドンを使用して、本開示に記載のベクターからペプチドまたはポリペプチドを発現させることができる。

【０１６３】

「作動可能に連結された」という用語は、選択された核酸配列および調節核酸配列（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）が、核酸配列の発現を調節配列の影響下または制御下に置くような（それにより発現カセットを形成する）方法で共有結合されている状況を含み得る。したがって、調節配列が核酸配列の転写に影響を及ぼす可能性がある場合、調節配列は選択された核酸配列に作動可能に連結される。次いで、得られた転写物は、所望のペプチド（複数可）／ポリペプチド（複数可）に翻訳され得る。

【０１６４】

適切なベクターには、プラスミド、バイナリーベクター、ＤＮＡベクター、ｍＲＮＡベクター、ウイルスベクター（例えば、ガンマレトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）由来ベクター）、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、およびヘルペスウイルスベクター）、トランスポゾンベースのベクター、ならびに人工染色体（例えば酵母人工染色体）が含まれる。

【０１６５】

一部の実施形態では、ベクターは、真核生物ベクター、例えば、真核細胞でのベクターからのタンパク質の発現に必要なエレメントを含むベクターであり得る。一部の実施形態では、ベクターは、例えば、タンパク質発現を駆動するサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）またはＳＶ４０プロモーターを含む、哺乳動物発現ベクターであってもよい。

【０１６６】

抗原結合分子／ＣＡＲを含む／発現する細胞

本開示はまた、本開示に記載の抗原結合分子およびＣＡＲを含むか、または発現する細胞を提供する。また、本開示に記載の核酸またはベクターを含むか、または発現する細胞も提供される。

【０１６７】

細胞は、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞であってもよい。哺乳動物は、霊長類（アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長類もしくはヒト）または非ヒト哺乳動物（例えば、ウサギ、モルモット、ラット、マウスもしくは他の齧歯類（齧歯目の任意の動物を含む）、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ（例えば、乳牛などのウシ、もしくはＢｏｓ目の任意の動物を含む）、ウマ（Ｅｑｕｉｄａｅ科の任意の動物を含む）、ロバ、および非ヒト霊長類）であり得る。

【０１６８】

一部の実施形態では、細胞は、ヒトにおける治療において使用するためのポリペプチドの発現に一般的に使用される細胞型であるか、またはそれに由来する。例示的な細胞は、例えば、ＫｕｎｅｒｔおよびＲｅｉｎｈａｒｔ，　Ａｐｐｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　（２０１６年）　１００：３４５１～３４６１頁（これによりその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されており、例えば、ＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＰＥＲ．Ｃ６細胞、ＮＳ０細胞、およびＢＨＫ細胞が含まれる。

【０１６９】

本開示はまた、本開示に記載の核酸またはベクターを含む細胞を生産する方法であって、本開示に記載の核酸またはベクターを細胞に導入するステップを含む、方法も提供する。一部の実施形態では、本開示に記載の単離された核酸（複数可）またはベクター（複数可）を細胞に導入するステップは、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーションまたは形質導入（例えば、レトロウイルス形質導入）を含む。

【０１７０】

本開示はまた、本開示に記載の抗原結合分子／ＣＡＲを発現する／含む細胞を生産する方法であって、本開示に記載の核酸またはベクターを細胞に導入するステップを含む、方法も提供する。一部の実施形態では、この方法は、細胞による核酸／ベクターの発現に適した条件下で、細胞を培養するステップをさらに含む。一部の実施形態では、この方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施される。

【０１７１】

本開示はまた、本開示に記載の方法によって得られるか、または得ることができる細胞も提供する。

抗原結合分子およびポリペプチドの生産

本開示に記載の抗原結合分子およびポリペプチドは、当業者に公知であるポリペプチドの生産方法により調製することができる。

【０１７２】

ポリペプチドは、化学合成、例えば、液相合成または固相合成によって調製することができる。例えば、ペプチド／ポリペプチドは、例えば、Ｃｈａｎｄｒｕｄｕら，　Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ　（２０１３年），　１８：４３７３～４３８８頁に記載の方法を使用して合成することができ、この文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１７３】

あるいは、抗原結合分子およびポリペプチドは、組換え発現によって生産され得る。ポリペプチドの組換え生産に適した分子生物学の技術は、当技術分野では周知であり、例えば、ＧｒｅｅｎおよびＳａｍｂｒｏｏｋ，　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ　（第４版），　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ，　２０１２年、ならびにＮａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．　（２００８年）；５（２）：１３５～１４６頁に記載されており、これらは両方とも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。抗原結合分子の組換え生産方法はまた、Ｆｒｅｎｚｅｌら，　Ｆｒｏｎｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　（２０１３年）；４：２１７頁、およびＫｕｎｅ

ｒｔおよびＲｅｉｎｈａｒｔ，　Ａｐｐｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　（２０１６年）　１００：３４５１～３４６１頁に記載されており、これらは両方とも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１７４】

本開示に記載の組換え生産については、ポリペプチドの発現に適した任意の細胞が使用され得る。細胞は、原核生物であってもよく、または真核生物であってもよい。一部の実施形態では、細胞は、古細菌または細菌の細胞などの原核細胞である。一部の実施形態では、細菌は、腸内細菌科の細菌、例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）などのグラム陰性細菌であり得る。一部の実施形態では、細胞は、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞、例えば、本明細書の上記に記載されている細胞などの真核細胞である。

【０１７５】

場合によっては、一部の原核細胞が真核細胞と同じフォールディングまたは翻訳後修飾ができないことから、細胞が原核細胞ではないことがある。さらに、真核生物では非常に高い発現レベルが可能であり、タンパク質は、適切なタグを使用することにより真核生物からの容易に精製することができる。タンパク質の培地への分泌を促進する特定のプラスミドもまた利用することができる。

【０１７６】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、例えば、Ｚｅｍｅｌｌａら　Ｃｈｅｍｂｉｏｃｈｅｍ　（２０１５年）　１６（１７）：２４２０～２４３１頁に記載のシステムによる、無細胞タンパク質合成（ＣＦＰＳ）によって調製することができ、その文献は、これによってその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１７７】

生産には、目的のポリペプチド（複数可）を発現するように改変された真核細胞の培養または発酵が含まれ得る。培養または発酵は、栄養素、空気／酸素および／または増殖因子の適切な供給が提供されるバイオリアクター内で実施することができる。分泌タンパク質は、培地／発酵ブロスを細胞から分画し、タンパク質内容物を抽出し、個々のタンパク質を分離して分泌ポリペプチド（複数可）を単離することによって回収することができる。培養、発酵および分離の技術は、当業者に周知であり、例えば、ＧｒｅｅｎおよびＳａｍｂｒｏｏｋ，　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（第４版、上記本明細書の参照により組み込まれる）に記載されている。

【０１７８】

バイオリアクターには、細胞を培養することができる１つまたは複数の容器が含まれる。バイオリアクターでの培養は、リアクターへの反応物の連続的な流入と、リアクターからの培養細胞の連続的な流出により、連続的に行われ得る。あるいは、培養はバッチで行うことができる。バイオリアクターは、培養される細胞にとって最適な条件が提供されるように、ｐＨ、酸素、容器への流入および流出の流量、ならびに容器内の撹拌などの環境条件をモニターし、制御する。

【０１７９】

抗原結合分子を発現する細胞を培養した後、抗原結合分子を（例えば、細胞培養上清から）単離または精製することができる。培養の細胞からの発現によって生産される目的のポリペプチドを単離／精製するための任意の適切な方法を使用することができる。

【０１８０】

ポリペプチドを単離するためには、細胞を栄養培地から分離する必要がある場合がある。ポリペプチドが細胞から分泌される場合、細胞は、目的の分泌ポリペプチドを含む培地から遠心分離によって分離することができる。目的のポリペプチドが細胞内に集まる場合、タンパク質の単離は、細胞を細胞培養培地から分離するための遠心分離、溶解バッファーによる細胞ペレットの処理、および、例えば超音波処理、急速凍結融解、または浸透圧溶解による細胞破壊を含んでいてもよい。

【０１８１】

次いで、他のタンパク質成分および非タンパク質成分を含有し得る上清または培養培地から目的のポリペプチドを単離することが望まれ得る。上清または培養培地からタンパク質成分を分離する一般的なアプローチは、沈殿によるものである。異なる溶解度のタンパク質は、硫酸アンモニウムなどの沈殿剤の異なる濃度で沈殿する。例えば、沈殿剤の濃度が低濃度の場合、水溶性タンパク質が抽出される。したがって、異なる漸増濃度の沈殿剤を添加することによって、異なる溶解度のタンパク質が区別され得る。続いて、透析を使用して、分離されたタンパク質から硫酸アンモニウムを除去することができる。

【０１８２】

異なるタンパク質を区別する他の方法は、当技術分野において公知であり、例えば、イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズクロマトグラフィーがある。これらは、沈殿の代替として使用することが可能であるか、または沈殿に続いて実施され得る。

【０１８３】

目的のポリペプチドが培養物から単離された場合、ポリペプチドを濃縮することが望まれ得るか、または必要となり得る。タンパク質を濃縮するための多くの方法が当技術分野において公知であり、例えば、限外濾過または凍結乾燥などがある。

【０１８４】

組成物

本開示はまた、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクターおよび細胞を含む組成物も提供する。

【０１８５】

本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクターおよび細胞は、臨床使用のための医薬組成物または医薬品として製剤化することができ、薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤またはアジュバントを含み得る。

【０１８６】

本開示の組成物は、１つまたは複数の薬学的に許容される担体（例えば、リポソーム、ミセル、ミクロスフェア、ナノ粒子）、希釈剤／賦形剤（例えば、デンプン、セルロース、セルロース誘導体、ポリオール、デキストロース、マルトデキストリン、ステアリン酸マグネシウム）、アジュバント、充填剤、緩衝剤、保存剤（例えば、ビタミンＡ、ビタミンＥ、ビタミンＣ、パルミチン酸レチニル、セレン、システイン、メチオニン、クエン酸、クエン酸ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン）、抗酸化剤（例えば、ビタミンＡ、ビタミンＥ、ビタミンＣ、パルミチン酸レチニル、セレニウム）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、ステアリン酸、植物性ステアリン）、結合剤（例えば、スクロース、ラクトース、デンプン、セルロース、ゼラチン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、キシリトール、ソルビトール、マンニトール）、安定化剤、可溶化剤、界面活性剤（例えば、湿潤剤）、マスキング剤、または着色剤（例えば、酸化チタン）を含み得る。

【０１８７】

本明細書で使用される場合の「薬学的に許容される」という用語は、健全な医学的判断の範囲内において、当該対象（例えばヒト対象）の組織と接触して使用するのに適切であって、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、妥当な利益／リスク比に見合った化合物、成分、材料、組成物、剤形などに関する。本開示に記載の組成物のそれぞれの担体、希釈剤、賦形剤、アジュバント、充填剤、緩衝剤、保存剤、抗酸化剤、滑沢剤、結合剤、安定化剤、可溶化剤、界面活性剤、マスキング剤、着色剤、香料または甘味剤もまた、製剤の他の成分と適合性があるという意味において「許容される」ものでなければならない。適切な担体、希釈剤、賦形剤、アジュバント、充填剤、緩衝剤、保存剤、抗酸化剤、滑沢剤、結合剤、安定化剤、可溶化剤、界面活性剤、マスキング剤、着色剤、香料または甘味剤は、標準的な医薬テキスト、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ ’Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ’ （Ａ． Ａｄｅｊａｒｅ編），第２３版（２０２０年），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓで確認することができる。

【０１８８】
組成物は、局所投与、非経口投与、全身投与、腔内投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、髄腔内投与、眼内投与、結膜内投与、腫瘍内投与、皮下投与、皮内投与、髄腔内投与、経口投与または経皮投与の経路で製剤化することができる。一部の実施形態では、医薬組成物／医薬は、注射もしくは注入による投与、または経口摂取による投与用に製剤化され得る。
【０１８９】
適切な製剤は、抗原結合分子を滅菌培地または等張培地中に含み得る。医薬および医薬組成物は、ゲルを含む、流体の形態で製剤化することができる。流体製剤は、ヒトまたは動物の身体の選択された領域への注射または注入（例えば、カテーテルを介する）による投与用に製剤化され得る。
【０１９０】
一部の実施形態では、組成物は、例えば、目的の血管または組織／器官への注射または注入用に製剤化される。
本開示は、薬学的に有用な組成物の生産方法であって、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクターもしくは細胞を生産するステップ；本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクターもしくは細胞を単離するステップ；および／または本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクターもしくは細胞を薬学的に許容される担体、アジュバント、賦形剤もしくは希釈剤と混合するステップから選択される１つまたは複数のステップを含み得る、方法も提供する。
【０１９１】
例えば、本開示のさらなる態様は、疾患／状態（例えば、本明細書に記載の疾患／状態）の治療において使用するための医薬または医薬組成物を製剤化または生産する方法であって、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクターまたは細胞を、薬学的に許容される担体、アジュバント、賦形剤または希釈剤とともに混合することによって医薬組成物または医薬を製剤化するステップを含む、方法に関する。
【０１９２】
治療的および予防的用途
本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞および組成物は、治療方法および予防方法における使用が見出される。
【０１９３】
本開示は、医学的治療または予防の方法において使用するための、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物を提供する。また、疾患または状態を治療または予防するための医薬の製造における、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物の使用も提供される。また、疾患または状態を治療または予防する方法であって、本明細書に記載の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物の治療的または予防的有効量を対象に投与するステップを含む、方法も提供される。
【０１９４】
本開示による治療的または予防的介入は、疾患／状態の発症もしくは進行の軽減、疾患／状態の症状の緩和、または疾患／状態の病態の軽減に有効であり得る。介入は、疾患／状態の進行を予防する、例えば、疾患／状態の悪化を予防する、または疾患／状態の発症速度を遅らせるのに有効であり得る。一部の実施形態では、この方法は、疾患／状態の改善、例えば、疾患／状態の症状の軽減、または疾患／状態の重篤度／活動性の他の相関関係の軽減につながり得る。一部の実施形態では、この方法は、後期段階（例えば、より重篤な段階、または慢性的な段階）での疾患／状態の発症を予防することができる。
【０１９５】
本明細書で使用される場合の、例えば障害の「発症する」、「発症している」、および「発症」という用語は、疾患の発症、ならびに疾患状態／その相関関係の進行、増悪または悪化の両方を指す。

【０１９６】
本開示の物品は、ＶＥＧＦＡレベル、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達の低下、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞の数の減少、および／またはＶＥＧＦＲを発現する細胞の活性の低下から治療的または予防的利益をもたらし得る任意の疾患／状態の治療／予防に使用できることは理解されよう。疾患／状態は、例えば、ＶＥＧＦＡ、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達および／またはＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲを含む／発現する細胞が病理学的に関与する疾患／状態であってもよく、例えば、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達レベルの上昇および／またはＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲを含む／発現する細胞数の増加は、疾患／状態の発症、発生または進行、ならびに／あるいは疾患／状態の１つもまたは複数の症状の重症度と正の相関がある疾患／状態、あるいはＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達レベルの上昇および／またはＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲを含む／発現する細胞数の増加は、疾患／状態の発症、発生もしくは進行の危険因子である疾患／状態であり得る。

【０１９７】
本明細書に開示の態様および実施形態による治療および予防は、主に、ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達を特徴とする疾患／症状に関する。
一部の実施形態では、本開示によって治療／予防される疾患／状態は、例えば、疾患／状態が存在しない場合のＶＥＧＦＡの発現レベルと比較して、ＶＥＧＦＡの発現レベルの増加を特徴とする疾患／状態である。一部の実施形態では、本開示によって治療／予防される疾患／状態は、例えば、疾患／状態が存在しない場合のＶＥＧＦＲを発現する細胞の数／割合／活性と比較して、ＶＥＧＦＲを発現する細胞の数／割合／活性の増加を特徴とする疾患／状態である。

【０１９８】
ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達および疾患におけるその役割は、例えば、Ｋａｒａｍａｎ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ （２０１８年） １４５（１４）：ｄｅｖ１５１０１９、 ＦｅｒｒａｒａおよびＡｄａｍｉｓ， Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ． （２０１６年） １５（６）：３８５～４０３頁、ならびにＣｌａｅｓｓｏｎ－ＷｅｌｓｈおよびＷｅｌｓｈ， Ｊ Ｉｎｔｅｒｎ Ｍｅｄ． （２０１３年） ２７３（２）：１１４～２７頁に概説されており、これらのすべては、これによりその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１９９】
ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達は、いくつかの疾患の病因に関与している。ＶＥＧＦＡは、糖尿病性網膜症および滲出性加齢黄斑変性症などの眼科疾患に罹患した個体における血管新生、血液網膜関門の破壊、炎症および視力喪失を促す。

【０２００】
ＶＥＧＦおよびＶＥＧＦ受容体は、一部の腫瘍細胞を含む、非内皮細胞においても発現される。腫瘍細胞によって分泌されるＶＥＧＦＡは、内皮細胞の増殖および生存を刺激し、新しい血管の形成をもたらし、腫瘍の増殖を促進する。ＶＥＧＦＡに対する中和抗体の開発および使用により、腫瘍の増殖が血管新生に依存するという最初の直接的証拠が得られ、この過程におけるＶＥＧＦＡの重要性が確認された。

【０２０１】
一部の実施形態では、本発明によって治療される疾患／状態は、病理学的（すなわち過剰な）血管新生を特徴とする疾患、がん、ＶＥＧＦＡ発現がん（すなわち、ＶＥＧＦＡを発現する細胞を含むがん；例えば、同等の非がん性細胞による発現レベルと比較して、ＶＥＧＦＡの発現レベルが上昇した細胞を含むがん）、ＶＥＧＦＲ発現がん（すなわち、ＶＥＧＦＲを発現する細胞を含むがん；例えば、同等の非がん性細胞による発現レベルと比較して、ＶＥＧＦＲの発現レベルが上昇した細胞を含むがん）、眼疾患、網膜症、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、加齢黄斑変性症、滲出性（すなわち血管新生）加齢黄斑変性症、網膜静脈閉塞症、近視性脈絡膜血管新生、未熟児網膜症、血管新生緑内障、中心性漿液性網膜症、眼腫瘍、角膜血管新生、炎症性疾患、自己免疫疾患、関節炎、関節リウマチ、変

形性関節症、乾癬、多発性硬化症、敗血症、運動ニューロン疾患、および筋萎縮性側索硬化症から選択される。

【０２０２】

前段落で挙げた特定の疾患は、相互に関連していることは理解されよう。例えば、病理学的血管新生を特徴とする疾患は、がんおよび眼疾患を含む。本明細書で使用される場合、「病理学的血管新生」は、疾患の発症および／または進行に寄与する血管新生（すなわち、既存の血管叢からの新しい血管の成長）を指す。

