

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7633397号
(P7633397)

(45)発行日 令和7年2月19日(2025.2.19)

(24)登録日 令和7年2月10日(2025.2.10)

| | | |
|--------------------------|----------------|---|
| (51)国際特許分類 | F I | |
| C 0 7 K 16/46 (2006.01) | C 0 7 K 16/46 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | N |
| A 6 1 P 3/04 (2006.01) | A 6 1 P 3/04 | |
| A 6 1 P 25/14 (2006.01) | A 6 1 P 25/14 | |
| A 6 1 P 25/16 (2006.01) | A 6 1 P 25/16 | |

請求項の数 17 (全158頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-------------------|----------------------------------|----------|---|
| (21)出願番号 | 特願2023-524323(P2023-524323) | (73)特許権者 | 503385923 |
| (86)(22)出願日 | 令和3年10月20日(2021.10.20) | | ベーリンガー インゲルハイム インター ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ シュレンクテル ハフツング |
| (65)公表番号 | 特表2023-546228(P2023-546228 A) | | ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲル ハイム アム ライン ピンガー シュトラ ーセ 1 7 3 |
| (43)公表日 | 令和5年11月1日(2023.11.1) | (74)代理人 | 110001508 |
| (86)国際出願番号 | PCT/EP2021/079010 | | 弁理士法人 津国 |
| (87)国際公開番号 | WO2022/084354 | (72)発明者 | ベンツ, ベーター・ミヒャエル |
| (87)国際公開日 | 令和4年4月28日(2022.4.28) | | ドイツ国、5 5 2 1 6 インゲルハイム ・アム・ライン、ピンガー・シュトラ ーセ 1 7 3、ベーリンガー・インゲルハ イム・インターナショナル・ゲーエムベ ーハー、コーボレイト・パテント |
| 審査請求日 | 令和5年6月20日(2023.6.20) | | 最終頁に続く |
| (31)優先権主張番号 | 20203030.0 | | |
| (32)優先日 | 令和2年10月21日(2020.10.21) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 欧州特許庁(EP) | | |

(54)【発明の名称】 眼の疾患の処置のための二重特異性抗VEGF及び抗TrkB結合分子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

血管内皮増殖因子(VEGF)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、
トロポミオシンレセプターキナーゼB(TrkB)に特異的に結合する少なくとも1つの
抗原結合部位とを含む、二重特異性かつ四価の結合分子であり、

VEGFに特異的に結合する抗原結合部位が、抗原結合部位a)~c)：

a) 配列番号：145(CDR1)、配列番号：146(CDR2)及び配列番号：1
47(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDRを含む抗原結合部位並びに

配列番号：148(CDR1)、配列番号：149(CDR2)及び配列番号：150
(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：151(CDR1)、配列番号：152(CDR2)及び配列番号：153
(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：154(CDR1)、配列番号：155(CDR2)及び配列番号：156
(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位；

b) 配列番号：157(CDR1)、配列番号：158(CDR2)及び配列番号：1
59(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDRを含む抗原結合部位並びに

配列番号：160(CDR1)、配列番号：161(CDR2)及び配列番号：162
(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：163(CDR1)、配列番号：164(CDR2)及び配列番号：165
(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：166 (CDR1)、配列番号：167 (CDR2) 及び配列番号：168 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を含む抗原結合部位；

c) 配列番号：169 (CDR1)、配列番号：170 (CDR2) 及び配列番号：171 (CDR3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR を含む抗原結合部位並びに

配列番号：172 (CDR1)、配列番号：173 (CDR2) 及び配列番号：174 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を含む抗原結合部位又は

配列番号：175 (CDR1)、配列番号：176 (CDR2) 及び配列番号：177 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を含む抗原結合部位又は

配列番号：178 (CDR1)、配列番号：179 (CDR2) 及び配列番号：180 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を含む抗原結合部位

からなる群より選択され、

TrkB に特異的に結合する抗原結合部位が、

a) 配列番号：201 (CDR1)、配列番号：202 (CDR2) 及び配列番号：203 (CDR3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR を含む抗原結合部位並びに

配列番号：204 (CDR1)、配列番号：205 (CDR2) 及び配列番号：206 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を含む抗原結合部位又は

配列番号：207 (CDR1)、配列番号：208 (CDR2) 及び配列番号：209 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を含む抗原結合部位又は

配列番号：210 (CDR1)、配列番号：211 (CDR2) 及び配列番号：212 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を含む抗原結合部位

から選択され、

前記結合分子が、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141又は143のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142又は144のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む、結合分子。

【請求項2】

血管内皮増殖因子 (VEGF) に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼ B (TrkB) に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含む、二重特異性かつ四価の結合分子であり、

(i) 配列番号：41のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：42のアミノ酸配列を含む重鎖又は (ii) 配列番号：43のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：44のアミノ酸配列を含む重鎖又は (iii) 配列番号：45のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：46のアミノ酸配列を含む重鎖又は (iv) 配列番号：47のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：48のアミノ酸配列を含む重鎖又は (v) 配列番号：49のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を含む重鎖又は (vi) 配列番号：51のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：52のアミノ酸配列を含む重鎖又は (vii) 配列番号：53のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：54のアミノ酸配列を含む重鎖又は (viii) 配列番号：55のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：56のアミノ酸配列を含む重鎖又は (ix) 配列番号：57のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号

10

20

30

40

50

び配列番号：140のアミノ酸配列を含む重鎖又は(1i)配列番号：141のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：142のアミノ酸配列を含む重鎖又は(1ii)配列番号：143のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：144のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、
結合分子。

【請求項3】

請求項1又は2記載の結合分子の(i)重鎖もしくは重鎖可変ドメイン及び/又は(iii)軽鎖もしくは軽鎖可変ドメインをコードする、
単離された核酸分子。

【請求項4】

請求項3記載の単離された核酸分子を含む、
ウイルスベクター。

【請求項5】

請求項3記載の核酸分子を含む、
発現ベクター。

【請求項6】

請求項5記載の発現ベクターでトランスフェクションされた、
宿主細胞。

【請求項7】

(a)以下の分子の発現を可能にする条件下で、請求項6記載の宿主細胞を培養することと、

(b)該分子を回収することを含む、

請求項1又は2記載の結合分子を製造する方法。

【請求項8】

医薬に使用するための、請求項1又は2記載の結合分子。

【請求項9】

該使用が、眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患の処置である、請求項8記載の使用のための結合分子。

【請求項10】

該使用が、神経/神経眼又は網膜の疾患の処置のためのものである、請求項9記載の使用のための結合分子。

【請求項11】

該使用が、黄斑変性症、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、網膜色素変性症、遺伝性網膜ジストロフィー、遺伝性黄斑ジストロフィー、近視性変性症、地図状萎縮症、網膜動脈閉塞症、眼内炎、ブドウ膜炎、嚢胞様黄斑浮腫、任意の網膜疾患に続発する脈絡膜新生血管膜、視神経症、緑内障、網膜剥離、中毒性網膜症、放射線網膜症並びに外傷性網膜症、前駆型及び軽度から中等度のアルツハイマー病、アルツハイマー病を有する患者の疾患進行の遅延、ハンチントン病、パーキンソン病、大うつ病性障害、統合失調症、統合失調症に関連する認知障害の処置、減弱精神病症候群を有する個体における初発精神病の予防、統合失調症を有する患者における再発の予防、処置抵抗性うつ病、過食症、肥満又はメタボリックシンドロームの処置のためのものである、請求項9記載の使用のための結合分子。

【請求項12】

該使用が、滲出性加齢黄斑変性症(wAMD)の処置のためのものである、請求項9記載の使用のための結合分子。

【請求項13】

該使用が、網膜静脈閉塞症(RVO)の処置のためのものである、請求項9記載の使用のための結合分子。

【請求項14】

該使用が、地図状萎縮の治療及び/又は予防のためのものである、請求項9記載の使用

10

20

30

40

50

のための結合分子。

【請求項 15】

薬学的に許容し得る担体と、請求項 1 又は 2 記載の結合分子とを含む、医薬組成物。

【請求項 16】

眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患を治療し又は予防するための医薬組成物を製造するための、請求項 1 又は 2 記載の結合分子の使用。

【請求項 17】

眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患を治療し又は予防する方法に使用するための、請求項 1 又は 2 記載の結合分子。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、血管内皮増殖因子 (VEGF) 及びトロポミオシンレセプターキナーゼ B (TrkB) に結合する結合分子並びに医薬におけるその使用、それを含む医薬組成物並びに眼の疾患の治療及び / 又は予防のための薬剤としてそれを使用する方法に関する。

【0002】

発明の背景

黄斑変性症、特に、加齢黄斑変性症 (AMD) は、先進諸国における失明の主な原因である。その進行期は、滲出性新生血管 AMD と萎縮型地図状萎縮 (GA) とに分けられる。wAMD は、眼の新生血管形成及び血管漏出の増加並びに進行性神経変性及び光レセプター喪失を特徴とする。抗 VEGF 処置は、この疾患のための現在の標準治療である。治療は、典型的には、VEGF をターゲットとする薬剤 (Avastin、Lucentis、Eylea 及び近年は、Beovu) からなり、これらは、眼の後部に注射により投与される。

20

【0003】

VEGF 捕捉により、血管漏出が低減し、それにより、最初は視力が改善されるが、網膜は、損なわれた状態のままであり、更なる細胞喪失をもたらす。過去 10 年間、wAMD に対しては、硝子体内抗 VEGF による画期的な処置が行われてきたが、最終的に失明にいたる緩徐進行性疾患である地図状萎縮に対しては処置の選択肢が存在しない。