【０２０３】

一部の実施形態では、本開示によって治療／予防される疾患／状態は、がんである。がんは、任意の望ましくない細胞増殖（または望ましくない細胞増殖によって現れる任意の疾患）、新生物または腫瘍であり得る。がんは良性または悪性である可能性があり、原発性または二次性（転移性）であり得る。新生物または腫瘍は、細胞の異常な成長または増殖であり、あらゆる組織に存在し得る。がんは、例えば、副腎、副腎髄質、肛門、虫垂、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、盲腸、中枢神経系（脳を含むか、または脳を含まない）、小脳、子宮頸部、結腸、十二指腸、子宮内膜、上皮細胞（例えば腎上皮）、胆嚢、食道、グリア細胞、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺、喉頭、肝臓、肺、リンパ、リンパ節、リンパ芽球、上顎骨、縦隔、腸間膜、子宮筋層、鼻咽頭、大網、口腔、卵巣、膵臓、耳下腺、末梢神経系、腹膜、胸膜、前立腺、唾液腺、Ｓ状結腸、皮膚、小腸、軟部組織、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、舌、扁桃腺、気管、子宮、外陰部、白血球に由来する組織／細胞のものであり得る。

【０２０４】

治療される腫瘍は、神経系腫瘍または非神経系腫瘍であり得る。神経系腫瘍は、中枢神経系または末梢神経系のいずれかで発生することがあり、例えば、神経膠腫、髄芽腫、髄膜腫、神経線維腫、上衣腫、神経鞘腫、神経線維肉腫、星状細胞腫、および乏突起膠腫がある。非神経系のがん／腫瘍は、他の非神経組織に由来する可能性があり、例には、黒色腫、中皮腫、リンパ腫、骨髄腫、白血病、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、ホジキンリンパ腫、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、皮膚Ｔ細胞リンパ腫（ＣＴＣＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、肝細胞腫、類表皮癌、前立腺癌、乳がん、肺がん、結腸がん、卵巣がん、膵臓がん、胸腺癌、ＮＳＣＬＣ、血液がん、および肉腫が含まれる。

【０２０５】

治療／予防は、がんの症状の発症／進行を遅らせる／予防すること、がんの症状の重篤度を軽減すること、がん細胞の生存／成長／浸潤／転移を減少させること、がん細胞の数を減少させること、および／または対象の生存を延ばすことのうちの１つまたは複数が目的とされ得る。

【０２０６】

一部の実施形態では、治療／予防されるがんは、ＶＥＧＦＡを発現する細胞を含む。一部の実施形態では、治療／予防されるがんは、ＶＥＧＦＲを発現する細胞を含む。一部の実施形態では、治療／予防されるがんは、ＶＥＧＦＡ陽性のがんである。一部の実施形態では、治療／予防されるがんは、ＶＥＧＦＲ陽性のがんである。一部の実施形態では、がんは、ＶＥＧＦＡを過剰発現する。一部の実施形態では、がんは、ＶＥＧＦＲを過剰発現する。ＶＥＧＦＡおよび／またはＶＥＧＦＲの過剰発現は、同等の非がん性細胞／非腫瘍組織による発現レベルよりも高い関連因子の発現レベルを検出することによって決定することができる。

【０２０７】

ＶＥＧＦＡおよび／またはＶＥＧＦＲ発現は、任意の適切な手段によって決定することができる。発現は、遺伝子発現またはタンパク質発現であり得る。遺伝子発現は、例えば、定量的リアルタイムＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）による、例えば、ＶＥＧＦＡおよび／またはＶＥＧＦＲをコードするｍＲＮＡの検出によって決定することができる。タンパク質発現は、例えば、抗体ベースの方法によって、例えば、ウェスタンブロット、免疫組織化

学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、またはＥＬＩＳＡによって、ＶＥＧＦＡおよび／またはＶＥＧＦＲを検出することによって決定することができる。

【０２０８】

一部の実施形態では、患者は、例えば、対象者から採取した試料中のＶＥＧＦＡおよび／またはＶＥＧＦＲを発現するがん、あるいはＶＥＧＦＡおよび／またはＶＥＧＦＲを過剰発現するがんの検出に基づいて、本明細書に記載の治療のために選択され得る。

【０２０９】

ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲアンタゴニストは、例えば、Ｋｉｅｒａｎら，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ Ｐｅｒｓｐｅｃｔ Ｍｅｄ．２０１２年１２月；２（１２）：ａ００６５９３（これによりその全体が参照により本明細書に組み込まれる；例えば表２を参照）に記載されているように、多種多様のがんを治療／予防するための薬剤として研究されている。一部の実施形態では、本開示によって治療／予防されるがんは、固形腫瘍、血液悪性腫瘍、骨髄性血液悪性腫瘍、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、乳がん、腎がん、腎細胞がん、肺がん、非小細胞肺がん、甲状腺がん、甲状腺髄様がん、脳／脊髄がん、神経膠芽腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、頭頸部がん、皮膚がん、黒色腫、扁平上皮がん、肝臓がん、肝細胞癌、膵臓がん、胃がん、腸がん、結腸がん、直腸がん、結腸直腸がん、胆管がん、胆管細胞癌（ｃｈｏｌａｎｇｉｏｃａｒｃｉｎｏｍａ）、骨がん、肉腫、卵巣がん、子宮頸がん、腹膜がん、前立腺がん、尿路上皮がん、神経内分泌がんから選択される。一部の実施形態では、治療／予防されるがんは、原発性がんである。一部の実施形態では、治療／予防されるがんは、二次がん（すなわち、転移）である。

【０２１０】

ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ標的介入もまた、例えば、Ｃｏｒｎｅｌら，Ｒｏｍ Ｊ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．（２０１５年）５９（４）：２３５～２４２頁に記載されているように、眼疾患を治療／予防するために研究されており、この文献はこれによりその全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本開示によって治療／予防される疾患／状態は、眼疾患、網膜症、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、加齢黄斑変性症、滲出性（すなわち血管新生）加齢黄斑変性症、網膜静脈閉塞症、近視性脈絡膜血管新生、未熟児網膜症、血管新生緑内障、中心性漿液性網膜症、眼腫瘍および角膜血管新生から選択される。

【０２１１】

ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達は、例えば、ＬｅおよびＫｗｏｎ，Ｉｎｔ Ｊ Ｍｏｌ Ｓｃｉ．（２０２１年）２２（１０）：５３８７頁、Ｍａｒｉｎａら，Ｃｌｕｊｕｌ Ｍｅｄ．（２０１５年）８８（３）：２４７～２５２頁、Ｆｅｒｒａｒａ，Ｅｎｄｏｃｒ Ｒｅｖ．（２００４年）２５（４）：５８１～６１１頁、ならびにＡｚｉｍｉら，Ｎｅｕｒｏｌ Ｓｃｉ．（２０２０年）４１（６）：１４５９～１４６５頁に記載されているように、炎症性および自己免疫状態の病態にも関与しており、これらの文献のすべては、これによりその全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本開示によって治療／予防される疾患／状態は、炎症性疾患、自己免疫疾患、関節炎、関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、多発性硬化症、および敗血症から選択される。

【０２１２】

ＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達はまた、例えば、Ｌａｍｂｒｅｃｈｔｓら，Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．（２００３年）３４（４）：３８３～９４頁に記載されているように、筋萎縮性側索硬化症などの運動ニューロン疾患の病態にも関与している。一部の実施形態では、本開示によって治療／予防される疾患／状態は、運動ニューロン疾患または筋萎縮性側索硬化症である。

【０２１３】

本開示の様々な態様によれば、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ（すなわち、ＶＥＧＦＡの受容体、例えばＶＥＧＦＲ１）との間の相互作用を阻害すること、および／またはＶＥＧＦＡ／ＶＥＧＦＲ媒介性シグナル伝達を阻害することを目的とする、あるいはそれを（例えば

、本明細書に記載の治療的／予防的介入の文脈において）含む方法が提供される。

【０２１４】

また、そのような方法において使用するための本開示による薬剤、およびそのような方法において使用するための組成物（例えば医薬）の製造における本開示による薬剤の使用も提供される。一部の実施形態では、本開示による治療的／予防的介入は、前段落に記載の効果の１つまたは複数に「関連している」と説明することができる。当業者は、当技術分野において日常的に実施されている技術を使用して、そのような特性を容易に評価することができる。

【０２１５】

本開示の物品の投与は、好ましくは、「治療有効」量または「予防有効」量であり、これは対象に治療上の利益または予防上の利益を示すのに十分である。実際の投与量、投与速度および投与期間は、疾患／状態の性質および重篤度、ならびに投与される特定の物品に依存する。治療の処方、例えば、投与量などの決定は、一般開業医および他の医師の責任の範囲内であり、典型的には、治療しようとする疾患／障害、個々の対象の状態、送達の部位、投与方法、および開業医が知っている他の要因を考慮する。上記の技術およびプロトコルの例は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ’Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ’（Ａ．　Ａｄｅｊａｒｅ編），第２３版（２０２０年），Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓで確認することができる。

【０２１６】

投与は、単独でもよく、または治療する状態に応じて同時にもしくは連続的に、他の治療法と組み合わせることができる。本明細書に記載の抗原結合分子または組成物および治療薬は、同時にまたは連続的に投与することができる。

【０２１７】

同時投与とは、本開示の抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物と他の治療薬とを、例えば、両薬剤を含む医薬組成物として（すなわち、併用製剤の場合）一緒に、または互いの直後に、任意選択で、同じ投与経路を介して、例えば、同じ動脈、静脈、もしくは他の血管に投与することを指す。連続投与とは、一方の薬剤を投与し、所定の時間間隔の後に続いて、もう一方の薬剤を別々に投与することを指す。一部の実施形態ではそうであるが、２つの薬剤が同じ経路によって投与されることは必要とされない。時間間隔は、任意の時間間隔であってもよい。

【０２１８】

抗原結合分子、ＣＡＲ、核酸、発現ベクター、細胞または組成物の複数回投与を提供することができる。１回もしくは複数回、またはそれぞれの投与量は、別の治療薬の同時投与または連続投与を伴っていてもよい。複数回の投与は、所定の時間間隔によって区切ることが可能であり、それは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、もしくは３１日、または１、２、３、４、５、もしくは６か月のうちの１つであるように選択することができる。例として、投与は、７、１４、２１または２８日（プラスマイナス３、２または１日）ごとに１回行われ得る。

【０２１９】

検出方法

本開示はまた、ＶＥＧＦＡを検出するための方法、またはＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞を検出するための方法において使用するための本開示の物品も提供する。

【０２２０】

本明細書に記載の抗原結合分子は、抗原結合分子のＶＥＧＦＡへの結合を検出するステップを含む方法において使用することができる。このような方法は、抗原結合分子とＶＥＧＦＡとの結合複合体の検出を含み得る。

【０２２１】

このような場合、ＶＥＧＦＡを含むか、または含むと疑われる試料を接触させるステップと、抗原結合分子とＶＥＧＦＡとの複合体の形成を検出するステップとを含む方法が提

供される。また、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞を含むか、または含むと疑われる試料を接触させるステップと、抗原結合分子とＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞との複合体の形成を検出するステップとを含む方法も提供される。

【０２２２】

適切な方法の形式は当技術分野において周知であり、サンドイッチアッセイ、例えばＥＬＩＳＡなどのイムノアッセイを含む。この方法は、抗原結合分子、標的（複数可）、またはその両方を、検出可能な部分、例えば、本明細書に記載の蛍光標識、リン光標識、発光標識、免疫検出標識、放射性標識、化学標識、核酸標識、または酵素標識で標識することを含み得る。検出技術は当業者に周知であり、標識剤に対応するように選択することができる。

【０２２３】

ＶＥＧＦＡ、またはＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞を検出するステップを含む方法には、ＶＥＧＦＡ発現／活性が病態的に関与する疾患／状態を診断／予後判定するための方法が含まれる。

【０２２４】

この種の方法は、患者試料に対してｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施され得るか、または患者試料の処理後に実施することができる。試料がいったん採取されると、患者はｉｎ　ｖｉｔｒｏ法を実施するために立ち会う必要はなく、そのため、この方法はヒトまたは動物の身体では実施されないものであり得る。一部の実施形態では、この方法はｉｎ　ｖｉｖｏで実施される。

【０２２５】

このような方法は、例えば患者試料中の、ＶＥＧＦＡ、ＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞のうちの１つまたは複数を検出または定量するステップを含み得る。この方法が関連因子を定量化することを含む場合、この方法は、診断または予後判定の一部として、決定された量を標準値または参照値と比較するステップをさらに含み得る。他の診断検査／予後判定検査を本明細書に記載の検査と組み合わせて使用し、診断または予後判定の精度を高めるか、または本明細書に記載の検査を使用することによって得られる結果を確認することができる。

【０２２６】

試料中の検出は、疾患／状態（例えば、がん）、疾患／状態に対する素因を診断する目的で、または疾患／状態、例えば本明細書に記載の疾患／状態の予後診断（予後予測）を提供するために使用することができる。診断または予後判定は、既存の（以前に診断された）疾患／状態に関連している可能性がある。

【０２２７】

試料は、任意の組織または体液から採取することができる。試料は、以下のものを含むか、またはそれに由来し得る：血液の量；フィブリン塊および血球を除去した後に得られる血液の液体部分を含み得る、個体の血液に由来する血清の量；組織試料または生検；胸水；脳脊髄液（ＣＳＦ）；または前記個体から単離された細胞、一部の実施形態では、試料は、疾患／状態に罹患している１つまたは複数の組織（例えば、疾患の症状が現れる１つもしくは複数の組織、または疾患／状態の病因に関与する１つもしくは複数の組織）から取得または由来し得る。

【０２２８】

本開示はまた、ＶＥＧＦＡ標的薬による治療のために対象を選択／階層化するための方法を提供する。一部の実施形態では、対象は、例えば個体から得られた試料中の、ＶＥＧＦＡの、またはＶＥＧＦＡを含む／発現する細胞の検出／定量を基準にして、本開示による治療／予防のために選択されるか、またはそのような治療／予防から利益を得る対象として同定される。

【０２２９】

対象

本開示に記載の対象は、任意の動物であり得る。一部の実施形態では、対象は哺乳動物

であり得る。一部の実施形態では、対象はヒトであり得る。一部の実施形態では、対象は非ヒト動物、例えば、非ヒト哺乳動物であり得る。対象者は、男性であっても、女性であってもよい。

【０２３０】

対象は、患者であり得る。患者は、本明細書に記載の疾患／状態を有し得る。対象は、本明細書に記載の疾患／状態と診断されている可能性があるか、本明細書に記載の疾患／状態を有することが疑われている可能性があるか、または本明細書に記載の疾患／状態を発症するリスクがあり得る。

【０２３１】

対象／患者は、本明細書に記載の疾患／状態のマーカーの特徴付けに基づいて、本開示による治療／予防のために選択され得る。

本開示による一部の実施形態では、対象は、好ましくはヒト対象である。一部の実施形態では、本開示の治療または予防方法によって治療される対象は、本明細書に記載の疾患を有するか、または疾患を発症するリスクのある対象である。

【０２３２】

キット

本開示の一部の態様では、パーツのキットが提供される。一部の実施形態では、キットは、所定量の本明細書に記載の抗原結合分子、核酸、発現ベクター、細胞、または組成物を有する少なくとも１つの容器を有し得る。

【０２３３】

一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載の抗原結合分子、核酸、発現ベクター、細胞、または組成物を生産するための材料を含み得る。

キットは、特定の疾患／状態を治療するために、抗原結合分子、核酸、発現ベクター、細胞または組成物を、患者に投与するための説明書とともに提供することができる。

【０２３４】

本開示に記載のキットは、例えば、説明書またはリーフレットの形態の使用説明書を含んでいてもよい。使用説明書は、本明細書に記載の方法のうちの任意の１つまたは複数を実施するためのプロトコルを含み得る。

【０２３５】

配列同一性

本明細書で使用される場合、「配列同一性」とは、配列を整列させ、必要な場合にはギャップを導入して、配列間の最大配列同一性パーセントを達成した後、参照配列中のヌクレオチド／アミノ酸残基と同一である対象配列中のヌクレオチド／アミノ酸残基のパーセントを指す。２つ以上のアミノ酸配列または核酸配列間の配列同一性パーセントを決定する目的のためのペアワイズおよび多重配列アラインメントは、例えば、ＣｌｕｓｔａｌＯｍｅｇａ（Ｓｏｄｉｎｇ，Ｊ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ（２００５年）２１，９５１～９６０頁）、Ｔ－ｃｏｆｆｅｅ（Ｎｏｔｒｅｄａｍｅら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（２０００年）３０２，２０５～２１７頁）、Ｋａｌｉｇｎ（ＬａｓｓｍａｎｎおよびＳｏｎｎｈａｍｍｅｒ，ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ（２００５年）６，２９８頁）、ならびにＭＡＦＦＴ（ＫａｔｏｈおよびＳｔａｎｄｌｅｙ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ（２０１３年）３０（４）７７２～７８０頁）ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用し、当業者に公知の様々な方法で達成することができる。このようなソフトウェアを使用する場合、例えば、ギャップペナルティおよびエクステンションペナルティには、デフォルトのパラメータが好ましくは使用される。

【０２３６】

配列

【０２３７】

【表２－１】

配列番号:	説明	配列
1	13A6	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFSLAATDIDWVRQAPGKGLEWVARIFPSAGSTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSYSYNVFLHNPTYTALDYRGQGT LVTVSS
2	13A6, 16A6.1 CDR1	SLAATD
3	13A6 CDR2	FPSAGSTD
4	13A6 CDR3	GRSDSYSYNVFLHNPTYTALD
5	16A2.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFALAETDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSSGGNTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSIAYNVILPNSTYTARDYRGQGTL VTVSS
6	16A2.1 CDR1	ALAETD
7	16A2.1 CDR2	FSSGGNTD
8	16A2.1 CDR3	GRSDSIAYNVILPNSTYTARD
9	16A6.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFSLAATDIDWVRQAPGKGLEWVARIFPFSGSTDYT DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSYSYNVFLHDPAYTALDYRGQGT LVTVSS
10	16A6.1 CDR2	FPFSGSTD
11	16A6.1 CDR3	GRSDSYSYNVFLHDPAYTALD
12	20A2.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFPLADTDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSSYGSTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSIAYNIILPASTYSSRDYRGQGTLV TVSS
13	20A2.1 CDR1	PLADTD
14	20A2.1 CDR2	FSSYGSTD
15	20A2.1 CDR3	GRSDSIAYNIILPASTYSSRD
16	20A3.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFSLADTDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSSSGSTYYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCDRADSVGYNVIFPGSTYSRSGYRGQGT LVTVSS
17	20A3.1 CDR1	SLADTD
18	20A3.1 CDR2	FSSSGSTY
19	20A3.1 CDR3	DRADSVGYNVIFPGSTYSRSG
20	21A1.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFALATTDIDWVRQAPGKGLEWVARIFNPSDFTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRPAVYGYNIFLDSPTYDASQYRGQGT LVTVSS
21	21A1.1 CDR1	ALATTD
22	21A1.1 CDR2	FNPSDFTD
23	21A1.1 CDR3	GRPAVYGYNIFLDSPTYDASQ
24	21A8.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFSVDATDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSPSGFTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCDRPEFYAYNIFHDPRTVPAGNYRGQGT LVTVSS
25	21A8.1 CDR1	SVDATD
26	21A8.1 CDR2	FSPSGFTD
27	21A8.1 CDR3	DRPEFYAYNIFHDPRTVPAGN
28	21D9.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFSLGATDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSPSDFTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPDTYAYNIFPHTASHGAFNYRGQGTL VTVSS
29	21D9.1 CDR1	SLGATD
30	21D9.1 CDR2	FSPSDFTD
31	21D9.1 CDR3	SRPDTYAYNIFPHTASHGAFN
32	21E6.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFTLAATDIDWVRQAPGKGLEWVARIFTPTGFSDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGIPELYAYNIFMDIPAYNDVYYRGQGTLV TVSS
33	21E6.1 CDR1	TLAATD
34	21E6.1 CDR2	FTPTGFSD
35	21E6.1 CDR3	GIPELYAYNIFMDIPAYNDVY
36	23D5.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFDLATTDIDWVRQAPGKGLEWVARIFRPSDFTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVRPDSYAYNILFVTRTFNALHYRGQGTL VTVSS
37	23D5.1 CDR1	DLATTD
38	23D5.1 CDR2	FRPSDFTD
39	23D5.1 CDR3	VRPDSYAYNILFVTRTFNALH
40	FW_FR1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGF

【０２３８】

【表２－２】

41	FW_FR2	IDWVRQAPGKGLEWVARI
42	FW_FR3_13A6, 16A2.1, 20A2.1, 20A3.1, 21A1.1, 21A8.1, 21D9.1, 21E6.1	YADSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC
43	FW_FR3_16A6.1	YTDSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC
44	FW_FR4	YRGQGTLVTVSS
45	CDR1 ConAll	$X_1X_2X_3X_4TD$ 式中 X_1 = S, A, P, T または D; X_2 = L または V; X_3 = A, D または G; および X_4 = A, D, T または E
46	CDR2 ConAll	$FX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 式中 X_5 = S, P, N, T または R; X_6 = P, S または F; X_7 = S, Y, G, A または T; X_8 = G または D; X_9 = F, S または N; X_{10} = T または S; および X_{11} = D または Y
47	FW_FR3 ConAll	YX_{12}DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC 式中 X_{12} = A または T
48	CDR3 ConAll	$X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}YNX_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ 式中 X_{13} = G, D, S または V; X_{14} = R または I; X_{15} = P, S または A; X_{16} = D, A または E; X_{17} = S, V, L, F または T; X_{18} = Y, V または I; X_{19} = A, G または S; X_{20} = I または V; X_{21} = F, I または L; X_{22} = L, F M, H または P; X_{23} = D, P, H または V; X_{24} = N, S, G, A, D, I, P または T; X_{25} = P, S, R または A; X_{26} = T, A または S; X_{27} = Y, V, H または F; X_{28} = T, D, S, N, P または G; X_{29} = A, S, R または D; X_{30} = S, L, R, V, G または F; および X_{31} = D, Q, N, G, Y または H
49	Con SeqAll	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGF$X_1X_2X_3X_4$TDIDWVRQAPGKGLEWVARIF$X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}YX_{12}$DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC$X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}YNX_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$YRGQGTLVTVSS 式中 X_1 = S, A, P, T または D; X_2 = L または V; X_3 = A, D または G; X_4 = A, D, T または E; X_5 = S, P, N, T または R; X_6 = P, S または F; X_7 = S, Y, G, A または T; X_8 = G または D; X_9 = F, S または N; X_{10} = T または S; X_{11} = D または Y; X_{12} = A または T; X_{13} = G, D, S または V; X_{14} = R または I; X_{15} = P, S または A; X_{16} = D, A または E; X_{17} = S, V, L, F または T; X_{18} = Y, V または I; X_{19} = A, G または S; X_{20} = I または V; X_{21} = F, I または L; X_{22} = L, F M, H または P; X_{23} = D, P, H または V; X_{24} = N, S, G, A, D, I, P または T; X_{25} = P, S, R または A; X_{26} = T, A または S; X_{27} = Y, V, H または F; X_{28} = T, D, S, N, P または G; X_{29} = A, S, R または D; X_{30} = S, L, R, V, G または F; および X_{31} = D, Q, N, G, Y または H
50	CDR1 Con16A2.1 由来	X_{32}LAX_{33}TD 式中 X_{32} = P, S または A; および X_{33} = D または E
51	CDR2 Con16A2.1 由来	FSSX_{34}GX_{35}TX_{36} 式中 X_{34} = Y, S または G; X_{35} = S または N; および X_{36} = D または Y
52	CDR3 Con16A2.1 由来	X_{37}RX_{38}DS$X_{39}X_{40}$YNX_{41}IX_{42}PX_{43}STY$X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}$ 式中 X_{37} = G または D; X_{38} = S または A; X_{39} = I または V; X_{40} = A または G; X_{41} = V または I; X_{42} = L または F; X_{43} = G, A または N; X_{44} = S または T; X_{45} = R, S または A; X_{46} = R または S; および X_{47} = D または G
53	Con Seq16A2.1 由来	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFX_{32}LAX_{33}TDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSSX_{34}GX_{35}TX_{36}YADSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCX_{37}RX_{38}DS$X_{39}X_{40}$YNX_{41}IX_{42}PX_{43}STY$X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}$YRGQGTLVTVSS 式中 X_{32} = P, S または A; X_{33} = D または E; X_{34} = Y, S または G; X_{35} = S または N; X_{36} = D または Y; X_{37} = G または D; X_{38} = S または A; X_{39} = I または V; X_{40} = A または G; X_{41} = V または I; X_{42} = L または F; X_{43} = G, A または N; X_{44} = S または T; X_{45} = R, S または A; X_{46} = R または S; および X_{47} = D または G
54	CDR1 Con21/23	$X_{48}X_{49}X_{50}X_{51}$TD 式中 X_{48} = A, S, T または D; X_{49} = L または V; X_{50} = A, D または G; および X_{51} = A または T

【０２３９】

【表２－３】

55	CDR2 Con21/23	$FX_{52}PX_{53}X_{54}FX_{55}D$ 式中 X_{52} = S, N または T; X_{53} = S または T; X_{54} = D または G; および X_{55} = T または S
56	CDR3 Con21/23	$X_{56}X_{57}PX_{58}X_{59}YX_{60}YNIX_{61}X_{62}X_{63}X_{64}X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}$ 式中 X_{56} = G, D, S または V; X_{57} = R または I; X_{58} = A, E または D; X_{59} = V, T, L, S または F; X_{60} = A または G; X_{61} = F または L; X_{62} = L, H, P または M; X_{63} = D, H または V; X_{64} = S, R, P または I; X_{65} = P, R または A; X_{66} = T, S または A; X_{67} = Y, V, H または F; X_{68} = D, N, G または P; X_{69} = A または D; X_{70} = S, G, F, V または L; および X_{71} = Q, N, Y または H
57	Con Seq21/23	$SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFX_{48}X_{49}X_{50}X_{51}TDIDWVRQAPGKGLEWVARIFX_{52}PX_{53}X_{54}FX_{55}DYADSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCX_{56}X_{57}PX_{58}X_{59}YX_{60}YNIX_{61}X_{62}X_{63}X_{64}X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}YRGQGTLVTVSS$ 式中 X_{48} = A, S, T または D; X_{49} = L または V; X_{50} = A, D または G; X_{51} = A または T; X_{52} = S, N または T; X_{53} = S または T; X_{54} = D または G; X_{55} = T または S; X_{56} = G, D, S または V; X_{57} = R または I; X_{58} = A, E または D; X_{59} = V, T, L, S または F; X_{60} = A または G; X_{61} = F または L; X_{62} = L, H, P または M; X_{63} = D, H または V; X_{64} = S, R, P または I; X_{65} = P, R または A; X_{66} = T, S または A; X_{67} = Y, V, H または F; X_{68} = D, N, G または P; X_{69} = A または D; X_{70} = S, G, F, V または L; および X_{71} = Q, N, Y または H
58	GS リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
59	16A2.1x2	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFALAETDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSSGGNTDYADSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSIAYNVILPNSTYTARDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFALAETDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSSGGNTDYADSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSIAYNVILPNSTYTARDYRGQGTLVTVSS
60	VEGF206	MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
61	VEGF189	MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
62	VEGF165	MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
63	VEGF121	MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKCDKPRR
64	成熟 VEGF206	APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
65	成熟 VEGF189	APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
66	成熟 VEGF165	APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
67	成熟 VEGF121	APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKCDKPRR
68	VEGFA シグナルペプチド	MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQA
69	ヒト IgG1 定常領域 (IGHG1; UniProt:P01857-1, v1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２４０】

【表２－４】

70	CH1 IgG1 (P01857-1, v1 の 1 位-98 位)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
71	ヒンジ IgG1 (P01857-1, v1 の 99 位-110 位)	EPKSCDKTHTCP
72	CH2 IgG1 (P01857-1, v1 の 111 位-223 位)	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
73	CH3 IgG1 (P01857-1, v1 の 224 位-330 位)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
74	ラニビズマブ重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTY AADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
75	ラニビズマブ軽鎖	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
76	ペバシズマブ重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTY AADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
77	ペバシズマブ軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０２４１】

本開示は、そのような組合せが明らかに許容されない、または明示的に回避される場合を除いて、記載した態様と好ましい特徴の組合せを含む。

本明細書で使用されているセクションの見出しは、整理のためだけのものであり、記載されている主題を限定するものとして解釈されるものではない。

【０２４２】

本開示の態様および実施形態を、ここで、添付の図面を参照して例として説明する。さらなる態様および実施形態は、当業者には明白であろう。本明細書において言及されているすべての文書は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２４３】

後続の特許請求の範囲を含む本明細書全体を通して、文脈上別段の要求がない限り、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という単語、ならびに「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの変形は、記載した整数もしくはステップ、または整数もしくはステップの群を含むことを意味するが、ただし、他の整数もしくはステップ、または整数もしくはステップの群が除外されないことは理解されよう。

【０２４４】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、文脈上明らかに別段の指示がない限り、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は複数の指示語が含まれることに留意されたい。本明細書では、範囲は、ある特定の「約」の値から、および／または別の特定の「約」の値までとして表され得る。このような範囲が表される場合、別の実施形態は、ある特定の値から、および／または他の特定の値までを含む。同様に、値が近似値として表される場合、先行詞「約」を使用することにより、特定の値が別の実施形態を形成することは理解されよう。

【０２４５】

核酸配列が本明細書に開示されている場合、その逆相補体もまたはっきりと意図されている。

本明細書に記載の方法は、好ましくは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施することができる。「ｉｎ　ｖｉｔｒｏ」という用語は、培養の細胞を用いて実施される手順を包含することを意図しているのに対し、「ｉｎ　ｖｉｖｏ」という用語は、無傷の多細胞生物を用いた、

または無傷の多細胞生物に対する手順を包含することを意図している。

【０２４６】

本開示の原理を示す実施形態および実験について、ここで、添付の図面を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

【０２４７】

【図１】ライブラリー１およびライブラリー２、４Ｄ５（トラスツズマブ）および開始鋳型のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３領域におけるアミノ酸の違いをまとめた表である。「Ｘａａ」は、ランダム化アミノ酸を表す。

【図２Ａ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図２Ｂ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図２Ｃ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図２Ｄ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図２Ｅ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図２Ｆ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図２Ｇ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、

結合曲線の下にｎＭで記載されている。
【図２Ｈ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。
【図２Ｉ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。
【図２Ｊ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。
【図２Ｋ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）によって測定した、（２Ａ）１３Ａ６、（２Ｂ）１６Ａ２．１、（２Ｃ）１６Ａ６．１および（２Ｄ）１６Ａ２．１ｘ２、（２Ｅ）２０Ａ２．１、（２Ｆ）２０Ａ３．１、（２Ｇ）２１Ａ１．１、（２Ｈ）２１Ａ８．１、（２Ｉ）２１Ｄ９．１、（２Ｊ）２１Ｅ６．１ならびに（２Ｋ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。
【図３Ａ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。
【図３Ｂ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。
【図３Ｃ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。
【図３Ｄ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。
【図３Ｅ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ

）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図３Ｆ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図３Ｇ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図３Ｈ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図３Ｉ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図３Ｊ】バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）により測定した、（３Ａ）１３Ａ６、（３Ｂ）１６Ａ２．１、（３Ｃ）１６Ａ６．１、（３Ｄ）２０Ａ２．１、（３Ｅ）２０Ａ３．１、（３Ｆ）２１Ａ１．１、（３Ｇ）２１Ａ８．１、（３Ｈ）２１Ｄ９．１、（３Ｉ）２１Ｅ６．１および（３Ｊ）２３Ｄ５．１のマウスＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。各ＤｏｔＢｏｄｙについて試験した濃度は、結合曲線の下にｎＭで記載されている。

【図４】競合ＥＬＩＳＡにおける、１３Ａ６、１６Ａ２．１、１６Ａ６．１およびラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。

【図５Ａ】競合ＥＬＩＳＡにおける、（５Ａ）１６Ａ２．１、（５Ｂ）２０Ａ２．１、（５Ｃ）２０Ａ３．１、（５Ｄ）２１Ａ１．１、（５Ｅ）２１Ａ８．１、（５Ｆ）２１Ｄ９．１、（５Ｇ）２１Ｅ６．１、（５Ｈ）２３Ｄ５．１および（５Ｉ）ラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。

【図５Ｂ】競合ＥＬＩＳＡにおける、（５Ａ）１６Ａ２．１、（５Ｂ）２０Ａ２．１、（５Ｃ）２０Ａ３．１、（５Ｄ）２１Ａ１．１、（５Ｅ）２１Ａ８．１、（５Ｆ）２１Ｄ９．１、（５Ｇ）２１Ｅ６．１、（５Ｈ）２３Ｄ５．１および（５Ｉ）ラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。

【図５Ｃ】競合ＥＬＩＳＡにおける、（５Ａ）１６Ａ２．１、（５Ｂ）２０Ａ２．１、（５Ｃ）２０Ａ３．１、（５Ｄ）２１Ａ１．１、（５Ｅ）２１Ａ８．１、（５Ｆ）２１Ｄ９．１、（５Ｇ）２１Ｅ６．１、（５Ｈ）２３Ｄ５．１および（５Ｉ）ラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。

【図５Ｄ】競合ＥＬＩＳＡにおける、（５Ａ）１６Ａ２．１、（５Ｂ）２０Ａ２．１、（

５Ｃ）２０Ａ３．１、（５Ｄ）２１Ａ１．１、（５Ｅ）２１Ａ８．１、（５Ｆ）２１Ｄ９．１、（５Ｇ）２１Ｅ６．１、（５Ｈ）２３Ｄ５．１および（５Ｉ）ラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。
【図５Ｅ】競合ＥＬＩＳＡにおける、（５Ａ）１６Ａ２．１、（５Ｂ）２０Ａ２．１、（５Ｃ）２０Ａ３．１、（５Ｄ）２１Ａ１．１、（５Ｅ）２１Ａ８．１、（５Ｆ）２１Ｄ９．１、（５Ｇ）２１Ｅ６．１、（５Ｈ）２３Ｄ５．１および（５Ｉ）ラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。
【図５Ｆ】競合ＥＬＩＳＡにおける、（５Ａ）１６Ａ２．１、（５Ｂ）２０Ａ２．１、（５Ｃ）２０Ａ３．１、（５Ｄ）２１Ａ１．１、（５Ｅ）２１Ａ８．１、（５Ｆ）２１Ｄ９．１、（５Ｇ）２１Ｅ６．１、（５Ｈ）２３Ｄ５．１および（５Ｉ）ラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。
【図５Ｇ】競合ＥＬＩＳＡにおける、（５Ａ）１６Ａ２．１、（５Ｂ）２０Ａ２．１、（５Ｃ）２０Ａ３．１、（５Ｄ）２１Ａ１．１、（５Ｅ）２１Ａ８．１、（５Ｆ）２１Ｄ９．１、（５Ｇ）２１Ｅ６．１、（５Ｈ）２３Ｄ５．１および（５Ｉ）ラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。
【図５Ｈ】競合ＥＬＩＳＡにおける、（５Ａ）１６Ａ２．１、（５Ｂ）２０Ａ２．１、（５Ｃ）２０Ａ３．１、（５Ｄ）２１Ａ１．１、（５Ｅ）２１Ａ８．１、（５Ｆ）２１Ｄ９．１、（５Ｇ）２１Ｅ６．１、（５Ｈ）２３Ｄ５．１および（５Ｉ）ラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。
【図５Ｉ】競合ＥＬＩＳＡにおける、（５Ａ）１６Ａ２．１、（５Ｂ）２０Ａ２．１、（５Ｃ）２０Ａ３．１、（５Ｄ）２１Ａ１．１、（５Ｅ）２１Ａ８．１、（５Ｆ）２１Ｄ９．１、（５Ｇ）２１Ｅ６．１、（５Ｈ）２３Ｄ５．１および（５Ｉ）ラニビズマブによるヒトＶＥＧＦＡとＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害を示すグラフである。
【図６Ａ】室温、６０℃、７０℃または８０℃で１時間インキュベートした後、２５０ｎＭの単一濃度での、抗ＶＥＧＦＡ　ＤｏｔＢｏｄｙ（６Ａ）１６Ａ２．１、（６Ｂ）２０Ａ２．１、（６Ｃ）２０Ａ３．１、（６Ｄ）２１Ａ１．１、（６Ｅ）２１Ａ８．１、（６Ｆ）２１Ｄ９．１、（６Ｇ）２１Ｅ９．１および（６Ｈ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。測定は、実施例１０に記載のようにして、ＢＬＩにより実施した。
【図６Ｂ】室温、６０℃、７０℃または８０℃で１時間インキュベートした後、２５０ｎＭの単一濃度での、抗ＶＥＧＦＡ　ＤｏｔＢｏｄｙ（６Ａ）１６Ａ２．１、（６Ｂ）２０Ａ２．１、（６Ｃ）２０Ａ３．１、（６Ｄ）２１Ａ１．１、（６Ｅ）２１Ａ８．１、（６Ｆ）２１Ｄ９．１、（６Ｇ）２１Ｅ９．１および（６Ｈ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。測定は、実施例１０に記載のようにして、ＢＬＩにより実施した。
【図６Ｃ】室温、６０℃、７０℃または８０℃で１時間インキュベートした後、２５０ｎＭの単一濃度での、抗ＶＥＧＦＡ　ＤｏｔＢｏｄｙ（６Ａ）１６Ａ２．１、（６Ｂ）２０Ａ２．１、（６Ｃ）２０Ａ３．１、（６Ｄ）２１Ａ１．１、（６Ｅ）２１Ａ８．１、（６Ｆ）２１Ｄ９．１、（６Ｇ）２１Ｅ９．１および（６Ｈ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。測定は、実施例１０に記載のようにして、ＢＬＩにより実施した。
【図６Ｄ】室温、６０℃、７０℃または８０℃で１時間インキュベートした後、２５０ｎＭの単一濃度での、抗ＶＥＧＦＡ　ＤｏｔＢｏｄｙ（６Ａ）１６Ａ２．１、（６Ｂ）２０Ａ２．１、（６Ｃ）２０Ａ３．１、（６Ｄ）２１Ａ１．１、（６Ｅ）２１Ａ８．１、（６Ｆ）２１Ｄ９．１、（６Ｇ）２１Ｅ９．１および（６Ｈ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。測定は、実施例１０に記載のようにして、ＢＬＩにより実施した。
【図６Ｅ】室温、６０℃、７０℃または８０℃で１時間インキュベートした後、２５０ｎＭの単一濃度での、抗ＶＥＧＦＡ　ＤｏｔＢｏｄｙ（６Ａ）１６Ａ２．１、（６Ｂ）２０Ａ２．１、（６Ｃ）２０Ａ３．１、（６Ｄ）２１Ａ１．１、（６Ｅ）２１Ａ８．１、（６