30

【0004】

wAMD 診断後 2 年以内に、抗 VEGF 処置が成功したにもかかわらず、患者のほぼ 3 分の 1 が、進行性地図状萎縮を発症する。進行性視覚障害に関連するのは後期段階である。患者は、視力と自立性とを失うことになる。彼らの日常生活は、運転、読書、テレビの視聴、顔の認識ができないことにより深刻な影響を受ける。wAMD 患者は、多くの場合、現実の環境において処置を受けておらず、頻繁な硝子体内注射のために医院に戻る必要がある。

【0005】

現在、wAMD 中に発症した地理状萎縮を含む、あらゆるタイプの地理状萎縮に利用可能な処置は存在しない。さらに、より頻繁な抗 VEGF 処置が、より高い割合の地理状萎縮発症に関連する場合があるという幾つかの証拠が存在する。

40

【0006】

したがって、抗 VEGF 処置において頻繁に使用することができ、一方で同時に、同時進行する地理状萎縮発症のリスクを軽減する、新規な治療用生物学的分子を提供するための、満たされていない高い必要性が存在する。

【0007】

発明の概要

本発明は、単一の結合分子内で、血管内皮増殖因子 (VEGF) に特異的に結合する抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼ B (TrkB) に特異的に結合する抗原結合部位とを組み合わせるといった概念に基づいている。

50

【 0 0 0 8 】

第1の態様では、本発明は、血管内皮増殖因子（VEGF）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB（TrkB）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含む、結合分子に関する。第1の態様に関する一実施態様では、結合分子は、二重特異性かつ四価である。第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、VEGFに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、免疫グロブリン（Ig）分子である。第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、TrkBに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、Ig分子の重鎖のC末端に融合している。第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、TrkBに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、1つ以上のscFvを含む。第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、VEGFに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、免疫グロブリン（Ig）分子であり、TrkBに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位が、1つ以上のscFvを含む。関連する実施態様では、1つ以上のscFvは、N末端からC末端へのVL-VH配向を有する。さらに別の関連する実施態様では、1つ以上のscFvは、Ig分子の重鎖のC末端に融合している。第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、Ig分子は、モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、(scFv)₂又は抗体のフラグメント、例えば、F(ab')₂フラグメントである。第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、Ig分子は、IgG又はF(ab')₂である。第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する別の更なる実施態様では、1つ以上のscFvは、ペプチドリンカー、好ましくは、約4～20個のアミノ酸の長さを有するペプチドリンカーによりIg分子に融合している。

10

20

【 0 0 0 9 】

第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、

a) 配列番号：201（CDR1）、配列番号：202（CDR2）及び配列番号：203（CDR3）のアミノ酸配列を含む軽鎖CDRを含む抗原結合部位並びに

配列番号：204（CDR1）、配列番号：205（CDR2）及び配列番号：206（CDR3）のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：207（CDR1）、配列番号：208（CDR2）及び配列番号：209（CDR3）のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：210（CDR1）、配列番号：211（CDR2）及び配列番号：212（CDR3）のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位

から選択される。

30

【 0 0 1 0 】

第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、

a) 配列番号：213又は215のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号：214又は216のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインとを含む抗原結合部位から選択される。

40

【 0 0 1 1 】

第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、結合分子は、配列番号：222のアミノ酸配列又は配列番号：223のアミノ酸配列又は配列

50

番号：224のアミノ酸配列又は配列番号：225のアミノ酸配列を含む。

【0012】

第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、抗原結合部位a)~c)：

a) 配列番号：145(CDR1)、配列番号：146(CDR2)及び配列番号：147(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDRを含む抗原結合部位並びに

配列番号：148(CDR1)、配列番号：149(CDR2)及び配列番号：150(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：151(CDR1)、配列番号：152(CDR2)及び配列番号：153(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：154(CDR1)、配列番号：155(CDR2)及び配列番号：156(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位；

b) 配列番号：157(CDR1)、配列番号：158(CDR2)及び配列番号：159(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDRを含む抗原結合部位並びに

配列番号：160(CDR1)、配列番号：161(CDR2)及び配列番号：162(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：163(CDR1)、配列番号：164(CDR2)及び配列番号：165(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：166(CDR1)、配列番号：167(CDR2)及び配列番号：168(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位；

c) 配列番号：169(CDR1)、配列番号：170(CDR2)及び配列番号：171(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDRを含む抗原結合部位並びに

配列番号：172(CDR1)、配列番号：173(CDR2)及び配列番号：174(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：175(CDR1)、配列番号：176(CDR2)及び配列番号：177(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位又は

配列番号：178(CDR1)、配列番号：179(CDR2)及び配列番号：180(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む抗原結合部位

からなる群より選択される。

【0013】

第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、抗原結合部位a)~d)：

a) 配列番号：181のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号：182のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインとを含む抗原結合部位；

b) 配列番号：183のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号：184のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインとを含む抗原結合部位；

c) 配列番号：189のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号：190、191、192又は194のアミノ酸配列と

10

20

30

40

50

少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインとを含む抗原結合部位；

d) 配列番号：193のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号：190、191、192又は194のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインとを含む抗原結合部位からなる群より選択される。

10

【0014】

第1の態様又はその実施態様のいずれかの結合分子に関する更なる実施態様では、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、抗原結合部位a)~d)：

a) 配列番号：185のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号：186のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗原結合部位；

20

b) 配列番号：187のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号：188のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗原結合部位；

c) 配列番号：195のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号：196、197、198又は200のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗原結合部位；

30

d) 配列番号：199のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号：196、197、198又は200のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗原結合部位からなる群より選択される。

40

【0015】

第2の態様では、本発明は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、

50

139、141又は143のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142又は144のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む、結合分子に関する。

【0016】

第3の態様では、本発明は、(i)配列番号：41のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：42のアミノ酸配列を含む重鎖又は(ii)配列番号：43のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：44のアミノ酸配列を含む重鎖又は(iii)配列番号：45のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：46のアミノ酸配列を含む重鎖又は(iv)配列番号：47のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：48のアミノ酸配列を含む重鎖又は(v)配列番号：49のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を含む重鎖又は(vi)配列番号：51のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：52のアミノ酸配列を含む重鎖又は(vii)配列番号：53のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：54のアミノ酸配列を含む重鎖又は(viii)配列番号：55のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：56のアミノ酸配列を含む重鎖又は(ix)配列番号：57のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：58のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x)配列番号：59のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：60のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xi)配列番号：61のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：62のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xii)配列番号：63のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：64のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xiii)配列番号：65のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：66のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xiv)配列番号：67のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：68のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xv)配列番号：69のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：70のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xvi)配列番号：71のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：72のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xvii)配列番号：73のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：74のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xviii)配列番号：75のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：76のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xix)配列番号：77のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：78のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xx)配列番号：79のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：80のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxi)配列番号：81のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：82のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxii)配列番号：83のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：84のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxiii)配列番号：85のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：86のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxiv)配列番号：87のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：88のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxv)配列番号：89のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：90のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxvi)配列番号：91のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：92のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxvii)配列番号：93のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：94のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxviii)配列番号：95のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：96のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxix)配列番号：97のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：98のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxx)配列番号：99のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：100のアミノ酸配列を含む重鎖又は(xxxi)配列番号：1

10

20

30

40

50

01のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：102のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x x x i i)配列番号：103のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：104のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x x x i i i)配列番号：105のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：106のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x x x i v)配列番号：107のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：108のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x x x v)配列番号：109のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：110のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x x x v i)配列番号：111のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：112のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x x x v i i)配列番号：113のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：114のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x x x v i i i)配列番号：115のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：116のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x x x i x)配列番号：117のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：118のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l)配列番号：119のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：120のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l i)配列番号：121のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：122のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l i i)配列番号：123のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：124のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l i i i)配列番号：125のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：126のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l i v)配列番号：127のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：128のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l v)配列番号：129のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：130のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l v i)配列番号：131のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：132のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l v i i)配列番号：133のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：134のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l v i i i)配列番号：135のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：136のアミノ酸配列を含む重鎖又は(x l i x)配列番号：137のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：138のアミノ酸配列を含む重鎖又は(l)配列番号：139のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：140のアミノ酸配列を含む重鎖又は(l i)配列番号：141のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：142のアミノ酸配列を含む重鎖又は(l i i)配列番号：143のアミノ酸配列を含む軽鎖及び配列番号：144のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、結合分子に関する。

10

20

【0017】

第4の態様では、本発明は、2つのs c F vを含むか又はそれからなり、ここで、各s c F vがT r k Bに特異的に結合する、T r k B結合分子に関する。

30

【0018】

第4の態様に関する更なる実施態様では、T r k B結合分子は、I g分子をさらに含む。

【0019】

第4の態様又はその実施態様のいずれかに関する更なる実施態様では、I g分子は、モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、抗体のフラグメント、例えば、F v、F a b、F a b'もしくはF(a b')2フラグメント、一本鎖抗体、例えば、一本鎖可変フラグメント(s c F v)、小モデュラー免疫薬(S M I P)、ドメイン抗体、ナノボディ又はダイアボディである。

40

【0020】

第4の態様又はその実施態様のいずれかに関する更なる実施態様では、各s c F vは、I g分子の重鎖のC末端に融合している。第4の態様又はその実施態様のいずれかに関する更なる実施態様では、I g分子は、I g G、F(a b)又はF(a b')2である。第4の態様又はその実施態様のいずれかに関する更なる実施態様では、I g分子は、F c領域を含むか又はそれからなる。第4の態様又はその実施態様のいずれかに関する更なる実施態様では、T r k B結合分子は、二重特異性かつ四価である。

【0021】

第5の態様では、本発明は、(i)配列番号：213のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号：214のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン又は(i i)配列番

50

号：215のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号：216のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、TrkBに特異的に結合するscFvに関する。

【0022】

第5の態様に関する更なる実施態様では、scFvは、配列番号：222のアミノ酸配列又は配列番号：223のアミノ酸配列又は配列番号：224のアミノ酸配列又は配列番号：225のアミノ酸配列を含む。