Ｆ）２１Ｄ９．１、（６Ｇ）２１Ｅ９．１および（６Ｈ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。測定は、実施例１０に記載のようにして、ＢＬＩにより実施した。
【図６Ｆ】室温、６０℃、７０℃または８０℃で１時間インキュベートした後、２５０ｎＭの単一濃度での、抗ＶＥＧＦＡ　ＤｏｔＢｏｄｙ（６Ａ）１６Ａ２．１、（６Ｂ）２０Ａ２．１、（６Ｃ）２０Ａ３．１、（６Ｄ）２１Ａ１．１、（６Ｅ）２１Ａ８．１、（６Ｆ）２１Ｄ９．１、（６Ｇ）２１Ｅ９．１および（６Ｈ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。測定は、実施例１０に記載のようにして、ＢＬＩにより実施した。
【図６Ｇ】室温、６０℃、７０℃または８０℃で１時間インキュベートした後、２５０ｎＭの単一濃度での、抗ＶＥＧＦＡ　ＤｏｔＢｏｄｙ（６Ａ）１６Ａ２．１、（６Ｂ）２０Ａ２．１、（６Ｃ）２０Ａ３．１、（６Ｄ）２１Ａ１．１、（６Ｅ）２１Ａ８．１、（６Ｆ）２１Ｄ９．１、（６Ｇ）２１Ｅ９．１および（６Ｈ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。測定は、実施例１０に記載のようにして、ＢＬＩにより実施した。
【図６Ｈ】室温、６０℃、７０℃または８０℃で１時間インキュベートした後、２５０ｎＭの単一濃度での、抗ＶＥＧＦＡ　ＤｏｔＢｏｄｙ（６Ａ）１６Ａ２．１、（６Ｂ）２０Ａ２．１、（６Ｃ）２０Ａ３．１、（６Ｄ）２１Ａ１．１、（６Ｅ）２１Ａ８．１、（６Ｆ）２１Ｄ９．１、（６Ｇ）２１Ｅ９．１および（６Ｈ）２３Ｄ５．１のヒトＶＥＧＦＡへの結合を示すセンサーグラムである。測定は、実施例１０に記載のようにして、ＢＬＩにより実施した。
【実施例】
【０２４８】
実施例１：ナイーブ合成ＤｏｔＢｏｄｙファージディスプレイライブラリーの作製
２つのＤｏｔＢｏｄｙファージディスプレイライブラリーを、抗ＶＥＧＦ　ＤｏｔＢｏｄｙの同定に使用した。これらのライブラリーは、トラスツズマブＶＨドメインに由来するヒト化、安定化された自律的ＶＨドメイン鋳型に基づいた（例えば、ＷＯ２０１６／０７２９３８Ａ１に記載の「ＤｏｔＢｏｄｙ足場特許」）。
【０２４９】
ライブラリー１は、以下のＶＨドメイン鋳型配列に基づいた（ライブラリー作製のために変異させた位置には下線が引かれている）：
ＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＳＡＩＳＧＦ<u>ＳＩＳＳＴＳ</u>ＩＤＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩ<u>ＳＰＳＳＧＳＴＳ</u>ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＴ<u>ＧＲＳＳＳＡＭ</u>ＤＹＲＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ
ライブラリー２は、以下のＶＨドメイン鋳型配列に基づいた（ライブラリー作製のために変異させた位置には下線が引かれている）：
ＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＩＳＧＦ<u>ＳＩＳＳＴＳ</u>ＩＤＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩ<u>ＳＰＳＳＧＳＴＳ</u>ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣ<u>ＧＲＳＳＳＡＭ</u>ＤＹＲＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ
ＶＨドメイン鋳型のＣＤＲ－１、ＣＤＲ－２、およびＣＤＲ－３は、Ｂｏｓｔｒｏｍ Ｊ．ら（１４、１５）および　Ｔｏｎｉｋｉａｎ　Ｒ．ら（１６）による手順に従ったＫｕｎｋｅｌ変異誘発によって、図１に示す設計によってランダム化した。ライブラリー１に使用したプライマーを表１に示し、ライブラリー２に使用したプライマーを表２に示す。
【０２５０】
ライブラリー１には、約２．８７ｘ１０^{10}クローンが含まれており、一方、ライブラリー２には、すべてのＣＤＲが変異した約１．３７ｘ１０^{10}クローンが含まれていた。ライブラリーは、ライブラリー形質転換後の段階希釈およびコロニー計数によって評価した。
【０２５１】

【表３】

プライマー名称	プライマー配列
H1	CCTCTGCAATTTCTGGCTTC [XYZ] NTT [XYZ][XYZ] ACT [XYZ] ATAGACTGGGTGCGTCAGG
H2	CTGGAATGGGTTGCAAGGATT [XYZ] CCT [XYZ][XYZ] GGT [XYZ] ACT [XYZ] TATGCCGATAGCGTCAAGGG
H3.6	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.7	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.8	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.9	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.10	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.11	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.12	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.13	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.14	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.15	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.16	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.17	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.18	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.19	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.20	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG

表 1. ライブラリー1 の作製に使用したプライマー。プライマーH1 および H2 をプライマー H3.6-H3.20 と混合した後、VH 鋳型配列に Kunkel 変異誘発を実施し、15 個のサブライブラリーを作製し、これを後で組み合わせて最終ライブラリーを形成した。コドン[XYZ]の以下のようなヌクレオチド頻度を有する: X = 0.2G + 0.2A + 0.5T + 0.1C, Y = 0.4A + 0.2T + 0.4C および Z = 0.1G + 0.9C.

【０２５２】

【表４】

プライマー名称	プライマー配列
H1	CCTGTGCAATTTCTGGCTTC [XYZ] NTT [XYZ][XYZ] ACT [XYZ] ATAGACTGGGTGCGTCAGG
H2	CTGGAATGGGTTGCAAGGATT [XYZ] CCT [XYZ][XYZ] GGT [XYZ] ACT [XYZ] TATGCCGATAGCGTCAAGGG
H3.6	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.7	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.8	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.9	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.10	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.11	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.12	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.13	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.14	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.15	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.16	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.17	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.18	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] [XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.19	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] [XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.20	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] [XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG

表 2. ライブラリー2 の作製に使用したプライマー。プライマーH1 および H2 をプライマー H3.6-H3.20 と混合した後、VH 鋳型配列に Kunkel 変異誘発を実施し、15 個のサブライブラリーを作製し、これを後で組み合わせて最終ライブラリーを形成した。コドン[XYZ]の以下のようなヌクレオチド頻度を有する: X = 0.2G + 0.2A + 0.5T + 0.1C, Y = 0.4A + 0.2T + 0.4C および Z = 0.1G + 0.9C.

【０２５３】

実施例２：ナイーブ合成ＤｏｔＢｏｄｙファージディスプレイライブラリーからのファージディスプレイ選択

ヒトＶＥＧＦ－１２１（Ａｃｒｏ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を、Ｍａｘｉｓｏｒｐ Ｉｍｍｕｎｏチューブ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に、ラウンド１では１ｍＬのＰＢＳ中２０μｇ、それ以降のラウンドでは１ｍＬのＰＢＳ中１０μｇで、４℃にて一晩固定化した。チューブをＰＢＳで２回洗浄し、ミルクブロックバッファー（ＭＢＢ：ＰＢＳＴ、すなわち０．０５％のＴｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳ中の１％スキムミルク）で、室温（ＲＴ）にて１時間ブロッキングした。ネガティブ選択チューブは、ＶＥ

ＧＦ－１２１について記載したのと同じ方法で調製したが、ＶＥＧＦ－１２１タンパク質の代わりにＰＢＳを使用した。５００μＬのライブラリー１およびライブラリー２（約２ｘ１０^{13}ｐｆｕ／ｍＬ）をＰＥＧ／ＮａＣｌバッファー（２０％のＰＥＧ８，０００、２．５ＭのＮａＣｌ）で沈殿させ、ＭＢＢに再懸濁した後、ネガティブ選択チューブに移し、室温で１時間インキュベートした。ファージをＶＥＧＦ－１２１でコーティングしたイムノチューブに移し、室温で２時間インキュベートした。次いで、チューブをＭＢＢで３回、ＰＢＳＴで３回、ＰＢＳで２回洗浄し、非結合ファージを除去した。結合したファージを、トリプシンバッファー（ＴＢＳ＋２ｍＭ　ＣａＣｌ$_2$）中の１ｍｇ／ｍＬのトリプシンで溶出した。溶出したファージを使用し、対数増殖期（ＯＤ$_{600}$　約０．５）の５ｍＬのＴＧ１細菌細胞培養物（２ＹＴ培地中）を３０分間３７℃で感染させた。ラウンド２以降は、モノクローナルスクリーニングに使用するために、感染したＴＧ１細胞１．２ｍＬを２０％グリセロールとともに－８０℃で保存した（モノクローナルスクリーニング用グリセロールストック）。残りの感染したＴＧ１細胞を５０ｍＬの２ＹＴに移した。培養物をＯＤ$_{600}$が約０．５になるまで振盪しながら３７℃でインキュベートした後、１ｘ１０^{10}ｐｆｕ／ｍＬのＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージを３７℃で３０分間感染させた。感染したＴＧ１細胞を４℃にて２０分間３，９００ｇでペレット化し、５００μＬの２ＹＴブロスに再懸濁し、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンおよび５０μｇ／ｍＬのカナマイシンを補充した２ｘ１５ｃｍの丸型２ＹＴ寒天プレート上にプレーティングした。一晩３０℃でインキュベートした後、細菌叢を２５ｍＬのＴＢＳに再懸濁した。生成されたファージをＰＥＧ／ＮａＣｌバッファーによる沈殿によって精製した。ＰＥＧ／ＮａＣｌ沈殿を２回繰り返した後、ファージをＰＢＳ＋１０％グリセロールに再懸濁した。精製したファージをその後の選択ラウンドに使用した。

【０２５４】

４ラウンドの選択をＶＥＧＦ－１２１に対して実施した。２回目の選択ラウンド以降、洗浄の回数は以下のように増やした：

・　ラウンド２：ＭＢＢで４回、ＰＢＳＴで４回、ＰＢＳで２回。

【０２５５】

・　ラウンド３：ＭＢＢで６回、ＰＢＳＴで６回、ＰＢＳで２回。

・　ラウンド４：ＭＢＢで７回、ＰＢＳＴで７回、ＰＢＳで２回。

第２の選択ラウンド以降は、最終濃度１×１０^{12}ｐｆｕ／ｍＬで前回の選択ラウンドから精製したファージ１ｍＬを使用した。残りのパニング手順は同じであった。

【０２５６】

実施例３：モノクローナルファージＥＬＩＳＡによる特有バインダーの同定

モノクローナルファージＥＬＩＳＡを使用して、ナイーブライブラリーならびに親和性成熟ライブラリーから選択された特有結合ＤｏｔＢｏｄｙを同定した。モノクローナルスクリーニング用のグリセロールストックを、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを補充した２ＹＴ寒天プレート上にプレーティングし、一晩３７℃でインキュベートした。個々のコロニーを、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを補充した１ｍＬの２ＹＴブロスで２時間増殖させた後、１ｘ１０^{10}ｐｆｕ／ｍＬのＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージを感染させた。培養物に５０μｇ／ｍＬのカナマイシンをさらに補充し、３０℃で一晩インキュベートした。

【０２５７】

細胞を４℃で１０分間、１，１００ｇの遠心分離によりペレット化し、上清をファージモノクローナルＥＬＩＳＡに使用した。ファージモノクローナルＥＬＩＳＡでは、ＶＥＧＦ－１２１を１μｇ／ｍＬの濃度でＭａｘｉｓｏｒｐ　９６ウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に一晩４℃で固定化し、ＰＢＳで２回洗浄し、ＭＢＢにより１時間室温でブロッキングした。２５μＬのファージ培養物上清を２５μＬのＭＢＢと混合し、プレートに添加し、２時間室温でインキュベートした。プレートをＰＢＳＴで８回洗浄した後、５０μＬの抗Ｍ１３抗体ＨＲＰコンジュゲート（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社）をＭＢＢ中１：７，０００希釈で添加し、１時間室温でインキュベートした。プ

レートをＰＢＳＴで８回洗浄し、５０μＬの３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質（ＧｅｎｅＴｅｘ社）により展開した。５～１５分後、反応を、５０μＬの２Ｍ　H_2SO_4を添加することにより停止させ、シグナルを４５０ｎｍの吸光度で測定した。高シグナル強度（１より大きい吸光度）を持つモノクローナルクローンをサンガー配列決定によって配列決定し、ＶＥＧＦ－１２１に結合する特有ＶＨドメインを同定した。

【０２５８】

実施例４：親和性成熟ファージディスプレイライブラリーの構築

抗ＶＥＧＦ　ＤｏｔＢｏｄｙ　１３Ａ６は、その結合親和性が５０ｎ未満であって、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦ受容体１（ＶＥＧＦＲ１）の間の相互作用も遮断したことから、親和性成熟のために選択された。親和性成熟ファージディスプレイライブラリーは、Ｂｏｓｔｒｏｍ　Ｊ．ら（１４）に従い、表３に示すプライマーを使用して、Ｋｕｎｋｅｌ変異誘発によって作製した。ライブラリーは、ＴＧ１細胞へのライブラリーエレクトロポレーションの際の段階希釈、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを補充した２ＹＴ寒天上へのプレーティング、その後の３０コロニーからのプラスミドの配列決定によって推定したところ、1.1×10^8個の特有配列を含んでいた。

【０２５９】

【表５】

プライマー名称	プライマー配列
aVEGF-13A6 CDR1	TGTGCAATTTCTGGCTTC87878867867857765 7ATAGACTGGGTGCGTCAG
aVEGF-13A6 CDR2	GAATGGGTTGCAAGGATT888776878678668878577657TATGCCGATAGCGTCAAG
aVEGF-13A6 CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT668565878657878857878857558688888788757558776577857577678788657TACCGGGGTCAAGGAACA

表 3. 抗 VEGF DotBody 13A6 の親和性成熟ファージディスプレイライブラリーの作製に使用されるプライマーの DNA 配列。配列中の数字は、オリゴヌクレオチド配列中の塩基 A、T、C および G の頻度を表す。頻度コード 5= 70% A, 10% G, 10% C, 10% T; 6 = 70% G, 10% A, 10% C, 10% T; 7 = 70% C, 10% A, 10% G, 10% T; 8 = 70% T, 10% A, 10% G, 10% C。

【０２６０】

実施例５：１３Ａ６ベースの親和性成熟ファージディスプレイの選択

ニュートラアビジンを、１ｍＬのＰＢＳ中１０μｇでＭａｘｉｓｏｒｐ　Ｉｍｍｕｎｏチューブ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に一晩４℃で固定化した。チューブをＰＢＳで２回洗浄し、ＭＢＢ中、室温（ＲＴ）で１時間ブロッキングした。ビオチン化ＶＥＧＦ－１２１（Ａｃｒｏ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を、パニングラウンドに応じて異なる濃度で加えた（表４を参照されたい）。タンパク質を１時間、室温でインキュベートし、非結合タンパク質をＰＢＳで２回洗浄することにより除去した。ネガティブ選択チューブは、ビオチン化ＶＥＧＦ－１２１について記載したようにして調製したが、ビオチン化ＶＥＧＦ－１２１の代わりにＰＢＳを加えた。

【０２６１】

残りの選択手順は、ナイーブ合成ＤｏｔＢｏｄｙファージディスプレイライブラリーからのファージディスプレイ選択と同様であるが、ある特定の変更については表４にまとめた通りである。

【０２６２】

【表６】

変更	詳細
選択ラウンドの数	ストリンジェンシーのレベルを増しながら５ラウンド
アダプタータンパク質	ビオチン結合タンパク質は、Maxisorp プレートに以下のように固定化した: • ラウンド 1: 2mL 中 20 µg ニュートラアビジン • ラウンド 2: 2mL 中 10 µg ストレプトアビジン • ラウンド 3: 2mL 中 10 µg ニュートラアビジン • ラウンド 4: 2mL 中 10 µg ストレプトアビジン • ラウンド 5: 2mL 中 10 µg ニュートラアビジン
固定されたビオチン化 VEGF-121 の量	ビオチン化 VEGF-121 濃度を減少させながら、様々な選択ラウンドにおいてアダプタータンパク質をコートしたチューブ上でインキュベートした: • ラウンド 1～2: 300 nM • ラウンド 3～5: 15 nM
VEGF-121 に加えられたファージの量	ライブラリーは、様々な選択ラウンドにおいて異なる最終濃度で 1mL の MBB に希釈された: • ラウンド 1: 1×10^{13} pfu/m の親和性成熟ファージディスプレイライブラリー • ラウンド 2: 1×10^{12} pfu/mL の前のラウンドからの精製ファージ • ラウンド 3～5: 5×10^{11} pfu/mL の前のラウンドからの精製ファージ
VEGF-121 によるファージのインキュベーション時間	ファージをネガティブ選択チューブで 1 時間、RT でインキュベートした後、VEGF-121 を含むチューブに移し、様々な選択ラウンドで異なる時間、RT でインキュベートした: • ラウンド 1: 2 時間 • ラウンド 2: 1 時間 • ラウンド 3: 30 分 • ラウンド 4: 10 分 • ラウンド 5: 3 分
非結合ファージの洗浄	非結合ファージは、様々な選択ラウンドにおいて異なる洗浄レジメンに従って除去された: • ラウンド 1: MBB で 3 回、PBST で 3 回、PBS で 2 回 • ラウンド 2: MBB で 4 回、PBST で 4 回、PBS で 2 回 • ラウンド 3: MBB で 10 回、PBST で 10 回、PBS で 2 回 • ラウンド 4 および 5: MBB で 15 回、PBST で 15 回、PBS で 2 回

表 4. ビオチン化 VEGF-121 に対する 13A6 ベースのファージディスプレイライブラリーの親和性成熟選択条件。

【０２６３】

１３Ａ６ベースの親和性成熟ファージディスプレイ選択により、１６Ａ２．１、１６Ｃ２．１および１６Ａ６．１が生じた。

実施例６：１６Ａ２．１ベースの親和性成熟ファージディスプレイライブラリーの構築

抗ＶＥＧＦ　ＤｏｔＢｏｄｙ　１６Ａ２．１は、その結合親和性が５ｎＭ未満であって、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦ受容体１（ＶＥＧＦＲ１）の間の相互作用も遮断したことから、親和性成熟のために選択された。親和性成熟ファージディスプレイライブラリーは、Ｂｏｓｔｒｏｍ　Ｊ．ら（１４）に従い、表５に示すプライマーを使用して、Ｋｕｎｋｅｌ変異誘発によって作製した。ＣＤＲ３は潜在的なＮ－グリコシル化部位（配列「ＮＳＴ」）を含んでいたため、このＣＤＲに対して３つのプライマーを設計し、そのうちの１つは親配列をそのまま残し、他の２つは以下のように変更してからランダム化プライマー設計を実施した（変更点に下線）：

１６Ａ２．１（ＡＳＴ）：ＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＩＳＧＦ

ＡＬＡＥＴＤＩＤＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩＦＳＳＧＧＮＴＤＹＡＤＳＶＫＧＲ
ＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＧＲＳＤＳＩＡＹＮＶＩ
ＬＰＡＳＴＹＴＡＲＤＹＲＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ
１６Ａ２．１（ＮＳＡ）：ＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＩＳＧＦ
ＡＬＡＥＴＤＩＤＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩＦＳＳＧＧＮＴＤＹＡＤＳＶＫＧＲ
ＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＧＲＳＤＳＩＡＹＮＶＩ
ＬＰＮＳＡＹＴＡＲＤＹＲＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ

得られたライブラリーは、ＴＧ１細胞へのライブラリーエレクトロポレーションの際の段階希釈、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを補充した２ＹＴ寒天へのプレーティング、およびその後の変異率を決定するためのいくつかのコロニーからのプラスミドの配列決定によって推定したところ、０．６ｘ１０^{8}個の特有配列を含んでいた。

【０２６４】

【表７】

プライマー名称	プライマー配列
aVEGF-16A2.1 CDR1	TGTGCAATTTCTGGCTTC67878867865557765 7ATAGACTGGGTGCGTC AG
aVEGF-16A2.1 CDR2	GAATGGGTTGCAAGGATT888878878668668558577657TATGCCGATAG CGTCAAG
aVEGF-16A2.1 CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT668565878657878588678857558688588788 7655887857785757767856565 7TACCGGGGTCAAGGAACA
aVEGF-16A2.1(AST) CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT668565878657878588678857558688588788 7655887867885757767856565 7TACCGGGGTCAAGGAACA
aVEGF-16A2.1(NSA) CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT668565878657878588678857558688588788 7667887857785757767856565 7TACCGGGGTCAAGGAACA

表 5. 抗 VEGF DotBody 16A2.1 の親和性成熟ファージディスプレイライブラリーの作製に使用されるプライマーの DNA 配列。配列中の数字は、オリゴヌクレオチド配列中の塩基 A、T、C および G の頻度を表す。頻度コード 5 = 70% A, 10% G, 10% C, 10% T; 6 = 70% G, 10% A, 10% C, 10% T; 7 = 70% C, 10% A, 10% G, 10% T; 8 = 70% T, 10% A, 10% G, 10% C。

【０２６５】

実施例７：１６Ｃ２．１ベースの親和性成熟ファージディスプレイライブラリーの構築

抗ＶＥＧＦ　ＤｏｔＢｏｄｙ　１６Ｃ２．１は、その結合親和性が５ｎＭ未満であって、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦ受容体１（ＶＥＧＦＲ１）の間の相互作用も遮断したことから、親和性成熟のために選択された。親和性成熟ファージディスプレイライブラリーは、Ｂｏｓｔｒｏｍ　Ｊ．ら（１４）に従い、表６に示すプライマーを使用して、Ｋｕｎｋｅｌ変異誘発によって作製した。得られたライブラリーは、ＴＧ１細胞へのライブラリーエレクトロポレーション際の段階希釈、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを補充した２ＹＴ寒天へのプレーティング、およびその後の変異率を決定するためのいくつかのコロニーからのプラスミドの配列決定によって推定したところ、１．１ｘ１０^{8}個の特有配列を含んでいた。

【０２６６】

【表８】

プライマー名称	プライマー配列
aVEGF-16C2.1 CDR1	TGTGCAATTTCTGGCTTC878788678678577657ATAGACTGGGTGCGTC AG
aVEGF-16C2.1 CDR2	GAATGGGTTGCAAGGATT888878776878657888577657TATGCCGATAG CGTCAAG
aVEGF-16C2.1 CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT668565776657757857678857558588888786575777765778575586787887575TACCGGGGTCAAGGAACA

表 6. 抗 VEGF DotBody 16C2.1 の親和性成熟ファージディスプレイライブラリーの作製に使用されるプライマーの DNA 配列。配列中の数字は、オリゴヌクレオチド配列中の塩基 A、T、C および G の頻度を表す。頻度コード 5 = 70% A, 10% G, 10% C, 10% T; 6 = 70% G, 10% A, 10% C, 10% T; 7 = 70% C, 10% A, 10% G, 10% T; 8 = 70% T, 10% A, 10% G, 10% C。

【０２６７】

実施例８：熱負荷を伴う、１６Ａ２．１ベースおよび１６Ｃ２．１ベースの親和性成熟ファージディスプレイの選択

１６Ａ２．１ベースおよび１６Ｃ２．１ベースのファージディスプレイライブラリーを、同じ手順に従って別々にパニングした。

【０２６８】

ニュートラアビジンを、１ｍＬのＰＢＳ中１０μｇでＭａｘｉｓｏｒｐ　Ｉｍｍｕｎｏチューブ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に一晩４℃で固定化した。チューブをＰＢＳで２回洗浄し、ＭＢＢ中、室温（ＲＴ）で１時間ブロッキングした。ビオチン化ＶＥＧＦ－１２１（Ａｃｒｏ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を、パニングラウンドに応じて異なる濃度で加えた（表７を参照されたい）。タンパク質を１時間、室温でインキュベートし、非結合タンパク質をＰＢＳで２回洗浄することにより除去した。ネガティブ選択チューブを、ビオチン化ＶＥＧＦ－１２１について記載したようにして調製したが、ビオチン化ＶＥＧＦ－１２１の代わりにＰＢＳを加えた。

【０２６９】

残りの選択手順は、ナイーブ合成ＤｏｔＢｏｄｙファージディスプレイライブラリーからのファージディスプレイの選択と同様であるが、ある特定の変更については表７にまとめた通りである。

【０２７０】

【表９】

変更	詳細
選択ラウンドの数	ストリンジェンシーのレベルを増しながら 4 ラウンド
アダプタータンパク質	ビオチン結合タンパク質は、Maxisorp プレートに以下のように固定化した: • ラウンド 1: 2mL 中 20 µg ニュートラアビジン • ラウンド 2: 2mL 中 10 µg ニュートラアビジン • ラウンド 3: 2mL 中 10 µg ニュートラアビジン • ラウンド 4: 2mL 中 10 µg ニュートラアビジン
固定されたビオチン化 VEGF-121 の量	ビオチン化 VEGF-121 濃度を減少させながら、様々な選択ラウンドにおいてアダプタータンパク質をコートしたチューブ上でインキュベートした: • ラウンド 1: 75 nM • ラウンド 2: 24 nM • ラウンド 3: 7.5 nM • ラウンド 4: 7.5 nM
VEGF-121 に加えられたファージの量	ライブラリーは、様々な選択ラウンドにおいて異なる最終濃度で 1mL の MBB に希釈された: • ラウンド 1: 2×10^{12} pfu/mL の親和性成熟ファージディスプレイライブラリー • ラウンド 2: 5×10^{11} pfu/mL の前のラウンドからの精製ファージ • ラウンド 3: 5×10^{11} pfu/mL の前のラウンドからの精製ファージ • ラウンド 4: 5×10^{11} pfu/mL の前のラウンドからの精製ファージ
熱負荷	ファージを異なる温度でインキュベートし、15,000g で 5 分間スピンダウンした後、選択を続けた。温度は以下のように示される。 • ラウンド 1: 熱負荷なし • ラウンド 2: 熱負荷なし • ラウンド 3: 55°C で 30 分 • ラウンド 4: 70°C で 30 分
VEGF-121 によるファージのインキュベーション時間	ファージをネガティブ選択チューブで 1 時間、RT でインキュベートした後、VEGF-121 を含むチューブに移し、様々な選択ラウンドで異なる時間、RT でインキュベートした: • ラウンド 1: 1 時間 • ラウンド 2: 30 分 • ラウンド 3: 30 分 • ラウンド 4: 30 分
非結合ファージの洗浄	非結合ファージは、様々な選択ラウンドにおいて異なる洗浄レジメンに従って除去された: • ラウンド 1: MBB で 3 回、PBST で 3 回 • ラウンド 2: MBB で 10 回、PBST で 10 回、PBS で 2 回 • ラウンド 3: MBB で 15 回、PBST で 15 回、PBS で 2 回 • ラウンド 4: MBB で 15 回、PBST で 15 回、PBS で 2 回

表 7. ビオチン化 VEGF-121 に対する 16A2.1 ベースおよび 16C2.1 ベースのファージディスプレイライブラリーの親和性成熟選択条件。

【０２７１】

熱負荷を伴う１６Ａ２．１ベースの親和性成熟ファージディスプレイ選択により、２０Ａ２．１および２０Ａ３．１が生じた。

熱負荷を伴う１６Ｃ２．１ベースの親和性成熟ファージディスプレイ選択により、２１Ａ１．１、２１Ａ８．１、２１Ｄ９．１および２１Ｅ６．１が生じた。

【０２７２】

実施例９：熱負荷を伴わない、１６Ｃ２．１ベースの親和性成熟ファージディスプレイ選択

１６Ｃ２．１ベースのファージディスプレイライブラリーもまた、以下のようにして、

熱負荷を伴わずにパニングした。

【０２７３】

ニュートラアビジンを、１ｍＬのＰＢＳ中１０μｇでＭａｘｉｓｏｒｐ Ｉｍｍｕｎｏチューブ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に一晩４℃で固定化した。チューブをＰＢＳで２回洗浄し、ＭＢＢ中、室温（ＲＴ）で１時間ブロッキングした。ビオチン化ＶＥＧＦ－１６５（Ａｃｒｏ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を、パニングラウンドに応じて異なる濃度で加えた（表８を参照されたい）。タンパク質を１時間、室温でインキュベートし、非結合タンパク質をＰＢＳで２回洗浄することにより除去した。ネガティブ選択チューブは、ビオチン化ＶＥＧＦ－１６５について記載したようにして調製したが、ビオチン化ＶＥＧＦ－１６５の代わりにＰＢＳを加えた。

【０２７４】

残りの選択手順は、ナイーブ合成ＤｏｔＢｏｄｙファージディスプレイライブラリーからのファージディスプレイ選択と同様であるが、ある特定の変更については表８にまとめた通りである。

【０２７５】

【表１０】

変更	詳細
選択ラウンドの数	ストリンジェンシーのレベルを増しながら 4 ラウンド
アダプタータンパク質	ビオチン結合タンパク質は、Maxisorp プレートに以下のように固定化した: • ラウンド 1: 2mL 中 20 µg ニュートラアビジン • ラウンド 2: 2mL 中 10 µg ストレプトアビジン • ラウンド 3: 2mL 中 10 µg ニュートラアビジン • ラウンド 4: 2mL 中 10 µg ニュートラアビジン
固定されたビオチン化 VEGF-165 の量	ビオチン化 VEGF-165 濃度を減少させながら、様々な選択ラウンドにおいてアダプタータンパク質をコートしたチューブ上でインキュベートした: • ラウンド 1: 223 nM • ラウンド 2: 223 nM • ラウンド 3: 11 nM • ラウンド 4: 11 nM
VEGF-165 に加えられたファージの量	ライブラリーは、様々な選択ラウンドにおいて異なる最終濃度で 1mL の MBB に希釈された: • ラウンド 1: 1×10^{13} pfu/mL の親和性成熟ファージディスプレイライブラリー • ラウンド 2: 1×10^{12} pfu/mL の前のラウンドからの精製ファージ • ラウンド s 3: 1×10^{12} pfu/mL の前のラウンドからの精製ファージ • ラウンド s 4: 5×10^{11} pfu/mL の前のラウンドからの精製ファージ
VEGF-165 によるファージのインキュベーション条件	ファージをネガティブ選択チューブで 1 時間、RT でインキュベートした後、VEGF-165 を含むチューブに移し、様々な選択ラウンドで異なる時間、RT でインキュベートし、ラウンド 3 および 4 では、さらなるストリンジェンシーのためにラニビズマブを添加した: • ラウンド 1: 1 時間 • ラウンド 2: 30 分 • ラウンド 3: 5nM のラニビズマブの存在下で 30 分 • ラウンド 4: 5nM のラニビズマブの存在下で 30 分
非結合ファージの洗浄	非結合ファージは、様々な選択ラウンドにおいて以下の異なる洗浄レジメンに従って除去された: • ラウンド 1: MBB で 3 回、PBST で 3 回 • ラウンド 2: MBB で 10 回、PBST で 10 回、PBS で 2 回 • ラウンド 3: MBB で 15 回、PBST で 15 回、PBS で 2 回 • ラウンド 4: MBB で 15 回、PBST で 15 回、PBS で 2 回

表 8. ビオチン化 VEGF-165 に対する 16C2.1 ベースのファージディスプレイライブラリーの親和性成熟選択条件。

【０２７６】

熱負荷を伴わない１６Ｃ２．１ベースの親和性成熟ファージディスプレイ選択により、２３Ｄ５．１が生じた。

実施例１０：タンパク質の生成およびバイオレイヤー干渉法による結合動態の特性評価

ＶＥＧＦＡ結合クローンを、オープンリーディングフレームの５’にＡＴＧコドン、および３’にヘキサヒスチジンタグをコードする配列を持つｐＥＴベースの発現ベクターにクローニングした。これらを大腸菌内で組換え的に生成し、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、続いてＰＢＳ中で脱塩した。二価分子１６Ａ２．１ｘ２も同様の方法で生成した。

【０２７７】

結合特性決定は、ＢＬＩ（Ｓａｔｏｒｉｕｓ社）を使用し、室温で流速１０００ｒｐｍにより実施した。ビオチン化ヒトＶＥＧＦ－１６５（Ａｃｒｏ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ社）を、ＢＬＩバッファー（ＰＢＳ中に０．１％ＢＳＡおよび０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０）中、３μｇ／ｍＬの濃度で６０秒間、ストレプトアビジンをコーティングしたチップ上に固定化した。３０秒のベースラインの後、抗ＶＥＧＦＡ ＤｏｔＢｏｄｙを、ブランク参照を含む８つの異なる濃度で、ＢＬＩバッファー中６０秒間結合させ、続いてＢＬＩバッファー中で４００秒間解離させた。０ｎＭ濃度の参照を使用してバックグラウンド・バッファーシグナルを減算し、結合動態を、ＢＬＩ分析ソフトウェアを使用して、１：１結合モデルに従いグローバルフィット（ｇｌｏｂａｌ ｆｉｔ）を使用して計算した。二価分子１６Ａ２．１ｘ２もまた、ここで説明されているようにして特性決定したが、解離は６００秒とした。マウスＶＥＧＦＡに対するすべてのクローンの結合を特性決定するために、同じ手順を使用したが、固定化標的は、ビオチン化マウスＶＥＧＦ－１６４（Ａｃｒｏ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ社）に置き換えた。

【０２７８】

センサーグラムを図２および図３に示し、結合データを以下の表に示す：

【０２７９】

【表１１】

標的抗原	分子	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{diss} (s^{-1})	結合親和性(K_D)
ヒト VEGF165	13A6	$1.22x10^5$	$4.75x10^3$	38.9 nM
	16A2.1	$3.94x10^5$	$9.86x10^{-4}$	2.5 nM
	16A6.1	$9.24x10^4$	$1.36x10^{-3}$	14.7 nM
	16A2.1x2	$4.26x10^5$	$1.28x10^{-4}$	0.301 nM
	20A2.1	$9.77x10^4$	$5.50x10^{-4}$	5.54 nM
	20A3.1	$2.60x10^5$	$7.25x10^{-4}$	2.78 nM
	21A1.1	$9.15x10^4$	$1.03x10^{-3}$	11.3 nM
	21A8.1	$5.80x10^4$	$1.18x10^{-3}$	20.0 nM
	21D9.1	$4.82x10^4$	$9.90x10^{-4}$	20.5 nM
	21E6.1	$6.96x10^4$	$4.42x10^{-4}$	6.3 nM
	23D5.1	$2.86x10^5$	$8.02x10^{-4}$	2.8 nM
マウス VEGF164	13A6	$4.19x10^4$	$1.04x10^{-2}$	248 nM
	16A2.1	$1.16x10^5$	$1.93x10^{-3}$	16.6 nM
	16A6.1	$1.22x10^5$	$2.25x10^{-3}$	18.4 nM
	20A2.1	$1.32x10^5$	$1.35x10^{-3}$	10.2 nM
	20A3.1	$1.02x10^5$	$8.89x10^{-4}$	8.7 nM
	21A1.1	$1.67x10^5$	$2.31x10^{-3}$	13.8 nM
	21A8.1	$6.34x10^4$	$2.92x10^{-3}$	46.1 nM
	21D9.1	$5.80x10^4$	$2.43x10^{-3}$	41.7 nM
	21E6.1	$8.28x10^4$	$1.17x10^{-3}$	14.2 nM
	23D5.1	$2.05x10^5$	$1.69x10^{-3}$	8.34 nM