【0023】

第6の態様では、本発明は、

(i) 配列番号：189のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号：191のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン又は配列番号：192のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン又は配列番号：194のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン

(ii) 配列番号：190のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び配列番号：192のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン又は配列番号：193のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

を含む、VEGFに特異的に結合する抗体分子に関する。

【0024】

第6の態様に関する更なる実施態様では、抗体分子は、配列番号：195又は199のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号：196、197、198又は200のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。

【0025】

第7の態様では、本発明は、前述の態様及び実施態様のいずれか1つの結合分子の(i)重鎖もしくは重鎖可変ドメイン及び/又は(ii)軽鎖もしくは軽鎖可変ドメインをコードする、単離された核酸分子に関する。

【0026】

第8の態様では、本発明は、前述の態様及び実施態様のいずれか1つのTrkB結合分子の(i)重鎖もしくは重鎖可変ドメイン及び/又は(ii)軽鎖もしくは軽鎖可変ドメインをコードする、単離された核酸分子に関する。

【0027】

第9の態様では、本発明は、前述の態様及び実施態様のいずれか1つのscFvの(i)重鎖可変ドメイン及び/又は(ii)軽鎖可変ドメインをコードする、単離された核酸分子に関する。

【0028】

第10の態様では、本発明は、前述の態様及び実施態様のいずれか1つの抗体分子の(i)重鎖もしくは重鎖可変ドメイン及び/又は(ii)軽鎖もしくは軽鎖可変ドメインをコードする、単離された核酸分子に関する。

【0029】

第11の態様では、本発明は、第7、第8、第9又は第10の態様の単離された核酸分子を含む、ウイルスベクターに関する。

【0030】

第12の態様では、本発明は、第11の態様の核酸分子を含む、発現ベクターに関する。

【0031】

第13の態様では、本発明は、第12の態様の発現ベクターでトランスフェクションされた、宿主細胞に関する。

【0032】

第14の態様では、本発明は、

(a) 以下の分子の発現を可能にする条件下で、第13の態様の宿主細胞を培養することと、

(b) 該分子を回収することと、場合により、

(c) 該分子をさらに精製しかつ/又は修飾しかつ/又は製剤化することとを含む、

10

20

30

40

50

前述の態様及び実施態様のいずれかの結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子を製造する方法に関する。

【0033】

第15の態様では、本発明は、医薬に使用するための、前述の態様及び実施態様のいずれかの結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子に関する。

【0034】

第15の態様に関する実施態様では、本発明は、該使用が眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患の処置である、第15の態様の使用のための、結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子に関する。

【0035】

第15の態様に関する更なる実施態様では、本発明は、該使用が神経/神経眼又は網膜の疾患の処置のためのものである、第15の態様の使用のための、結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子に関する。

【0036】

第15の態様に関する別の実施態様では、本発明は、該使用が黄斑変性症、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、網膜色素変性症、遺伝性網膜ジストロフィー、遺伝性黄斑ジストロフィー、近視性変性症、地図状萎縮症、網膜動脈閉塞症、眼内炎、ブドウ膜炎、嚢胞様黄斑浮腫、任意の網膜疾患に続発する脈絡膜新生血管膜、視神経症、緑内障、網膜剥離、中毒性網膜症、放射線網膜症並びに外傷性網膜症、前駆型及び軽度から中等度のアルツハイマー病、アルツハイマー病を有する患者の疾患進行の遅延、ハンチントン病、パーキンソン病、大うつ病性障害、統合失調症、統合失調症に関連する認知障害の処置、減弱精神病症候群を有する個体における初発精神病の予防、統合失調症を有する患者における再発の予防、処置抵抗性うつ病、過食症、肥満又はメタボリックシンドロームの処置のためのものである、第15の態様の使用のための、結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子に関する。

【0037】

第15の態様に関する実施態様では、本発明は、該使用が黄斑変性症、特に、滲出性加齢黄斑変性症(w A M D)の処置のためのものである、第15の態様の使用のための、結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子に関する。

【0038】

第15の態様に関する実施態様では、本発明は、該使用が網膜静脈閉塞症(R V O)の処置のためのものである、第15の態様の使用のための、結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子に関する。

【0039】

第15の態様に関する実施態様では、本発明は、該使用が地図状萎縮の治療及び/又は予防のためのものである、第15の態様の使用のための、結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子に関する。

【0040】

第16の態様では、本発明は、薬学的に許容し得る担体と、前述の態様及び実施態様のいずれかの結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子とを含む、医薬組成物に関する。

【0041】

第17の態様では、本発明は、眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患を治療し又は予防する方法であって、治療上有効量の、前述の態様及び実施態様のいずれかの結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子を、それを必要とする患者に投与することを含む、方法に関する。

【0042】

第18の態様では、本発明は、眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患を治療し又は予防するための医薬組成物を製造するための、前述の態様及び実施態様のいずれかの結合分子、T r k B 結合分子、s c F v 又は抗体分子の使用に関する。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】図1：シリーズ1～シリーズ4の単一のVEGF-TrkB結合分子の設計の図。

【図2A-B】図2A～図2B：(A)TrkBリン酸化(Y706/707)又は(B)ERK1/2リン酸化(T202/Y204-ERK1)(T185/Y187-ERK2)を上昇する濃度の示された分子とインキュベーションした後に、ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。データは、平均+/-SEMを表わす。

【図3A-D】図3A～図3D：TrkBリン酸化(Y706/707)を上昇する濃度の示された分子とインキュベーションした後に、(A)カニクイザルTrkB、(B)ウサギTrkB、(C)ラットTrkB又は(D)マウスTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。データは、平均+/-SEMを表わす。

10

【図4A-C】図4A～図4C：Trkリン酸化(Y706/707)を上昇する濃度の示された分子とインキュベーションした後に、(A)ヒトTrkA、(B)ヒトTrkB、又は(C)ヒトTrkCを安定に発現するCHO細胞において測定した。TrkAについての天然のリガンドであるNGF、TrkBについてのBDNF及びTrkCについてのNT-3を対照として使用した。データは、平均+/-SEMを表わす。

【図5A-B】図5A～図5B：(A)ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を示された濃度の天然TrkBリガンドBDNF(ダブリケート)、示された濃度のアゴニスト性TrkB抗体C2を伴う1nMBDNF(トリプリケート)又は示された濃度のDoppelmaab TPP-11736を伴う1nMBDNF(トリプリケート)と共にインキュベーションした。(B)TrkBの内部移行を表面TrkBレセプターの免疫蛍光染色、続けて、共焦点顕微鏡分析により評価した。ヒートマップの暗視野及び明視野はそれぞれ、蛍光閾値を上回る細胞の割合の高低を表わす。

20

【図6】図6：200ng/mLヒトVEGF-Aのプレインキュベーションの有無で、ERK1/2リン酸化(T202/Y204-ERK1)(T185/Y187-ERK2)を上昇する濃度の示された分子とインキュベーションした後に、ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。VEGF-Aのみとのインキュベーションを対照とした。データは、平均を表わす。明確にするために、エラーバーを省略する。

【図7】図7：糖尿病誘発網膜神経変性のラットモデルにおけるTrkB活性化の神経保護機能。動物をSTZで処置して、高血糖を誘発した。ついで、網膜機能をアゴニスト性TrkB抗体C2又はDoppelmaab TPP-11736の硝子体内適用の直前及び2週間後に、網膜電図(ERG)及び桿体駆動B波暗示時間遅延により評価した。平均+/-SEM; $n \cdot s \cdot p > 0.05$ 、有意差なし; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$; テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。抗TNFをアイソタイプ対照抗体とした。

30

【図8A-B】図8A～図8B：VEGF-Aの捕捉を、VEGFレセプター2リン酸化(Y1175-VEGFR2)を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。(A)Doppelmaab TPP-11735、-736、-737及び-738の比較。(B)TPP-11736及びTPP-11738とEyleaとの比較。非刺激細胞(ベース)及び抗体処理を伴わない50ng/mLヒトVEGFを対照とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

40

【図9A-B】図9A～図9B：VEGF-Aの捕捉をERK1/2リン酸化(T202/Y204-ERK1)(T185/Y187-ERK2)により評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。(A)Doppelmaab TPP-11735、-736、-737及び-738の比較。(B)TPP-11736、-738とEyleaとの比較。非刺激細胞(ベース)及び抗体処理を伴わない50ng/mLヒトVEGFを対照とした。データは、平

50

均 + / - S E M を表わす。

【図 1 0】図 1 0 : V E G F - A の捕捉を、p 3 8 M A P K リン酸化 (T 1 8 0 / Y 1 8 2) を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、5 0 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。非刺激細胞 (ベース) 及び抗体処理を伴わない 5 0 ng/mL ヒト V E G F を対照とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【図 1 1 A - E】図 1 1 A ~ 図 1 1 E : ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、1 0 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。(A) T P P - 1 1 7 3 5、(B) T P P - 1 1 7 3 6、(C) Eylea、(D) T P P - 1 1 7 3 7、(E) T P P - 1 1 7 3 8。分子濃度を mol/L で示す。V E G F - A の捕捉を H R M E C 細胞数の画像に基づく定量化により評価した。相対細胞数を示す。t = 0 での細胞数を 1 に設定した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

10

【図 1 2】図 1 2 : T r k B リン酸化 (Y 7 0 6 / 7 0 7) を上昇する濃度の示された分子とのインキュベーション後に、ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞において測定した。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【図 1 3】図 1 3 : E R K 1 / 2 リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) を上昇する濃度の示された分子とのインキュベーション後に、ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞において測定した。データは、平均 + / - S E M を表わす。