【０２８０】

実施例１１：競合ＥＬＩＳＡ

競合ＥＬＩＳＡを実施するため、ＶＥＧＦＲ１を２μｇ／ｍＬの濃度でＭａｘｉｓｏｒｐ ９６ウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）に一晩４℃で固定化

し、ＰＢＳで３回洗浄し、ＥＬＩＳＡ　Ｂｌｏｃｋバッファー（ＥＢＢ：ＰＢＳＴ中０．２％ＢＳＡ）で、１時間室温にてブロッキングした。濃度０．５ｎＭのヒトＶＥＧＦ－１２１を、５００ｎＭで開始し０．００８ｎＭで終了する１：３段階希釈後の異なる濃度の精製抗ＶＥＧＦＡ　ＤｏｔＢｏｄｙと混合したが、対照は０ｎＭとした。ラニビズマブもまた、３０ｎＭで開始し０．０００５ｎＭで終了する１：３段階希釈を使用して、ヒトＶＥＧＦ－１２１と混合したが、対照は０ｎＭとした。試料を室温で２時間インキュベートし、５０μＬを、ＶＥＧＦＲ１をコーティングしたプレートに移した。２時間インキュベーションした後、プレートをＰＢＳＴで３回洗浄した。５０μＬのストレプトアビジン－ＨＲＰコンジュゲート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）をＥＢＢに１：５，０００希釈で添加し、室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳＴで５回洗浄し、５０μＬの３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質（ＧｅｎｅＴｅｘ社）により展開した。５～１５分後、反応を、５０μＬの２Ｍ　H_2SO_4を添加することにより停止させ、シグナルを４５０ｎｍの吸光度で測定した。

【０２８１】

データは、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ　９ソフトウェアを使用してプロットし、「［阻害剤］ｖｓ．反応－可変勾配（４パラメータ）」非線形回帰曲線を使用してIC_{50}を決定した。

【０２８２】

結果を図４および図５に示す。

図４のデータに基づいて、ヒトＶＥＧＦ－１２１とヒトＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害について様々な分子に関して決定されたIC_{50}値は、以下の通りであった：

１３Ａ６＝５．９μＭ
１６Ａ２．１＝１２．２ｎＭ
１６Ａ６．１＝４１．４ｎＭ
ラニビズマブ＝６．８ｎＭ。

【０２８３】

図５のデータに基づいて、ヒトＶＥＧＦ－１２１とヒトＶＥＧＦＲ１の間の相互作用の阻害について様々な分子に関して決定されたIC_{50}値は、以下の通りであった：

１６Ａ２．１＝３．０ｎＭ
２０Ａ２．１＝１．６ｎＭ
２０Ａ３．１＝０．９ｎＭ
２１Ａ１．１＝０．９ｎＭ
２１Ａ８．１＝１．８ｎＭ
２１Ｄ９．１＝１．０ｎＭ
２１Ｅ６．１＝７．５ｎＭ
２３Ｄ５．１＝１．４ｎＭ
ラニビズマブ＝７．４ｎＭ

実施例１２：熱負荷後のＶＥＧＦＡへの結合分析による熱安定性の評価

ＶＥＧＦＡ結合ＤｏｔＢｏｄｙを、ＢＬＩバッファー中、２５０ｎＭの濃度で、室温、６０℃、７０℃、または８０℃で１時間インキュベートした（熱負荷）。熱負荷後に、試料を１５，０００ｇで５分間遠心分離し、上清を用いて、上記実施例１０に記載したようにして、ＢＬＩによるヒトＶＥＧＦ１６５への結合の特性決定を行った。

【０２８４】

結果を図６に示す。

実施例１３：結論

本発明者らは、ヒトＶＥＧＦＡに特異的に結合し、マウスＶＥＧＦＡと交差反応する、安定化ＶＨドメイン抗体を生成した。

【０２８５】

生成された抗原結合分子のうち、クローン１３Ａ６は、ヒトＶＥＧＦＡに対して３８．９ｎＭ、マウスＶＥＧＦＡに対して２４８ｎＭの親和性を有する。クローン１３Ａ６は、

競合ＥＬＩＳＡによって測定した場合、ＶＥＧＦＡとＶＥＧＦ受容体１（ＶＥＧＦＲ１）の間の相互作用を阻害し、$ＩＣ_{50}$は５．９μＭであった。

【０２８６】

ヒトＶＥＧＦＡおよびマウスＶＥＧＦＡに対する結合親和性をさらに向上させるため、１３Ａ６をファージディスプレイによる親和性成熟に供した。新しいファージディスプレイライブラリーが作製され、このライブラリーでは、各ＣＤＲの位置が１３Ａ６の野生型配列に存在する残基の約５０％、それ以外のアミノ酸の５０％の割合で変異されていた。ヒトＶＥＧＦＡに対する親和性成熟選択は、洗浄回数を増やしながら、ファージ濃度、抗原濃度および結合時間を低下させることにより、ストリンジェンシーのレベルを上げて実施した。この手順により、いくつかの親和性が改善されたＤｏｔＢｏｄｙが同定された。

【０２８７】

これらのうち、クローンの１６Ａ２．１および１６Ａ６．１は、ヒトＶＥＧＦＡに対して、それぞれ２．５ｎＭおよび１４．７ｎＭの親和性を有する。マウスＶＥＧＦＡに対するそれらの親和性は、それぞれ１６．６ｎＭおよび１８．４ｎＭである。ＶＥＧＦＡ－ＶＥＧＦＲ１相互作用を遮断するそれらの能力は有意に改善され、ＩＣ５０は、１６Ａ２．１については１２．２ｎＭ、１６Ａ６．１については４１．４ｎＭと推定された。

【０２８８】

ＶＥＧＦＡに対して生成されたＤｏｔＢｏｄｙのモジュール性を証明するため、クローン１６Ａ２．１を、フレキシブル「（ＧＧＧＧＳ）ｘ６－ＧＧＧＧ」リンカーによって連結された２コピーの１６Ａ２．１配列を含む二価分子として生成した。この分子は、大腸菌内で組換え的に生成することができ、ＶＥＧＦＡに対する親和性は３０１ｐＭと改善されていた。ＶＥＧＦＡはホモ二量体として存在するので（１１）、この結合親和性の改善は、二価の１６Ａ２．１ｘ２分子が両方のＶＥＧＦモノマーに同時に結合している可能性があることを示唆している。

【０２８９】

ＤｏｔＢｏｄｙの１６Ａ２．１および１６Ｃ２．１を、さらなる活性の改善のために選択した。さらに、１６Ａ２．１は、ＣＤＲ３に潜在的なグリコシル化部位（「ＮＳＴ」）を含んでおり、結合を維持しながら除去する必要があった。２つの新しいファージディスプレイライブラリーが作製され、各ＣＤＲ位置は、それぞれ１６Ａ２．１配列および１６Ｃ２．１配列に存在する残基の約５０％で、それ以外のアミノ酸の５０％の割合で変異されていた。１６Ａ２．１については、典型的なＮｘ（Ｔ／Ｓ）Ｎ－グリコシル化モチーフ（式中、「ｘ」はプロリンを除く任意のアミノ酸）中のＡｓｎ（Ｎ）またはＳｅｒ（Ｓ）／Ｔｈｒ（Ｔ）のいずれかを除去する目的で、親和性成熟ライブラリー設計を実施する際に、ＣＤＲ３の「ＮＳＴ」配列が「ＡＳＴ」または「ＮＳＡ」のいずれかに置き換えられた（１２，１３）。ヒトＶＥＧＦＡに対する結合および安定性に基づく選択は、抗原濃度を下げ、洗浄回数を増やしながら、温度を上昇させて熱負荷を加えながら実施して、最も安定で高親和性の抗ＶＥＧＦ　ＤｏｔＢｏｄｙを同定した。熱負荷を伴わない追加の選択を１６Ｃ２．１ベースのライブラリーについて実施した。熱負荷されたライブラリーでは、クローンの２０Ａ２．１、２０Ａ３．１、２１Ａ１．１、２１Ａ８．１、２１Ｄ９．１、２１Ｅ９．１が同定され、一方、熱負荷のない選択では、最もエンリッチな配列としてＤｏｔＢｏｄｙ　２３Ｄ５．１が同定された。重要なことに、ＤｏｔＢｏｄｙの２０Ａ２．１および２０Ａ３．１は、親クローン１６Ａ２．１に存在する潜在的なＮ－グリコシル化部位を含んでいなかった。

【０２９０】

同定されたすべてのＤｏｔＢｏｄｙは、２．８ｎＭ～２０ｎＭの範囲の親和性でヒトＶＥＧＦＡへの結合を保持し、８．３ｎＭ～４６．１ｎＭの範囲の親和性でマウスＶＥＧＦＡへの結合を保持していた。ＶＥＧＦ－ＶＥＧＦＲ相互作用を遮断するそれらの能力を競合ＥＬＩＳＡによって測定したところ、ＩＣ５０は０．９ｎＭ～７．５ｎＭの範囲であった。ラニビズマブを対照として使用した場合、測定されたＩＣ５０は７．４ｎＭであった。親ＤｏｔＢｏｄｙの１６Ａ２．１はＩＣ５０＝３ｎＭを有しており、新たに同定された

ＤｏｔＢｏｄｙの２０Ａ２．１および２０Ａ３．１は、改善された遮断活性を示した（それぞれ、ＩＣ５０＝１．６ｎＭおよびＩＣ５０＝０．９ｎＭ）。以下のＤｏｔＢｏｄｙもまた、高い遮断活性を示した：２１Ａ１．１（ＩＣ５０＝０．９ｎＭ）、２１Ｄ９．１（ＩＣ５０＝１．０ｎＭ）および２３Ｄ５．１（ＩＣ５０＝１．４ｎＭ）。

【０２９１】

熱負荷選択によって同定されたすべてのＤｏｔＢｏｄｙは、室温から８０℃の範囲の温度でインキュベートした後、ＶＥＧＦＡへの結合を保持した。２３Ｄ５．１は、熱負荷を伴わない選択で同定されたが、６０℃以上でその結合活性のほとんどは喪失した。

【０２９２】

結論として、一連の適合したファージディスプレイライブラリー設計および選択戦略によって、本発明者らは、ヒトＶＥＧＦＡとマウスＶＥＧＦＡの両方に結合する、中ナノモル親和性～低ナノモル親和性を持つ広範囲の抗ＶＥＧＦＤｏｔＢｏｄｙを得た。これらのＤｏｔＢｏｄｙは、低マイクロモル～サブナノモルの範囲のＩＣ５０で、ＶＥＧＦ－ＶＥＧＦＲ相互作用を遮断することができる。５種類の強力なブロッカーの１６Ａ２．１、２０Ａ２．１、２０Ａ３．１、および２１Ｄ９．１を含む、同定されたＤｏｔＢｏｄｙの大部分は、高い熱安定性を有し、室温～８０℃の範囲の温度でインキュベートした後もヒトＶＥＧＦＡへの結合を保持する。これらのＤｏｔＢｏｄｙはモジュラーであり、複数のＤｏｔＢｏｄｙをタンデムに連結することによって（例えば、ＤｏｔＢｏｄｙ間にリンカー配列を導入することによって）、多価分子および／または多特異的分子を生成するために使用することができる。

【０２９３】

参考文献

1. Fogli, S., Del Re, M., Rofi, E., Posarelli, C., Figus, M., and Danesi, R. (2018) Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs. Eye (Lond) 32, 1010-1020

2. Osaadon, P., Fagan, X. J., Lifshitz, T., and Levy, J. (2014) A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. Eye (Lond) 28, 510-520

3. Meadows, K. L., and Hurwitz, H. I. (2012) Anti-VEGF therapies in the clinic. Cold Spring Harb Perspect Med 2

4. Williams, K. A., Brereton, H. M., Farrall, A., Standfield, S. D., Taylor, S. D., Kirk, L. A., and Coster, D. J. (2005) Topically applied antibody fragments penetrate into the back of the rabbit eye. Eye (Lond) 19, 910-913

5. Thiel, M. A., Coster, D. J., Standfield, S. D., Brereton, H. M., Mavrangelos, C., Zola, H., Taylor, S., Yusim, A., and Williams, K. A. (2002) Penetration of engineered antibody fragments into the eye. Clin Exp Immunol 128, 67-74

6. Kontermann, R. E. (2012) Dual targeting strategies with bispecific antibodies. mAbs 4, 182-197

7. Brinkmann, U., and Kontermann, R. E. (2017) The making of bispecific antibodies. mAbs 9, 182-212

8. Deshaies, R. J. (2020) Multispecific drugs herald a new era of biopharmaceutical innovation. Nature 580, 329-338

9. Cornvik, T., Dahlroth, S. L., Magnusdottir, A., Herman, M. D., Knaust, R., Ekberg, M., and Nordlund, P. (2005) Colony filtration blot: a new screening method for soluble protein expression in Escherichia coli. Nat Methods 2, 507-509

10. Asial, I., Cheng, Y. X., Engman, H., Dollhopf, M., Wu, B., Nordlund, P., and Cornvik, T. (2013) Engineering protein thermostability using

a generic activity-independent biophysical screen inside the cell. Nature communications 4, 2901
11. Muller, Y. A., Li, B., Christinger, H. W., Wells, J. A., Cunningham, B. C., and de Vos, A. M. (1997) Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 7192-7197
12. Bause, E. (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. Biochem J 209, 331-336
13. Bause, E., and Hettkamp, H. (1979) Primary structural requirements for N-glycosylation of peptides in rat liver. FEBS Lett 108, 341-344
14. Bostrom, J., Lee, C. V., Haber, L., and Fuh, G. (2009) Improving antibody binding affinity and specificity for therapeutic development. Methods Mol Biol 525, 353-376, xiii
15. Bostrom, J., and Fuh, G. (2009) Design and construction of synthetic phage-displayed Fab libraries. Methods Mol Biol 562, 17-35
16. Tonikian, R., Zhang, Y., Boone, C., and Sidhu, S. S. (2007) Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries. Nature protocols 2, 1368-1386

【図面】

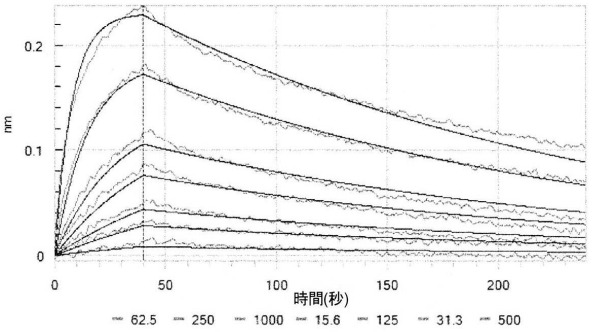
【図１】

	CDR-1																				
トラスツズマブVH	C	A	I	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	I	D	W
鋳型VH	S/C	A	I	S	G	F	S	S	S	S	S	S	I	D	W
ライブラリー1	S	A	I	S	G	F	Xaa	F/L/I/V	Xaa	Xaa	T	Xaa	I	D	W
ライブラリー2	C	A	I	S	G	F	Xaa	F/L/I/V	Xaa	Xaa	T	Xaa	I	D	W

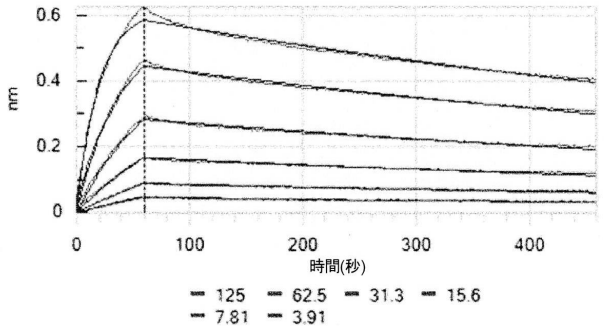
	CDR-2																				
トラスツズマブVH	A	R	I	Y	P	T	N	G	Y	T	R	Y	A	D
鋳型VH	A	R	I	S	P	S	S	G	S	T	S	Y	A	D
ライブラリー1	A	R	I	Xaa	P	Xaa	Xaa	G	Xaa	T	Xaa	Y	A	D
ライブラリー2	A	R	I	Xaa	P	Xaa	Xaa	G	Xaa	T	Xaa	Y	A	D

	CDR-3																				
トラスツズマブVH	C	S	R	W	G	G	D	F	Y	A	M	D
鋳型VH	T/C	G	R	S	S	S	–	–	A	M	D
ライブラリー1	T	G/V	R	Xaa (6~20残基)	A/G	M/F/L/I/V	D