20

【図 1 4 A - B】図 1 4 A ~ 図 1 4 B : V E G F - A の捕捉を、(A) V E G F レセプター 2 リン酸化 (Y 1 1 7 5) 又は (B) E R K 1 / 2 リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、5 0 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。非刺激細胞 (ベース) 及び抗体処理を伴わない 5 0 ng/mL ヒト V E G F を対照とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【図 1 5】図 1 5 : V E G F - A の捕捉を H R M E C 細胞数の画像に基づく定量化により評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、0 . 5 nM Doppelmaab 又は 1 nM Eylea とのプレインキュベーションの有無で、1 0 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。画像を合計 9 6 時間にわたって 4 時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0 での細胞数を 1 に設定した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

30

【図 1 6】図 1 6 : 内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Z スタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を 2 . 5 nM 示された Doppelmaab 又は 5 nM Eylea との 2 4 時間のプレインキュベーションの有無で、5 0 ng/mL ヒト V E G F とのインキュベーションにより 2 4 時間誘発した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。n

40

【図 1 7 A - C】図 1 7 A ~ 図 1 7 C : V E G F - A の捕捉を、(A) V E G F レセプター 2 リン酸化 (Y 1 1 7 5)、(B) E R K 1 / 2 のリン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) 又は (C) p 3 8 M A P K リン酸化 (T 1 8 0 / Y 1 8 2) を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の Doppelmaab T P P - 1 1 7 3 6 又は T P P - 1 3 7 8 8 (B 2 0 I g G) とのプレインキュベーションの有無で、5 0 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。抗体処理を伴わない 5 0 ng/mL ヒト V E G F を対照とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【図 1 8】図 1 8 : 内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Z スタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E

50

C) のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を 2.5 nM Doppelmab TPP-11736 又は 2.5 nM TPP-13788 (B20 IgG) とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF とのインキュベーションにより 24 時間誘発した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

【図 19 A - C】図 19 A ~ 図 19 C : (A) TrkB リン酸化 (Y706 / 707) 又は (B 及び C) ERK1 / 2 リン酸化 (T202 / Y204 - ERK1) (T185 / Y187 - ERK2) を上昇する濃度の示された分子とのインキュベーション後に、ヒト TrkB を安定に発現する CHO 細胞において測定した。データは、平均 + / - SEM を表わす。

10

【図 20 A - B】図 20 A ~ 図 20 B : TrkB リン酸化 (Y706 / 707) を上昇する濃度の示された分子とのインキュベーション後に、(A) カニクイザル TrkB 又は (B) ラット TrkB を安定に発現する CHO 細胞において測定した。データは、平均 + / - SEM を表わす。

【図 21 A - C】図 21 A ~ 図 21 C : VEGF - A の捕捉を、(A) VEGF レセプター - 2 リン酸化 (Y1175)、(B) ERK1 / 2 リン酸化 (T202 / Y204 - ERK1) (T185 / Y187 - ERK2) 又は (C) Src リン酸化 (Y419) を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF と共にインキュベーションした。抗体処理を伴わない 50 ng/ml ヒト VEGF を対照とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

20

【図 22】図 22 : 内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Z スタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を 2.5 nM 示された分子とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF とのインキュベーションにより 24 時間誘発した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。n.s. $p > 0.05$ 有意差なし、**** $p < 0.0001$ 。

【図 23 A - D】図 23 A ~ 図 23 D : VEGF - A の捕捉を HRMEC 細胞数の画像に基づく定量化により評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、10 ng/mL ヒト VEGF と共にインキュベーションした。非刺激細胞 (ベース) 及び抗体処理を伴わない 50 ng/mL ヒト VEGF を対照とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。(A) TPP-11736、(B) TPP-14936、(C) TPP-14937 又は (D) Eylea。結合分子 / Eylea 濃度を mol/L で示す。画像を合計 84 時間にわたって 4 時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0 での細胞数を 1 に設定した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

30

【図 24 A - B】図 24 A ~ 図 24 B : (A) TrkB リン酸化 (Y706 / 707) 又は (B) ERK1 / 2 リン酸化 (T202 / Y204 - ERK1) (T185 / Y187 - ERK2) を上昇する濃度の第 2 のシリーズの示された分子とのインキュベーション後に、ヒト TrkB を安定に発現する CHO 細胞において測定した。データは、平均 + / - SEM を表わす。

40

【図 25】図 25 : 単一の結合分子を使用した VEGF 誘発クラスター形成の提案された基礎的な効果により TrkB 活性化の有効性及び効力が増大したことを示すカートン。

【図 26 A - B】図 26 A ~ 図 26 B : TrkB リン酸化 (Y706 / 707) を上昇する濃度の第 2 のシリーズの示された分子とのインキュベーション後に、(A) カニクイザル TrkB 又は (B) ラット TrkB を安定に発現する CHO 細胞において測定した。データは、平均 + / - SEM を表わす。

【図 27 A - C】図 27 A ~ 図 27 C : TrkB リン酸化 (Y706 / 707) を 200 ng/mL ヒト VEGF - A とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度の Doppel

50

mab (A) T P P - 1 4 9 4 0、(B) T P P - 1 4 9 4 1 又は (C) C 2 抗体とのインキュベーション後に、ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞において測定した。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【図 2 8 A - C】図 2 8 A ~ 図 2 8 C : E R K 1 / 2 リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) を 2 0 0 n g / m L ヒト V E G F - A とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度の Doppel m a b (A) T P P - 1 4 9 4 0、(B) T P P - 1 4 9 4 1 又は (C) C 2 抗体とのインキュベーション後に、ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞において測定した。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【図 2 9 A - B】図 2 9 A ~ 図 2 9 B : (A) T r k B リン酸化 (Y 7 0 6 / 7 0 7) 又は (B) E R K 1 / 2 リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) を上昇する濃度のヒト V E G F - A もしくは上昇する濃度の B D N F 単独のいずれか又は固定濃度の 2 0 0 n g / m L h V E G F との上昇する濃度の B D N F とのインキュベーション後に、ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞において測定した。データは、平均 + / - S E M を表わす。

10

【図 3 0 A - C】図 3 0 A ~ 図 3 0 C : T r k B リン酸化 (Y 7 0 6 / 7 0 7) を 2 0 0 n g / m L ヒト V E G F - A とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度の Doppel m a b (A) T P P - 1 4 9 4 0、(B) T P P - 1 4 9 4 1 又は (C) C 2 抗体とのインキュベーション後に、カニクイザル T r k B を安定に発現する C H O 細胞において測定した。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【図 3 1 A - C】図 3 1 A ~ 図 3 1 C : E R K 1 / 2 リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) を 2 0 0 n g / m L ヒト V E G F - A とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度の Doppel m a b (A) T P P - 1 4 9 4 0、(B) T P P - 1 4 9 4 1 又は (C) C 2 抗体とのインキュベーション後に、カニクイザル T r k B を安定に発現する C H O 細胞において測定した。データは、平均 + / - S E M を表わす。

20

【図 3 2 A - C】図 3 2 A ~ 図 3 2 C : V E G F - A の捕捉を、(A) V E G F レセプター 2 リン酸化 (Y 1 1 7 5)、(B) E R K 1 / 2 リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) 又は S r c リン酸化 (Y 4 1 9) を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、5 0 n g / m L ヒト V E G F と共にインキュベーションした。抗体処理を伴わない 5 0 n g / m l ヒト V E G F を対照とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

30

【図 3 3 A - C】図 3 3 A ~ 図 3 3 C : ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、1 0 n g / m L ヒト V E G F と共にインキュベーションした。(A) T P P - 1 1 7 3 6、(B) T P P - 1 4 9 3 8、(C) T P P - 1 4 9 3 9。分子濃度を mol / L で示す。V E G F - A の捕捉を H R M E C 細胞数の画像に基づく定量化により評価した。相対細胞数を示す。t = 0 での細胞数を 1 に設定した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【図 3 4 A - C】図 3 4 A ~ 図 3 4 C : V E G F - A の捕捉を、(A) V E G F レセプター 2 リン酸化 (Y 1 1 7 5)、(B) E R K 1 / 2 リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) 又は S r c リン酸化 (Y 4 1 9) を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、5 0 n g / m L ヒト V E G F と共にインキュベーションした。抗体処理を伴わない 5 0 n g / m l ヒト V E G F を対照とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

40

【図 3 5 A - D】図 3 5 A ~ 図 3 5 D : V E G F - A の捕捉を H R M E C 細胞数の画像に基づく定量化により評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の (A) T P P - 1 4 9 3 6、(B) T P P - 1 4 9 3 7、(C) T P P - 1 4 9 4 0 又は (D) T P P - 1 4 9 4 1 とのプレインキュベ

50

シヨンの有無で、10 ng/mL ヒト VEGF と共にインキュベーションした。分子濃度を mol/L で示す。画像を合計 8 4 時間にわたって 4 時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0 での細胞数を 1 に設定した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

【図 3 6 A - C】図 3 6 A ~ 図 3 6 C : VEGF - A の捕捉を、(A) VEGF レセプター - 2 リン酸化 (Y 1 1 7 5)、(B) ERK 1 / 2 リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - ERK 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - ERK 2) 又は Src リン酸化 (Y 4 1 9) を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF と共にインキュベーションした。抗体処理を伴わない 50 ng/ml ヒト VEGF を対照とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

10

【図 3 7 A - D】図 3 7 A ~ 図 3 7 D : VEGF - A の捕捉を HRMEC 細胞数の画像に基づく定量化により評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の (A) TPP - 1 4 9 3 8、(B) TPP - 1 4 9 3 9、(C) TPP - 1 4 9 4 0 又は (D) TPP - 1 4 9 4 1 とのプレインキュベーションの有無で、10 ng/mL ヒト VEGF と共にインキュベーションした。分子濃度を mol/L で示す。画像を合計 8 4 時間にわたって 4 時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0 での細胞数を 1 に設定した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