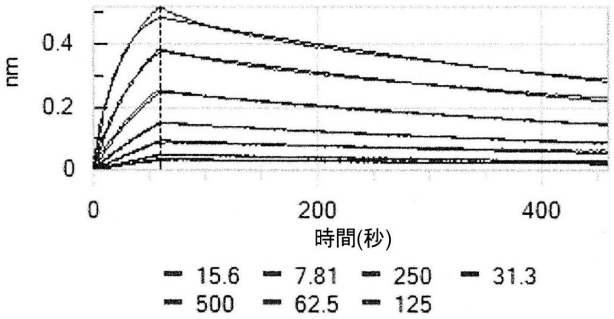
【図２Ａ】



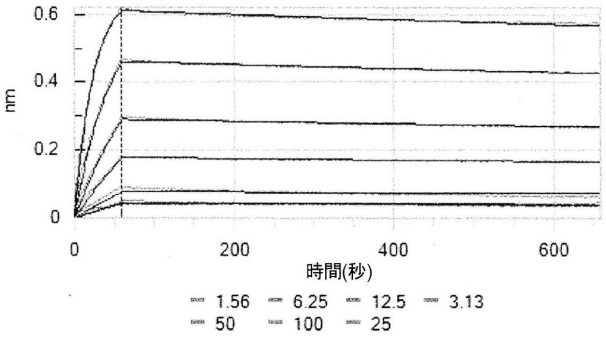
【図２Ｂ】



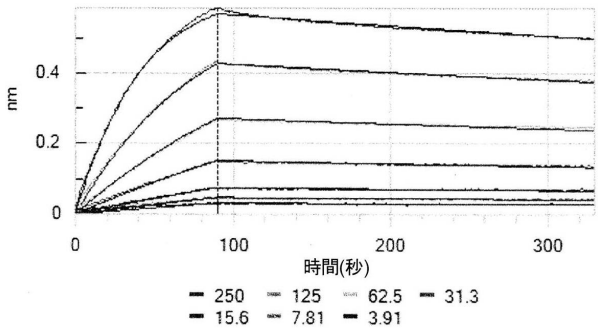
【図２Ｃ】



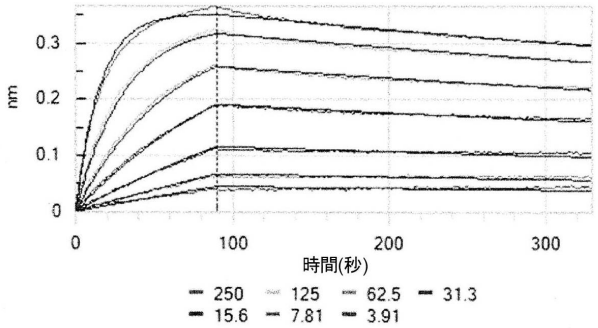
【図２Ｄ】



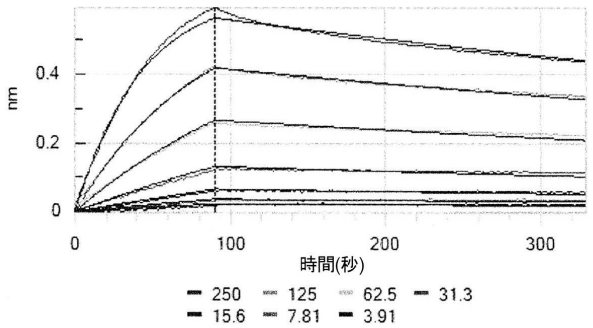
【図２Ｅ】



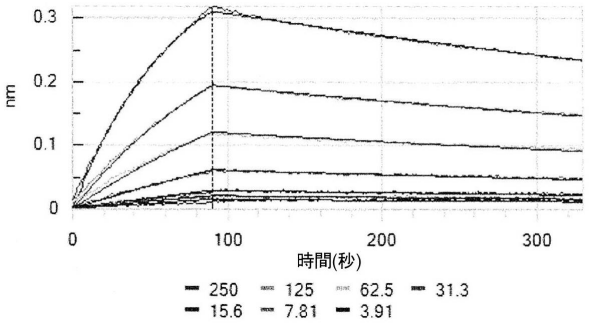
【図２Ｆ】



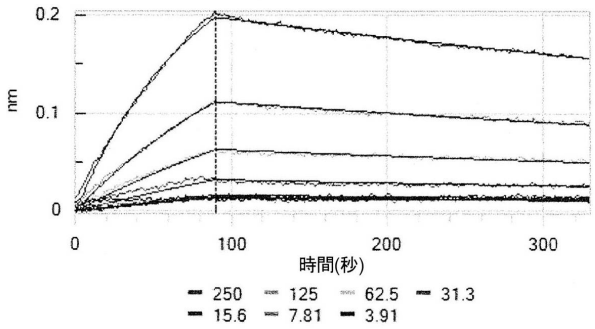
【図２Ｇ】



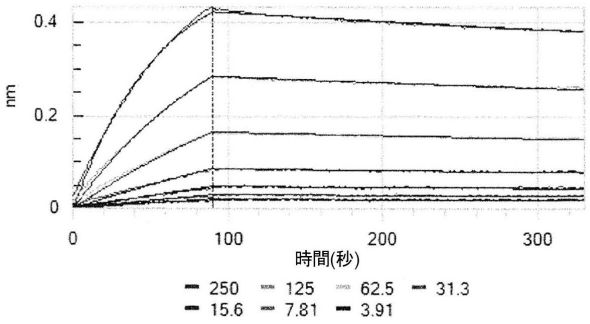
【図２Ｈ】



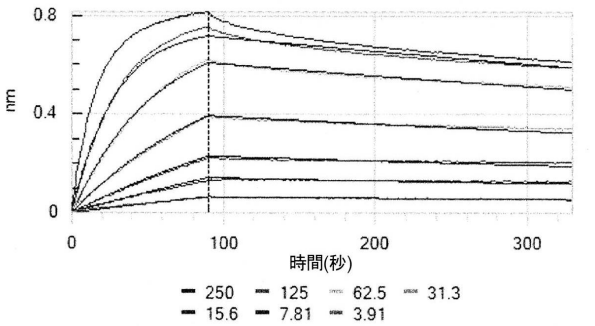
【図２Ｉ】



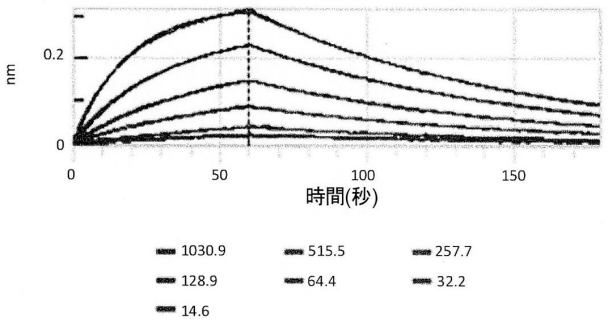
【図２Ｊ】



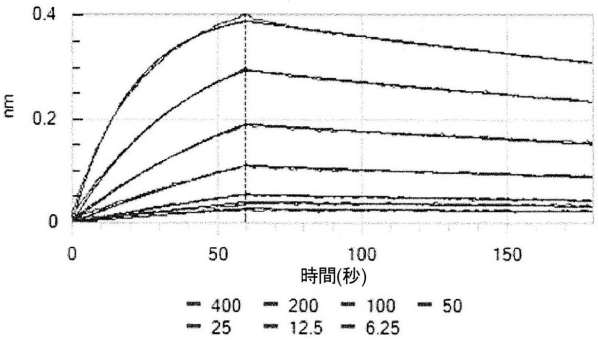
【図２Ｋ】



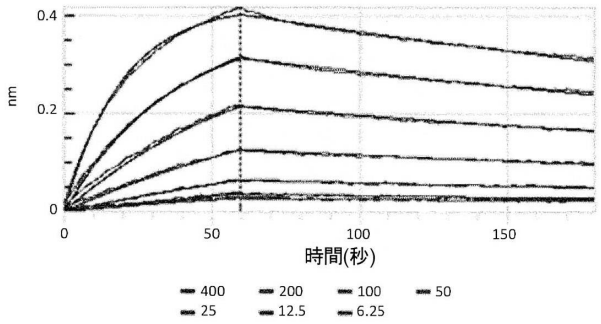
【図３Ａ】



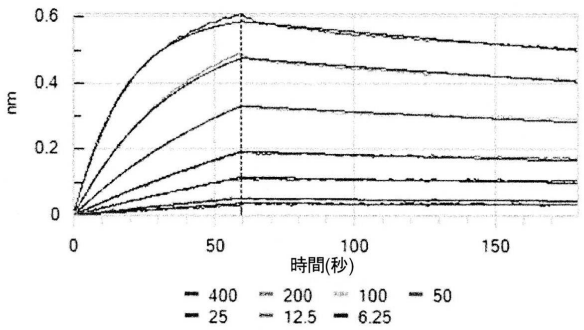
【図３Ｂ】



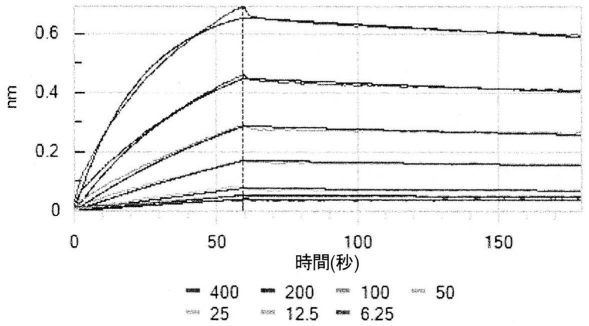
【図３Ｃ】



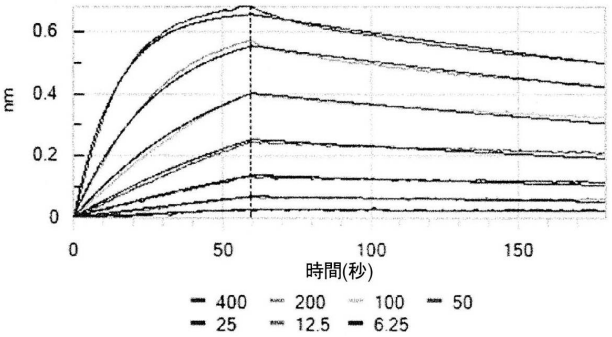
【図３Ｄ】



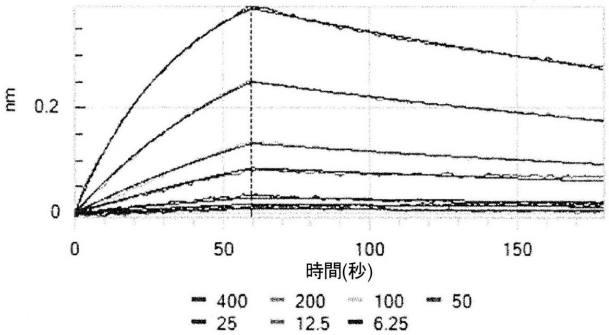
【図３Ｅ】



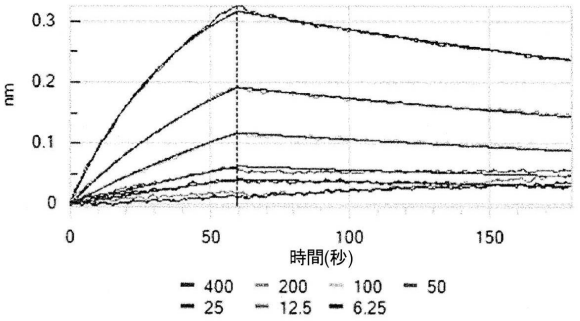
【図３Ｆ】



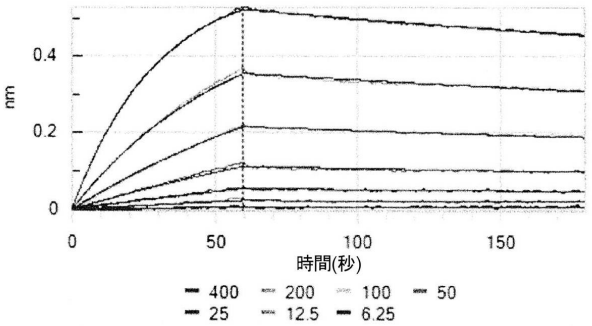
【図３Ｇ】



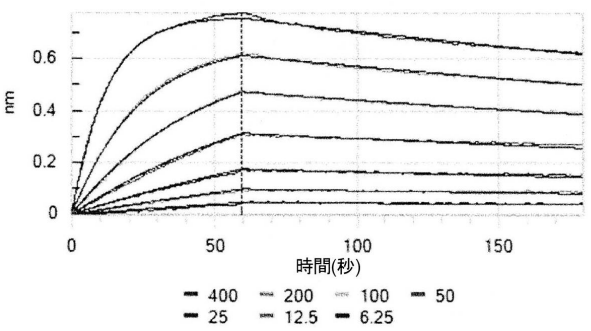
【図３Ｈ】



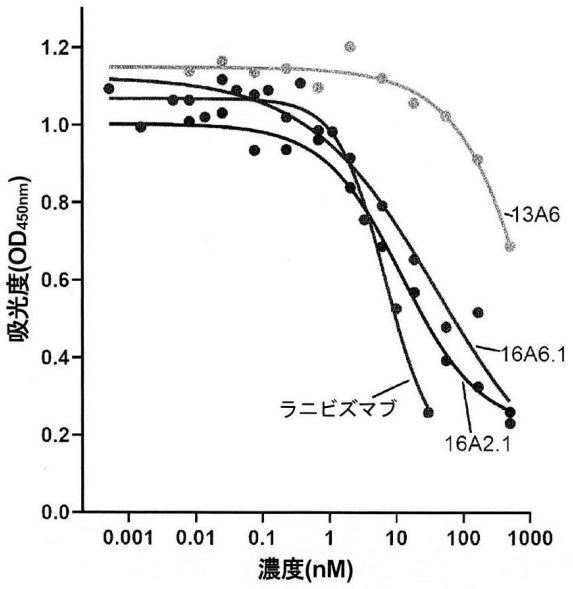
【図３Ｉ】



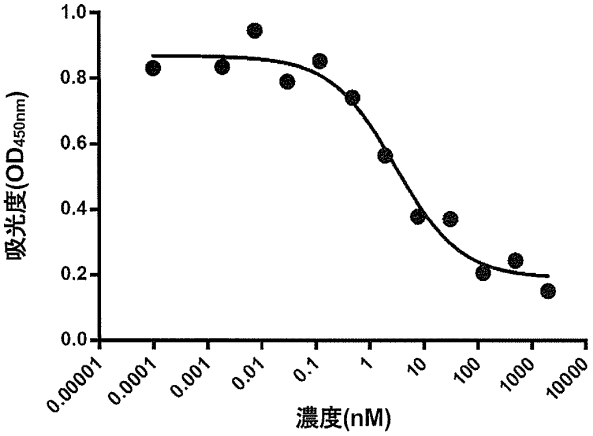
【図３Ｊ】



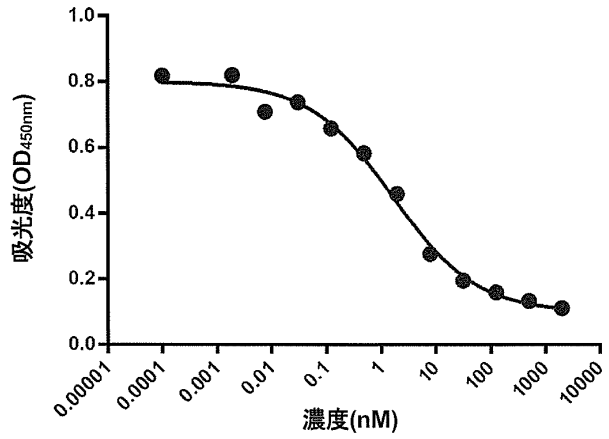
【図４】



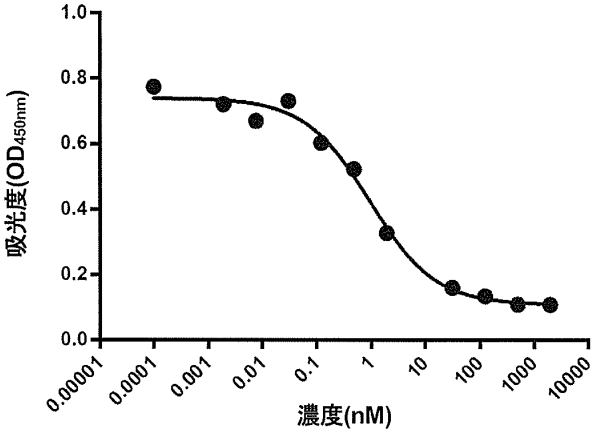
【図５Ａ】



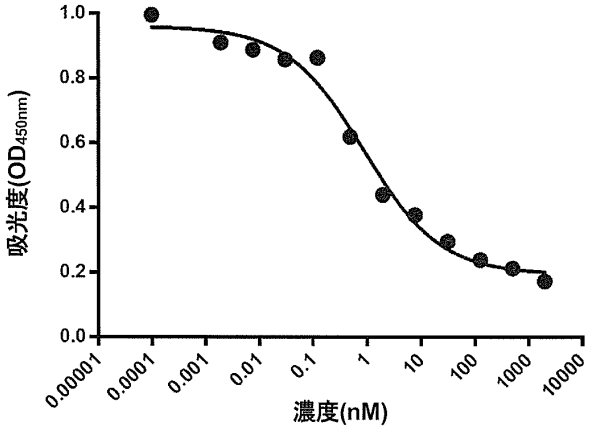
【図５Ｂ】



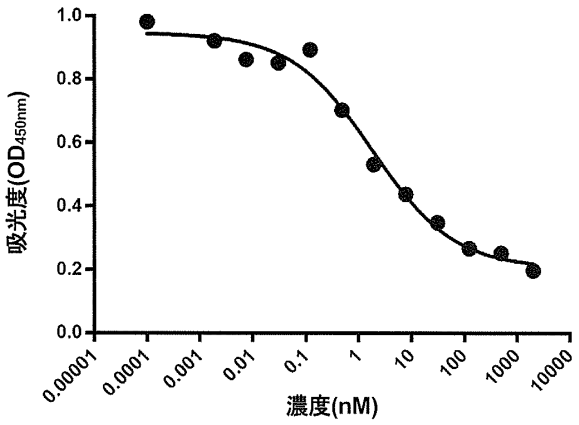
【図５Ｃ】



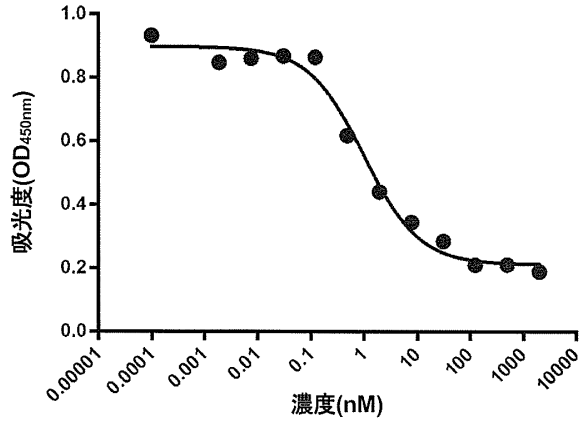
【図５Ｄ】



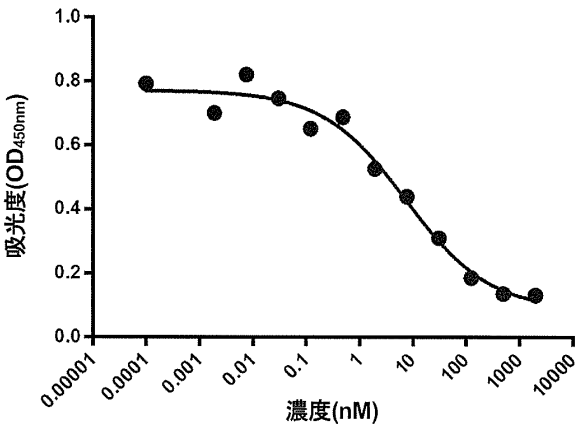
【図５Ｅ】



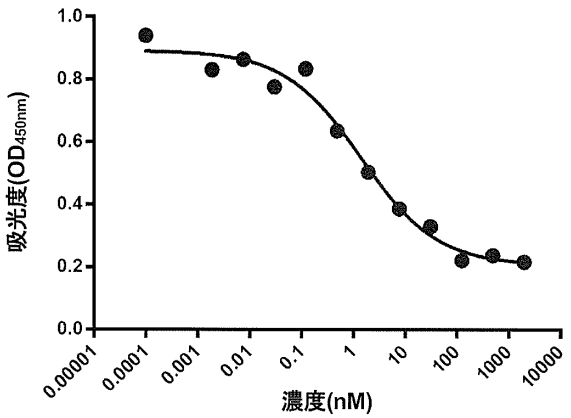
【図５Ｆ】



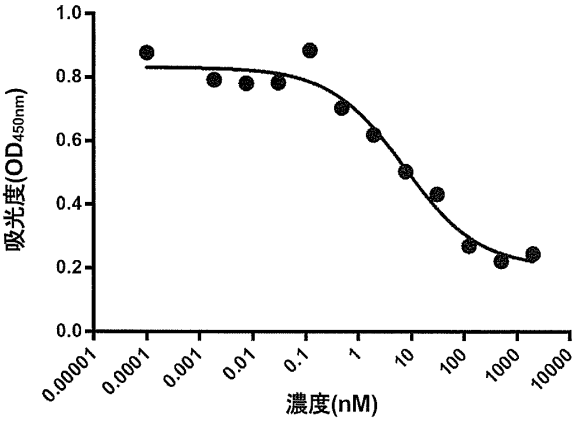
【図５Ｇ】



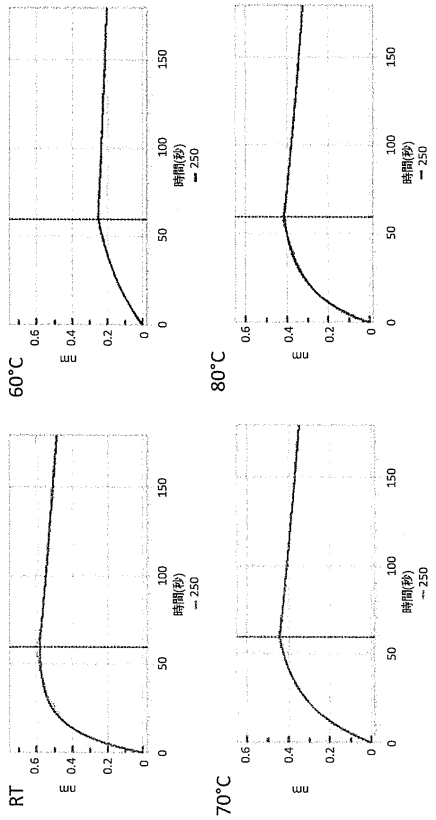
【図５Ｈ】



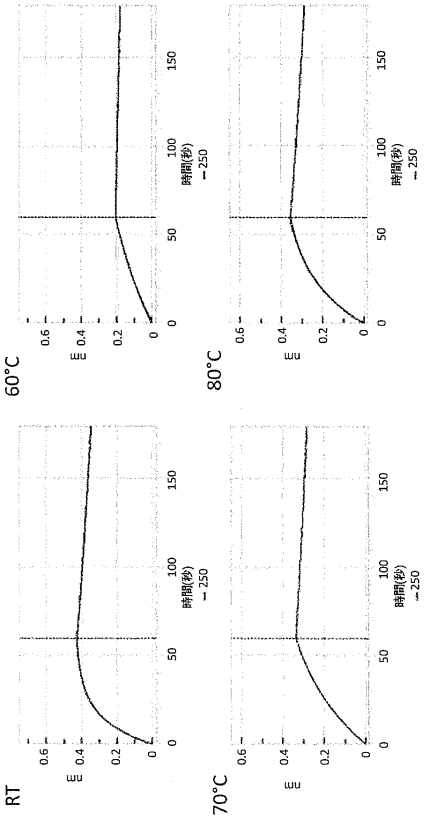
【図５Ｉ】



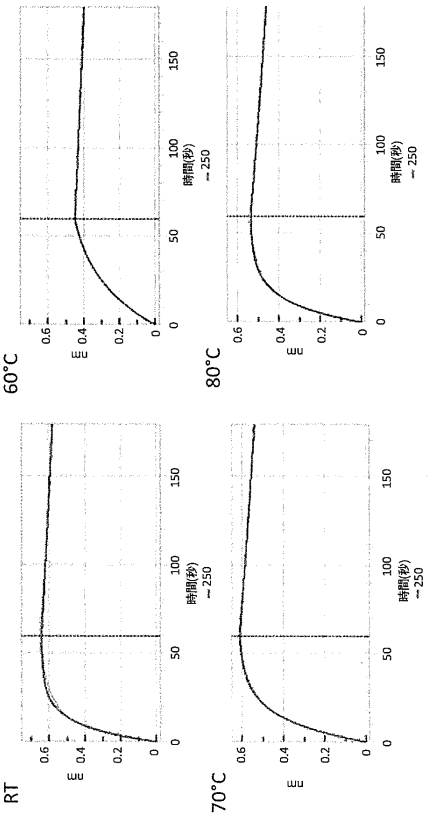
【図６Ａ】



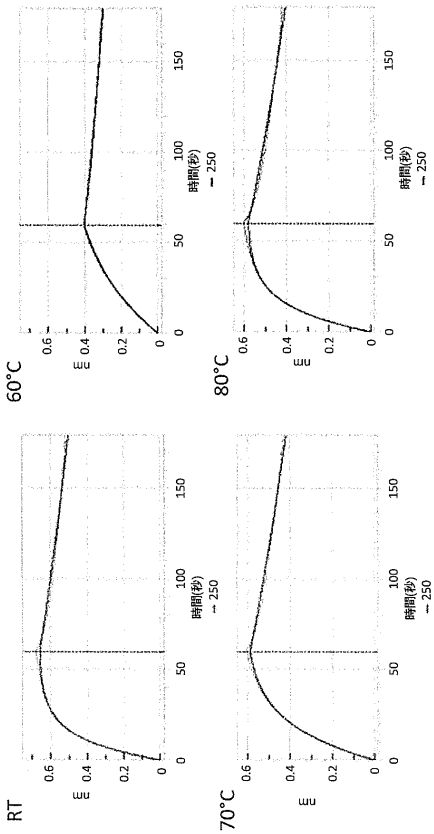
【図６Ｂ】



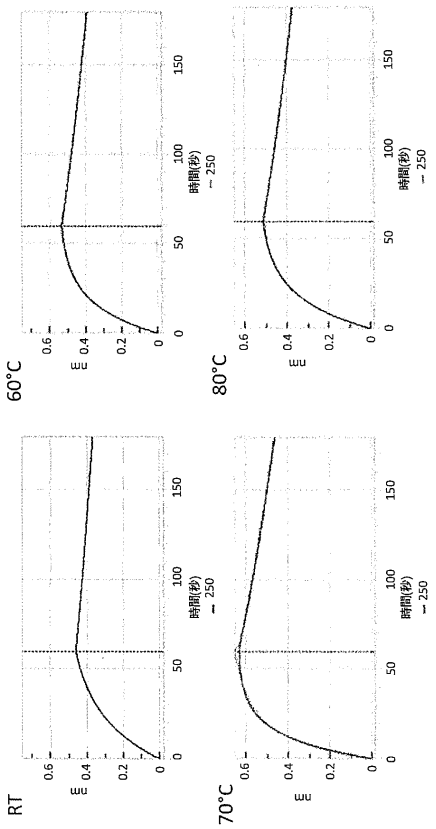
【図６Ｃ】



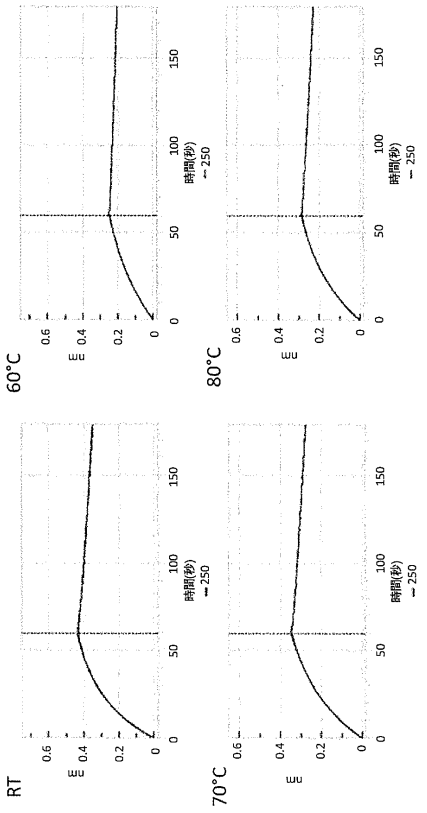
【図６Ｄ】



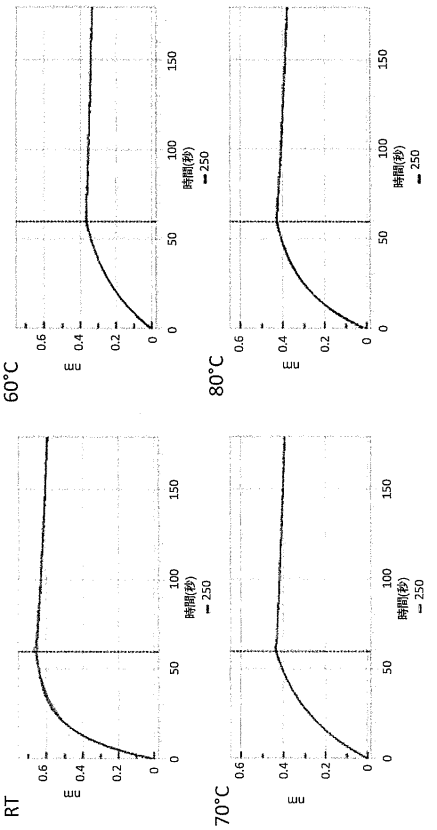
【図６Ｅ】



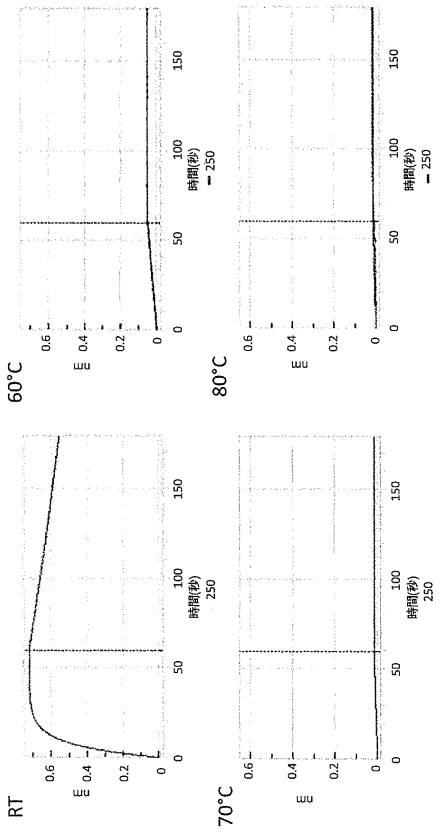
【図６Ｆ】



【図６Ｇ】



【図６Ｈ】



【配列表】
20245136440000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/054137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/22
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAZEMI-LOMEDASHT FATEMEH ET AL: "Inhibition of angiogenesis in human endothelial cell using VEGF specific nanobody", MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 65, no. 1, 30 January 2015 (2015-01-30), pages 58-67, XP029221485, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2015.01.010 the whole document paragraphs [03.6], [03.8] - paragraph [03.9]; table 4 ----- -/--	1-36

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 May 2022	30/05/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Siaterli, Maria

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/054137

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FARAJPOUR ZAHRA ET AL: "A nanobody directed to a functional epitope on VEGF, as a novel strategy for cancer treatment", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 446, no. 1, 22 February 2014 (2014-02-22), pages 132-136, XP028842231, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2014.02.069 the whole document paragraphs [03.3], [03.5] -----	1-36
X	EBRAHIMIZADEH WALEAD ET AL: "Production of Novel VHH Nanobody Inhibiting Angiogenesis by Targeting Binding Site of VEGF", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 176, no. 7, 1 August 2015 (2015-08-01), pages 1985-1995, XP055918955, New York ISSN: 0273-2289, DOI: 10.1007/s12010-015-1695-y Retrieved from the Internet: URL:https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12010-015-1695-y.pdf> the whole document page 1992, paragraph 1; figures 4,5 -----	1-36
X	WO 2012/028716 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; GSCHWIND ANDREAS [AT] ET AL.) 8 March 2012 (2012-03-08) the whole document paragraphs [05.2], [05.6]; example 5; tables 5,6-10,13,14 -----	1-36
X	WO 2013/014208 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; ASHMAN CLAIRE [GB] ET AL.) 31 January 2013 (2013-01-31) the whole document example 16; tables 5,7,12A,6,14,18 -----	1-36
X	WO 2008/149147 A2 (DOMANTIS LTD [GB]; STEWARD MICHAEL [GB] ET AL.) 11 December 2008 (2008-12-11) example 2; table 14 the whole document -----	1-36
X	WO 2008/153237 A1 (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]; YOO JIN SAN [KR] ET AL.) 18 December 2008 (2008-12-18) claims 1-12; figure 7; examples 3,12-15,20-21 -----	1-36