【図 3 8】図 3 8 : 内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Z スタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を 2.5 nM 示された分子との 2 4 時間のプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF とのインキュベーションにより 2 4 時間誘発した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。n . s . p > 0 . 0 5 有意差なし ; 50 ng/mL h VEGF と比較して、 \S p < 0 . 0 0 0 1 ; 50 ng/mL h VEGF と比較して、# p > 0 . 0 5 有意差なし。*** p < 0 . 0 0 1 ; テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。

20

【図 3 9 A - B】図 3 9 A ~ 図 3 9 B : (A) 実験手法を示す時間プロトコール。抗 VEGF 化合物 (13 又は 26 pmol/眼 Eylea 又は TPP - 1 4 9 4 0) 又は対照 (26 pmol TPP - 1 1 7 3 7) の硝子体内 (i v t) 投与の 15 分後、13 pmol/眼 ヒト VEGF - A を i v t 注射により投与した。PBS 注射を対照とした。24 時間後、1 mL/kg エバンスブルー (EB) 溶液 (0.9% 生理食塩水中の 45 mg/mL) を静脈内 (i v) 注射により 30 分間投与し、その後、眼を単離し、固定した。同じ時点で、血漿サンプルを収集し、全身 EB 曝露量が等しいことを確認した。(B) Brown Norway ラットの網膜における VEGF - A 誘発透過性亢進の定量を、共焦点顕微鏡により網膜フラットマウントにおける EB 血管外漏出を測定することにより行った。眼を鋸状縁に沿って切断し、水晶体及び硝子体を除去し、眼杯をパラホルムアルデヒド (4%) 中において、4 で 1 時間固定し、ついで、4 で一晩 PBS に移した。網膜を外側セグメント (強膜及び脈絡膜) から分離し、スライドガラスに移し、4 回切断して、平坦なクローバー葉様構造を達成した。組織をマウンティング媒体 (DNA 染色 DAPI を含有する Vectashield H-1200) で覆い、カバースリップを上置き、網膜フラットマウントを得た。サンプルを 639 nm の波長で励起し、669 nm でのエバンスブルーの発光を LSM 700 共焦点レーザー走査顕微鏡 (Carl Zeiss, Jena ; ゲイン 800、レーザー強度 2%、5 スタック 60 μ m) で記録し、最大強度投影を有する網膜フラットマウントの画像を得た。蛍光強度の合計の分析を 30 の閾値でプログラム ImageJ 中において画像を開いた後に行った。*** p < 0 . 0 0 1 ; * p < 0 . 0 5 ; n . s . p > 0 . 0 5 ; # p > 0 . 0 5 TPP - 1 1 7 3 7 + PBS に対して有意差なし。テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。n = 9 ~ 17。

30

40

【図 4 0 A - D】図 4 0 A ~ 図 4 0 D : (A 及び B) Trk B リン酸化 (Y 7 0 6 / 7 0

50

7)又は(C又はD)ERK1/2リン酸化(T202/Y204-ERK1)(T185/Y187-ERK2)を上昇する濃度のBDNF又は上昇する濃度の示された分子とのインキュベーション後に、ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。
 【図41A-B】図41A~図41B:(A)ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を、示された濃度の天然のTrkBリガンドであるBDNF(ダブリケート)又は示された濃度のDoppelmaab(それぞれトリプリケート)との1nM BDNFと共にインキュベーションした。(B)TrkB内部移行を表面TrkBレセプターの免疫蛍光染色、続けて、共焦点顕微鏡分析により評価した。ヒートマップの暗視野及び明視野はそれぞれ、蛍光閾値を上回る細胞の割合の高低を表わす。

【図42】図42:VEGF-Aの捕捉を、VEGFレセプター2リン酸化(Y1175)を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。分子処理を伴わない50ng/mlヒトVEGFを対照とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

10

【図43】図43:内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Zスタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を2.5nM示された分子とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFとのインキュベーションにより24時間誘発した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均+/-SEMを表わす。n.s. p>0.05 有意差なし;50ng/mL hVEGFと比較して、 \S p<0.0001;50ng/mL hVEGFと比較して、# p>0.05 有意差なし。*** p<0.001;テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。

20

【図44A-D】図44A~図44D:TrkBリン酸化(Y706/707)を上昇する濃度のDoppelmaabとインキュベーションした後に、ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。(A)TPP-22180対TPP-22204;(B)TPP-22192対TPP-22216;(C)TPP-22190対TPP-22214;(D)TPP-22191対TPP-22215。データは、平均+/-SEMを表わす。

【図45A-B】図45A~図45B:TrkBリン酸化(Y706/707)を上昇する濃度のDoppelmaabとインキュベーションした後に、ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。(A)TPP-22180対TPP-22204;(B)TPP-22192対TPP-22216。データは、平均+/-SEMを表わす。

30

【図46A-C】図46A~図46C:TrkBリン酸化(Y706/707)を上昇する濃度のC2抗体又はDoppelmaab TPP-22204もしくはTPP-22214とインキュベーションした後に、(A)ヒトTrkA、(B)ヒトTrkB又は(C)ヒトTrkCを安定に発現するCHO細胞において測定した。TrkAについての天然のリガンドであるNGF、TrkBについてのBDNF及びTrkCについてのNT-3を対照として使用した。データは、平均+/-SEMを表わす。

【図47A-B】図47A~図47B:TrkBリン酸化(Y706/707)を(A)一定濃度の0.3nM、1nMもしくは3nM BDNFの有無での上昇する濃度のC2抗体又は(B)一定濃度の0.3nM、1nMもしくは3nM BDNFの有無での上昇する濃度のDoppelmaab TPP-22204とインキュベーションした後に、ヒトTrkBレセプターを安定に発現するCHO細胞において測定した。データは、平均+/-SEMを表わす。

40

【図48A-D】図48A~図48D:TrkBリン酸化(Y706/707)を(A)200ng/mLヒトVEGF-A(hVEGF)、(B)50ng/mL hVEGF、(C)10ng/mL hVEGF又は(D)2ng/mL hVEGFとのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度のDoppelmaab TPP-22214とのインキュベーション後に、ヒトTrkBレセプターを安定に発現するCHO細胞において測定した。データは、平均+

50

/ - S E Mを表わす。

【図49A - D】図49A ~ 図49D : E R K 1 / 2リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) を (A) 2 0 0 ng/mL ヒト V E G F - A (h V E G F)、(B) 5 0 ng/mL h V E G F、(C) 1 0 ng/mL h V E G F 又は (D) 2 ng/mL h V E G F とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度の Doppelma b T P P - 2 2 2 1 4 とのインキュベーション後に、ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞において測定した。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【図50】図50 : Doppelma b 複合体のサイズを、多角光散乱検出器と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィーを使用して評価した。示差屈折率 (黒色、濃い灰色、薄い灰色及び破線) 及び光散乱をタンパク質がサイズ排除カラムから溶出するのにかかる時間にわたってモニターした。光散乱データを、各点におけるモル質量を決定するのに使用する。各ピークの間点におけるモル質量を星印で示し、右軸を使用して測定する。T P P - 2 2 2 1 4 単独 (破線) 又は種々の比での V E G F との複合体を研究した (黒色 2 0 : 1、濃い灰色 4 : 1、薄い灰色 1 : 1)。A ~ D は、測定されたモル質量に基づく可能性のある複合体の模式図を表わす。

10

【図51A - C】図51A ~ 図51C : T r k B の内部移行を細胞の透過化を伴わない表面 T r k B レセプターの免疫蛍光染色、続けて、共焦点顕微鏡分析により評価した。ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞を (A) 上昇する濃度の天然の T r k B リガンドである B D N F、(B) 上昇する濃度の T P P - 2 2 2 1 4 又は (C) 上昇する濃度の T P P - 2 2 2 1 4 を伴う 1 nM B D N F と共にインキュベーションした。データは、閾値を上回る表面 T r k B 染色強度有する細胞の割合を表わす。平均 + / - S E M。

20

【図52】図52 : 糖尿病誘発網膜神経変性のラットモデルにおける T r k B 活性化の神経保護機能。動物を S T Z で処置して、高血糖を誘発した。ついで、網膜機能をアゴニスト性 T r k B 抗体 C 2 又は Doppelma b T P P - 1 1 7 3 6 の硝子体内適用の直前及び 2 週間後に、網膜電図 (E R G) 及び桿体駆動 B 波暗示時間遅延により評価した。平均 + / - S E M ; $n \cdot s \cdot p > 0 . 0 5$ 、有意差なし ($n . s .$) ; * * * * $p < 0 . 0 0 0 1$; テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。抗 T N P をアイソタイプ対照抗体とした。

【図53A - B】図53A ~ 図53B : V E G F - A の捕捉を、V E G F レセプター 2 リン酸化 (Y 1 1 7 5 - V E G F R 2) を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、5 0 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。(A) Doppelma b T P P - 1 4 9 4 1、T P P - 2 2 2 1 6、T P P - 2 2 1 9 2、T P P - 2 2 2 0 4 及び T P P - 2 2 1 8 0 の比較。(B) Doppelma b T P P - 1 4 9 4 0、T P P - 1 4 9 4 1、T P P - 2 2 1 9 0、T P P - 2 2 2 1 4、T P P - 2 2 1 9 1 及び T P P - 2 2 2 1 5 の比較。非刺激細胞 (ベース) 及び抗体処理を伴わない 5 0 ng/ml ヒト V E G F を対照とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

30

【図54A - B】図54A ~ 図54B : V E G F - A の捕捉を、(A) V E G F レセプター 2 (V E G F R 2) リン酸化 (Y 1 1 7 5) 又は (B) E R K 1 / 2 リン酸化 (T 2 0 2 / Y 2 0 4 - E R K 1) (T 1 8 5 / Y 1 8 7 - E R K 2) を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の T P P - 2 2 2 1 4 又は Eylea とのプレインキュベーションの有無で、5 0 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。分子処理を伴わない 5 0 ng/ml ヒト V E G F を対照とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

40

【図55A - E】図55A ~ 図55E : ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された分子とのプレインキュベーションの有無で、1 0 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。(A) T P P P - 2 2 2 0 4、(B) T P P - 2 2 2 1 4 c、(C) T P P - 2 2 2 1 6 又は (D) Eylea。分子濃度を mol/L で示す。V E G F - A の捕捉を H R M E C 細胞数の画像に基づく定量化により評価した。画像を合計 8 4 時間にわたって 4 時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0

50

での細胞数を1に設定した。非刺激細胞を対照（ベース）とした。データは、平均 + / - S E Mを表わす。（E）に、Eylea又はTPP - 22214の濃度に対する増殖曲線下面積とベース曲線下面積との差のプロットを示す。

【図56A - B】図56A ~ 図56B：VEGF - Aの捕捉を、（A）VEGFレセプター2（VEGFR2）リン酸化（Y1214）又は（B）p38 - MAPKリン酸化（T180 / Y182）を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞（HRMEC）を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のTPP - 22214又はEyleaとのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒトVEGFと共にインキュベーションした。分子処理を伴わない50 ng/ml ヒトVEGFを対照とした。データは、平均 + / - S E Mを表わす。

10

【図57A - B】図57A ~ 図57B：ヒト網膜微小血管内皮細胞（HRMEC）のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を2.5 nM TPP - 22204、TPP - 22214、TPP - 22215、TPP - 22216又は5 nM Eyleaとのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒトVEGFとのインキュベーションにより24時間誘発した。内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Zスタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。非刺激細胞を対照（ベース）とした。データは、平均 + / - S E Mを表わす。n . s . p > 0 . 05 有意差なし；**** p < 0 . 0001。（B）に、ベース条件下での又は2.5 nM TPP - 22214もしくは5 nM Eyleaとのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒトVEGFでの刺激後の24時間の発芽後のスフェロイドからの代表的な最大投影画像を示す。バー = 100 μm。

20

【図58A - B】図58A ~ 図58B：VEGF - Aの捕捉を、（A）VEGFレセプター2リン酸化（Y951）又は（B）Srcリン酸化（Y419）を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞（HRMEC）を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のTPP - 22214又はEyleaとのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒトVEGFと共にインキュベーションした。抗体処理を伴わない50 ng/ml ヒトVEGFを対照とした。データは、平均 + / - S E Mを表わす。

【図59A - B】図59A ~ 図59B：TPP - 22214により、ラット網膜におけるヒトVEGF - A誘発透過性亢進が防止された。（A）実験手法を示す時間プロトコール。抗VEGF化合物（13又は26 pmol/眼 Eylea又はTPP - 14940）又は対照（26 pmol TPP - 11737）の硝子体内（i v t）投与の15分後、13 pmol/眼 ヒトVEGF - Aをi v t注射により投与した。PBS注射を対照とした。24時間後、1 mL/kg エバンスブルー（EB）溶液（0.9% 生理食塩水中の45 mg/mL）を静脈内（i v）注射により30分間投与し、その後、眼を単離し、固定した。同じ時点で、血漿サンプルを収集し、全身EB曝露量が等しいことを確認した。（B）Brown Norwayラットの網膜におけるVEGF - A誘発透過性亢進の定量を、共焦点顕微鏡により網膜フラットマウントにおけるEB血管外漏出を測定することにより行った。眼を鋸状縁に沿って切断し、水晶体及び硝子体を除去し、眼杯をパラホルムアルデヒド（4%）中において、4で1時間固定し、ついで、4で一晩PBSに移した。網膜を外側セグメント（強膜及び脈絡膜）から分離し、スライドガラスに移し、4回切断して、平坦なクローバー葉様構造を達成した。組織をマウンティング媒体（DNA染色DAPIを含有するVectashield H-1200）で覆い、カバースリップを上置き、網膜フラットマウントを得た。サンプルを639 nmの波長で励起し、669 nmでのエバンスブルーの発光をLSM 700共焦点レーザー走査顕微鏡（Carl Zeiss, Jena；ゲイン800、レーザー強度2%、5スタック 60 μm）で記録し、最大強度投影を有する網膜フラットマウントの画像を得た。蛍光強度の合計の分析を30の閾値でプログラムImageJ中において画像を開いた後に行った。*** p < 0 . 001；* p < 0 . 05；n . s . p > 0 . 05。チューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。n = 9 ~ 17。67 : 1のモル比のEyleaと共にインキュベーション。VEGFを比較のために示す。

30

40

【図60A - B】図60A ~ 図60B：（A）TrkB細胞外ドメイン（TrkB - ECD）の機能的特徴。ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を上昇する濃度の天然の

50

ガンドであるBDNF又は上昇する濃度のTrkB-ECDを伴う10nM BDNFと共にインキュベーションした。TrkB活性化を、TrkBリン酸化(Y706/707)を測定することにより評価した。(B)TPP-22214のTrkB-ECD結合がVEGF誘発VEGFR2リン酸化の阻害に及ぼす影響。ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRM EC)を飢餓状態にし、ついで、50ng/mL ヒトVEGF、上昇する濃度のTPP-22214を伴う50ng/mL ヒトVEGF又は上昇する濃度のTPP-22214及び100nM TrkB-ECDを伴う50ng/mL ヒトVEGFと共にインキュベーションした。50ng/mL VEGFの有無での上昇する濃度のTrkB-ECDとのHRMECインキュベーション及び非刺激細胞(ベース)を対照とした。VEGF-Aの捕捉を、VEGFレセプター2リン酸化(Y1175)を測定することにより評価した。データは、平均+/-SEMを表わす。

10

【図61A-B】図61A~図61B:(A)TrkBリン酸化(Y706/707)又は(B)ERK1/2リン酸化(T202/Y204-ERK1)(T185/Y187-ERK2)を上昇する濃度の示された分子とのインキュベーション後に、ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。データは、平均+/-SEMを表わす。

【図62A-C】図62A~図62C:TrkBリン酸化(Y706/707)を200ng/mL ヒトVEGF-Aとのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度のDoppel mab (A)TPP-23457、(B)TPP-23459又は(C)TPP-6830抗体とのインキュベーション後に、ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。データは、平均+/-SEMを表わす。

20

【図63A-C】図63A~図63C:ERK1/2リン酸化(T202/Y204-ERK1)(T185/Y187-ERK2)を200ng/mL ヒトVEGF-Aとのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度のDoppel mab (A)TPP-23457、(B)TPP-23459又は(C)TPP-6830抗体とのインキュベーション後に、ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。データは、平均+/-SEMを表わす。

【図64A-B】図64A~図64B:TrkBリン酸化(Y706/707)を(A)一定濃度の0.3nM、1nMもしくは3nM BDNFの有無での上昇する濃度のC2抗体又は(B)一定濃度の0.3nM、1nMもしくは3nM BDNFの有無での上昇する濃度のDoppel mab TPP-23457とのインキュベーション後に、ヒトTrkBレセプターを安定に発現するCHO細胞において測定した。データは、平均+/-SEMを表わす。

30

【図65A-B】図65A~図65B:ERK1/2リン酸化(T202/Y204-ERK1)(T185/Y187-ERK2)を(A)一定濃度の0.3nM、1nMもしくは3nM BDNFの有無での上昇する濃度のC2抗体又は(B)一定濃度の0.3nM、1nMもしくは3nM BDNFの有無での上昇する濃度のDoppel mab TPP-23457とのインキュベーション後に、ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞において測定した。データは、平均+/-SEMを表わす。

【図66A-B】図66A~図66B:VEGF-Aの捕捉を、(A)VEGFレセプター2リン酸化(Y1175)又は(B)ERK1/2リン酸化(T202/Y204-ERK1)(T185/Y187-ERK2)を測定することにより評価した。この目的で、ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRM EC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のTPP-22215、TPP-23457、TPP-23459又はEyleaとのプレインキュベーションの有無で、50ng/mL ヒトVEGFと共にインキュベーションした。分子処理を伴わない50ng/ml ヒトVEGFを対照とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

40

【0044】

発明の詳細な説明

本発明は、単一の結合分子内で、血管内皮増殖因子(VEGF)に特異的に結合する抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB(TrkB)に特異的に結合する抗原結合部位とを組み合わせるといった概念に基づいている。

50

【0045】

本発明まで、これらの2つの抗原をターゲットとする結合分子を調製することは開示されておらず又は間接的にも企図されていなかったことを指摘することが重要である。したがって、本発明者らにより、VEGFに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、TrkBに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含む、結合分子が調製された。

【0046】

本発明者らの最初の目標は、それぞれの個々のバインダー、すなわち、それぞれのターゲットにのみ結合する個々のVEGF又はTrkBバインダーと比較した場合、同等の有効性及び/又は効力を有する単一の結合分子を設計することであった。これは、単一の結合分子内での個々のバインダーのフォーマット化が単一の結合分子内の個々のバインダーの元の有効性及び/又は効力に悪影響を及ぼすであろうことが完全には理解されていなかったが、そのようなことが予想されるため、それ自体は困難であると既に考えられていた。

【0047】

驚くべきことに、単一の結合分子においてTrkB活性化をVEGF捕捉と組み合わせると、TrkB活性化の有効性と効力との両方の予想外の上昇がもたらされることが見出された。本発明の単一の結合分子は、完全なTrkBアゴニスト活性を示し、個々のTrkBバインダーの部分的なアゴニスト活性とは対照的である。さらに、TrkB活性化の効力は、単一の結合分子へのVEGFの結合後にさらに上昇する。