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/054137

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012028716 A1	08-03-2012	AR 082892 A1	16-01-2013
		AU 2011298281 A1	14-03-2013
		BR 112013005151 A2	04-08-2020
		CA 2808696 A1	08-03-2012
		CL 2013000596 A1	14-02-2014
		CN 103209995 A	17-07-2013
		EA 201300311 A1	30-08-2013
		EP 2611830 A1	10-07-2013
		EP 2727939 A2	07-05-2014
		IL 224800 A	31-03-2020
		JP 5979504 B2	24-08-2016
		JP 2013541939 A	21-11-2013
		KR 20130101045 A	12-09-2013
		MX 353813 B	31-01-2018
		NZ 607394 A	24-12-2014
		US 2012225081 A1	06-09-2012
		US 2016200806 A1	14-07-2016
		US 2018201671 A1	19-07-2018
		US 2020308267 A1	01-10-2020
		UY 33588 A	30-03-2012
		WO 2012028716 A1	08-03-2012
WO 2013014208 A2	31-01-2013	AU 2012288846 A1	06-02-2014
		BR 112014001855 A2	21-02-2017
		CA 2842099 A1	31-01-2013
		CL 2014000204 A1	25-07-2014
		CN 103842380 A	04-06-2014
		CO 7020847 A2	11-08-2014
		CR 20140047 A	24-03-2014
		DO P2014000017 A	30-04-2014
		EA 201391812 A1	30-06-2014
		EP 2736925 A2	04-06-2014
		HK 1198446 A1	24-04-2015
		JP 5987057 B2	06-09-2016
		JP 2014523746 A	18-09-2014
		KR 20140041908 A	04-04-2014
		MA 35352 B1	01-08-2014
		PE 20141659 A1	21-11-2014
		US 2014205604 A1	24-07-2014
		US 2017029494 A1	02-02-2017
		WO 2013014208 A2	31-01-2013
WO 2008149147 A2	11-12-2008	AR 066849 A1	16-09-2009
		AU 2008259513 A1	11-12-2008
		BR PI0812398 A2	24-09-2019
		CA 2683801 A1	11-12-2008
		CL 2008001675 A1	21-11-2008
		CN 101679511 A	24-03-2010
		CO 6251320 A2	21-02-2011
		CR 11193 A	28-06-2010
		DO P2009000267 A	28-02-2010
		EA 200901301 A1	30-06-2010
		EP 2158219 A2	03-03-2010
		JP 2010528647 A	26-08-2010
		KR 20100040840 A	21-04-2010
		MA 31437 B1	01-06-2010
		NZ 580530 A	27-04-2012
		PE 20090359 A1	27-04-2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/054137

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/054137

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PE 20130738 A1	28-06-2013
		SG 182170 A1	30-07-2012
		TW 200906853 A	16-02-2009
		UA 102993 C2	10-09-2013
		UA 103749 C2	25-11-2013
		US 2010291103 A1	18-11-2010
		WO 2008149147 A2	11-12-2008
		ZA 200908454 B	23-02-2011
WO 2008153237 A1	18-12-2008	AU 2007354976 A1	18-12-2008
		CA 2691159 A1	18-12-2008
		CN 101802003 A	11-08-2010
		DK 2158217 T3	07-04-2014
		EP 2158217 A1	03-03-2010
		ES 2450933 T3	25-03-2014
		JP 5086430 B2	28-11-2012
		JP 2010529853 A	02-09-2010
		KR 20080109417 A	17-12-2008
		PT 2158217 E	16-04-2014
		US 2011065176 A1	17-03-2011
		US 2014275488 A1	18-09-2014
		US 2014288274 A1	25-09-2014
		WO 2008153237 A1	18-12-2008

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21		4C087
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10		4H045
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08		
C12P 21/02 (2006.01)		C12P	21/02	A	
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00		
C07K 16/22 (2006.01)		C07K	16/22		
C07K 14/705 (2006.01)		C07K	14/705		
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	N	
A61K 31/7088 (2006.01)		A61K	31/7088		
A61K 35/12 (2015.01)		A61K	35/12		
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00		
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00		
A61P 27/02 (2006.01)		A61P	27/02		
A61P 29/00 (2006.01)		A61P	29/00		
A61P 37/06 (2006.01)		A61P	37/06		
A61P 19/02 (2006.01)		A61P	19/02		
A61P 17/06 (2006.01)		A61P	29/00	101	
A61P 25/00 (2006.01)		A61P	17/06		
A61P 31/04 (2006.01)		A61P	25/00		
A61P 21/00 (2006.01)		A61P	31/04		
G01N 33/53 (2006.01)		A61P	21/00		
A61K 38/17 (2006.01)		G01N	33/53	V	
		G01N	33/53	Y	
		A61K	38/17		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

ール，リサーチ・リンク １，ナンバー０５－３０，ケア・オブ・ドットバイオ プライベート リミテッド

Ｆターム（参考）

4B064 AG20 AG27 CA19 CC24

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA02 AA07 AA13 BA02 DA45 NA14 ZA02 ZA22 ZA33 ZA89 ZA96 ZB08 ZB11 ZB15 ZB26 ZB35

4C085 AA13 AA14 BB17 DD62 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA22 ZA33 ZA89 ZA96 ZB08 ZB11 ZB15 ZB26 ZB35

4C087 AA01 AA02 BB63 BB65 CA04 CA12 NA14 ZA02 ZA33 ZA89 ZA96 ZB08 ZB11 ZB15 ZB26 ZB35

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA72 FA74