【0048】

理論に拘束されることを望むものではないが、本発明の単一の結合分子によるVEGF誘発クラスター形成は、TrkB活性化の効力の観察された上昇を担っている場合があると考えられる。加えて、提案されたVEGF誘発クラスター形成メカニズムとは無関係に、明らかに、本発明の結合分子におけるTrkB結合部位の設計により、観察された完全なTrkBアゴニスト活性をもたらすTrkB結合の最適な立体形成が支持される。有利には、VEGF捕捉(結果として、血管機能不全及び漏出の障害)を神経保護TrkBレセプターの活性化(結果として、神経細胞死の減少)と組み合わせることにより、患者は、直ちに、単回注射の恩恵を受ける。これは、網膜専門家が同じ日に2回以上の処置で同じ眼に注射することを好まないため、重要である。したがって、wAMD及びGAに対処する2つの別個の処置には、一方の眼につき2回の別個の処置訪問が必要である。まとめると、本発明の結合分子は、視覚機能の喪失の治療及び/又は予防、それによる生活の質の改善に有用である。

【0049】

一態様では、本発明は、本明細書において以下に記載される特性のうちの1つ以上を有する、結合分子、特に、血管内皮増殖因子VEGF、好ましくは、VEGF-Aに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB(TrkB)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを有する分子を提供する。

【0050】

別の態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに高い親和性で結合する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに $K_D < 500$ nMで結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに $K_D < 450$ nMで結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに $K_D < 400$ nMで結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに $K_D < 300$ nMで結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに $K_D < 250$ nMで結合する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに $K_D < 200$ nMで結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに $K_D < 150$ nMで結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに $K_D < 100$ nMで結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBに $K_D < 50$ nMで結合する。

【0051】

別の態様では、本発明の結合分子は、200 ng/mL ヒトVEGF-Aとのプレインキ

10

20

30

40

50

ユベーションを含む条件下で、TrkBを高い効力で活性化する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 100 \text{ nM}$ で活性化する。更なる実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 90 \text{ nM}$ で活性化する。更なる実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 80 \text{ nM}$ で活性化する。更なる実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 70 \text{ nM}$ で活性化する。更なる実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 60 \text{ nM}$ で活性化する。更なる実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 50 \text{ nM}$ で活性化する。更なる実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 40 \text{ nM}$ で活性化する。更なる実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 30 \text{ nM}$ で活性化する。更なる実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 20 \text{ nM}$ で活性化する。更なる実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトTrkBを $EC_{50} < 10 \text{ nM}$ で活性化する。

10

【0052】

別の態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF、好ましくは、VEGF-Aに高い親和性で結合する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aに $K_D < 1 \text{ nM}$ で結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aに $K_D < 900 \text{ pM}$ で結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aに $K_D < 800 \text{ pM}$ で結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aに $K_D < 700 \text{ pM}$ で結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aに $K_D < 600 \text{ pM}$ で結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aに $K_D < 500 \text{ pM}$ で結合する。別の実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aに $K_D < 400 \text{ pM}$ で結合する。

20

【0053】

別の態様では、本発明の結合分子は、VEGF-Aリン酸化(Tyr1175)を高い効力で阻害する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aリン酸化(Tyr1175)を $IC_{50} < 1 \text{ nM}$ で阻害する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aリン酸化(Tyr1175)を $IC_{50} < 900 \text{ pM}$ で阻害する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aリン酸化(Tyr1175)を $IC_{50} < 800 \text{ pM}$ で阻害する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aリン酸化(Tyr1175)を $IC_{50} < 700 \text{ pM}$ で阻害する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aリン酸化(Tyr1175)を $IC_{50} < 600 \text{ pM}$ で阻害する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aリン酸化(Tyr1175)を $IC_{50} < 500 \text{ pM}$ で阻害する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aリン酸化(Tyr1175)を $IC_{50} < 400 \text{ pM}$ で阻害する。この態様に関する実施態様では、本発明の結合分子は、ヒトVEGF-Aリン酸化(Tyr1175)を $IC_{50} < 300 \text{ pM}$ で阻害する。

30

【0054】

別の態様では、本発明の結合分子は、天然のTrkBリガンドであるBDNFよりTrkB下流シグナル伝達経路の活性化を誘導するのに強力である。更なる態様では、本発明の結合分子は、BDNFのものと同等のパターンで、TrkB媒介性シグナル伝達経路を介して遺伝子発現をレギュレーションする。

40

【0055】

さらに別の態様では、本発明の結合分子は、BDNF誘発ERKリン酸化を低減しない。更なる態様では、本発明の結合分子は、TrkBリン酸化及び/又は活性化に特異的であり、TrkA又はTrkCを非特異的にリン酸化/活性化しない。

【0056】

一態様では、本発明の結合分子は、疾患関連動物モデルにおける神経変性及び網膜機能の喪失を予防するのに有用である。更なる態様では、本発明の結合分子は、TrkB依存性生存シグナル伝達経路を刺激し、それにより、神経保護を提供することにより、例えば

50

、黄斑変性症、加齢黄斑変性症、地図状萎縮又は糖尿病性網膜症を有する患者の網膜におけるニューロン、グリア細胞及び/又は神経血管単位を保護する。

【0057】

別の態様では、本発明の結合分子は、例えば、黄斑変性症、加齢黄斑変性症、地図状萎縮又は糖尿病性網膜症において発症後に網膜において軸索/樹状突起及び/又はシナプスを再生し、それにより、神経再生をもたらす。一態様では、本発明の結合分子を眼への硝子体内注射のために高濃度に製剤化することができる。

【0058】

別の態様では、本発明の結合分子は、ラット網膜におけるVEGF誘発シグナル伝達の障害、内皮細胞増殖/発芽及び/又はVEGF誘発透過性亢進の障害に関して、現在の抗VEGF標準治療化合物であるaflibercept (Eylea)と比較して、優れたVEGF-Aの捕捉を示す。

10

【0059】

別の態様では、本発明の結合分子は、例えば、Eylea又は他のIgG抗体と比較して、ウサギPK研究において、実質的により長い硝子体半減期を示す。したがって、本発明の結合分子は、年4回の注射又はより低い頻度の注射に適している。

【0060】

別の態様では、本発明の結合分子は、wAMDを有しかつ地理状萎縮を発症するリスクがある患者の満たされていない高い必要性をターゲットとするのに有用である。関連する実施態様では、本発明の結合分子は、wAMDを有する患者を処置し、地理状萎縮の発症を予防するのに固有に有用である。更なる関連する実施態様では、地理状萎縮の発症が遅延され又は疾患の重症度が低減される、すなわち、地理状萎縮の発症及び/又は進行速度が低減される。この点において、本発明の結合分子による患者の処置を地理状萎縮の確定診断の前に、すなわち、地理状萎縮を発症するリスクがある患者のために、予め開始することができる。

20

【0061】

別の態様では、本発明の結合分子は、網膜静脈閉塞(CRVO)を有する患者の満たされていない高い必要性をターゲットとするのに有用である。

【0062】

別の態様では、本発明の結合分子は、現在の標準治療(Eylea)と比較した場合、ERG欠損暗示時間を改善する。

30

【0063】

一態様では、本発明の結合分子のTrkBへの結合によっては、レセプター内部移行は誘引されない。関連する態様では、本発明の結合分子のTrkBへの結合により、天然のリガンドであるBDNFと比較して、より少ないレセプター内部移行がもたらされるであろう。

【0064】

一態様では、本発明の結合分子にVEGF-Aが結合することにより、TrkB活性化の効力が上昇する。

【0065】

前記効力の上昇を、例えば、単一の結合分子により、例えば、(ヒト)TrkBを過剰発現するCHO細胞等(実施例を参照のこと)における単一の結合分子による処理後に、適切な細胞モデルにおいて、TrkB又はErk1/2リン酸化についてのEC50を決定することにより、in vitroで測定することができる。単一の結合分子を適切な濃度、例えば、200ng/mL、50ng/mL、10ng/mL又は2ng/mLヒトVEGF-A(hVEGF)との細胞のプレインキュベーションの有無で試験するものとする。細胞をヒトVEGF-Aとプレインキュベーションした後に、本発明の単一の結合分子は、TrkB又はErk1/2リン酸化についてのEC50により測定された場合、VEGF-Aとプレインキュベーションされていない細胞と比較して、効力の上昇、少なくとも約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍又は少なくとも約10倍の効力の上昇を示

40

50

す。

【0066】

別の態様では、本発明の結合分子は、完全な T r k B アゴニスト活性を示す。したがって、本発明の結合分子は、天然のリガンドである B D N F と同様に T r k B の活性化に有効である。

【0067】

別の態様では、本発明の結合分子は、T r k B レセプターの活性化と、V E G F、好ましくは、V E G F - A の捕捉を同時に行うことができる。

【0068】

定義

本明細書で具体的に定義されていない用語は、本開示及び文脈に照らして、当業者によりそれらに与えられるであろう意味を与えられるべきである。ただし、本明細書で使用する場合、特に断りない限り、下記用語は、示された意味を有し、下記慣例に従う。

【0069】

本明細書で使用する場合、「抗原結合部位」という用語は、抗体に由来する重鎖可変ドメイン (V H) 及び軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。このような場合、各可変ドメインは、3つの C D R を含む。一態様では、本発明の抗原結合部位又はタンパク質の特定の部分は、一般的には、抗体に由来する。抗体又は免疫グロブリン分子の一般的な構造は、当業者に周知である。

【0070】

「抗体」又は「免疫グロブリン分子」(I g と省略される免疫グロブリンとしても公知) は、脊椎動物の血液又は他の体液中に見出すことができるガンマグロブリンタンパク質であり、異物、例えば、細菌及びウイルスを識別し、中和するために、免疫系により使用される。それらは、典型的には、基本構造単位 - それぞれが2つの大きな重鎖及び2つの小さな軽鎖を有する - から形成され、例えば、1つの単位を有するモノマー、2つの単位を有するダイマー又は5つの単位を有するペンタマーを形成する。抗体は、非共有結合的相互作用により、抗原として公知の他の分子又は構造に結合することができる。この結合は、抗体が高親和性で特定の構造にのみ結合するであろうという意味で特異的である。抗体により認識される抗原の固有の部分は、エピトープ又は抗原決定基と呼ばれる。エピトープに結合する抗体の部分は、パラトープと呼ばれる場合があり、抗体のいわゆる可変ドメイン又は可変領域 (F v) に存在する。可変ドメインは、フレームワーク領域 (F R) により離間された3つのいわゆる相補性決定領域 (C D R) を含む。

【0071】

本発明の文脈において、C D R への言及は、種々の定義、例えば、I M G T とも呼ばれる C C G (Lefranc MP, Pommie C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, Thouvenin-Contet V, Lefranc G. 「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains.」 Dev Comp Immunol. 2003 Jan;27(1):55-77 ; Giudicelli V, Brochet X, Lefranc MP. 「IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences」. Cold Spring Harb Protoc. 2011;2011(6):695-715) に基づいている。C D R の代替的な定義は、K a b a t (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller and H. Perry, Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda (1983)) と共に、C h o t h i a (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196: 901-917) に基づいている。

【0072】

本明細書で使用する場合、「可変ドメイン」もしくは「可変領域」又は F v という表現は、抗体の抗原への結合に直接関与する軽鎖及び重鎖の対のそれぞれを示す。軽鎖の可変ドメインは「V L」と略され、重鎖の可変ドメインは、「V H」と略される。可変軽鎖ドメイン及び重鎖ドメインは、同じ一般構造を有し、各ドメインは、4つのフレームワーク

10

20

30

40

50

(FR)領域を含み、それらの配列は、広く保存され、3つのHVR(又はCDR)により連結されている。フレームワーク領域は、 β -シートコンホーメーションをとり、CDRは、 β -シート構造を連結するループを形成する場合がある。各鎖のCDRは、フレームワーク領域により三次元構造に保持され、他の鎖のCDRと共に、抗原結合部位を形成する。抗体の重鎖及び軽鎖CDR3領域は、本発明の抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たし、したがって、本発明の更なる目的を提供する。本出願で使用する場合、「定常ドメイン」又は「定常領域」という用語は、可変領域以外の抗体のドメインの合計を示す。このような定常ドメイン及び領域は、当技術分野の現状において周知であり、例えば、Kabat et al. (「Sequence of proteins of immunological interest」, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)に記載されている。

10

【0073】

抗体の「Fc部分」は、抗体の抗原への結合には直接関与しないが、種々のエフェクター機能を示す。「抗体のFc部分」は、当業者に周知の用語であり、抗体のパライン開裂に基づいて定義される。それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、抗体又は免疫グロブリンは、クラス: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMに分けられる。重鎖定常領域によれば、種々のクラスの免疫グロブリンはそれぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 及び α と呼ばれる。これらのうちのいくつかを、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4、IgA1及びIgA2にさらに分けることができる。抗体のFc部分は、補体活性化、C1q結合及びFcレセプター結合に基づいて、ADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害)及びCDC(補体依存性細胞傷害)に直接関与する。補体活性化(CDC)は、ほとんどのIgG抗体サブクラスのFc部分への補体因子C1qの結合により開始される。補体系に対する抗体の影響は、特定の条件に依存するが、C1qへの結合は、Fc部分における定義された結合部位により生じる。このような結合部位は、当技術分野の現状において公知であり、例えば、Boakle et al., Nature 282 (1975) 742-743、Lukas et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560、Brunhouse and Cebra, Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917、Burton et al., Nature 288 (1980) 338-344、Thommesen et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004、Idusogie et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184、Hezareh et al., J. Virology 75 (2001) 12161-12168、Morgan et al., Immunology 86 (1995) 319-324、EP第0307434号に記載されている。このような結合部位は、例えば、L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及びP329(KabatのEUインデックスに従ったナンバリング、以下を参照のこと)である。IgG1におけるC1q及びFcガンマレセプター結合を媒介するこれらの残基の中で最も重要なものは、L234及びL235である(Hezareh et al., J. Virology 75 (2001) 12161-12168)。サブクラスIgG1及びIgG3の抗体は、通常、補体活性化並びにC1q及びC3結合を示す。一方、IgG2及びIgG4は、補体系を活性化せず、C1q及びC3に結合しない。

20

30

【0074】

当技術分野では、抗体がさらに開発されており、医学及び技術における多用途のツールとなった。このため、本発明の文脈において、「抗体分子」又は「抗体」又は「Ig分子」(本明細書において同義語として使用される)という用語は、天然に見出すことができるような抗体を含むだけでなく、例えば、2つの軽鎖及び2つの重鎖又はラクダ科におけるような2つの重鎖のみを含む抗体を含み、さらに、抗原に対する結合特異性及び免疫グロブリンの可変ドメインに対する構造的類似性を有する少なくとも1つのパラトープを含む全ての分子を包含する。

40

【0075】

このため、抗体又は免疫グロブリン又はIg分子は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体のフラグメント、特に、Fv、Fab、Fab'又はF(ab')₂フラグメント、一本鎖抗体、特に、一本鎖可変フラグメント(scFv)、小モデ

50

ユラー免疫薬 (S M I P)、ドメイン抗体、ナノボディ、ダイアボディを含むことができる。抗体は、通常、抗体の F c 部分 (抗体定常領域) により媒介されるエフェクター機能、例えば、A D C C 又は C D C を有する場合があります又は例えば、F c 部分を欠くかもしくはブロックされ、マスクされた F c 部分、本質的には、免疫細胞又は免疫系成分、例えば、補体系により認識されないか又は十分に認識されない F c 部分を有することにより、エフェクター機能を有さない場合がある。モノクローナル抗体 (m A b) は、アミノ酸配列が同一である単一特異性抗体である。それらをハイブリドーマ技術により、特定の抗体産生 B 細胞と骨髄腫 (B 細胞ガン) 細胞との融合体のクローンを表わすハイブリッド細胞系統 (ハイブリドーマと呼ばれる) から産生することができる (Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495-7)。代替的には、モノクローナル抗体を宿主細胞におけるリコンビナント発現により産生することができる (Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (May 1997). 「Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells.」 J Immunol Methods 204 (1): 77-87; 以下も参照のこと。「リコンビナント抗体」又は「リコンビナント結合分子」は、リコンビナントに操作された宿主細胞により産生された抗体又は結合分子である。それは、場合により、単離され又は精製される。

【 0 0 7 6 】

ヒトにおける適用のために、多くの場合、他の種、例えば、マウスに元々由来する抗体の免疫原性を低減することが望ましい。これをキメラ抗体の構築により又は「ヒト化」と呼ばれるプロセスにより行うことができる。この文脈において、「キメラ抗体」は、異なる種 (例えば、ヒト) に由来する配列部分 (例えば、定常ドメイン) に融合した 1 つの種 (例えば、マウス) に由来する配列部分 (例えば、可変ドメイン) を含む抗体であると理解される。「ヒト化抗体」は、元々非ヒト種に由来する可変ドメインを含む抗体であり、ここで、特定のアミノ酸を変異させて、その可変ドメインの全配列がヒト可変ドメインの配列により密接に類似するようになっている。抗体のキメラ化及びヒト化の方法は、当技術分野において周知である (Billetta R, Lobuglio AF. 「Chimeric antibodies」. Int Rev Immunol. 1993;10(2-3):165-76; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). 「Reshaping human antibodies for therapy」. Nature: 332:323)。

【 0 0 7 7 】

「ヒト化」抗体は、非ヒト超可変領域 (H V R) 由来のアミノ酸残基及びヒト F R 由来のアミノ酸残基を含む抗体を指す。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、H V R (例えば、相補性決定領域 (C D R)) の全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、フレームワーク領域 (F R) の全て又は実質的に全体がヒト抗体のものに対応する、少なくとも 1 つ、典型的には、2 つの可変ドメインのうちの実質的に全てを含むであろう。ヒト化抗体は、場合により、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含むことができる。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

【 0 0 7 8 】

さらに、例えば、ファージディスプレイ又はトランスジェニック動物の使用により、ヒトゲノムに由来する配列に基づいて抗体を作製するための技術が開発されている (W O 第 9 0 / 0 5 1 4 4 号; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths and G. Winter (1991) 「By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage.」 J.Mol.Biol., 222, 581-597; Knappik et al., J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000; S. Carmen and L. Jermutus, 「Concepts in antibody phage display」. Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002 1(2):189-203; Lonberg N, Huszar D. 「Human antibodies from transgenic mice」. Int Rev Immunol. 1995;13(1):65-93.; M, Taussig MJ. 「Production of human antibody repertoires in transgenic mice」. Curr Opin Biotechnol. 1997 Aug;8(4):455-8.)。このような抗体は、本発明の文脈における「ヒト抗体」である。

10

20

30

40

50

【0079】

また、抗体は、抗原結合特性を保持している免疫グロブリンのフラグメント、例えば、Fab、Fab'又はF(ab')₂フラグメントも含むことができる。このようなフラグメントは、免疫グロブリンの断片化により、例えば、タンパク質分解消化により又はこのようなフラグメントのリコンビナント発現により得ることができる。例えば、免疫グロブリン消化を、ありふれた技術、例えば、パパイン又はペプシンを使用することにより達成することができる（WO第94/29348号）。抗体のパパイン消化により、典型的には、2つの同一の抗原結合フラグメント、いわゆる、Fabフラグメントが産生される。このフラグメントはそれぞれ、単一の抗原結合部位及び残存Fcフラグメントを有する。ペプシン処理により、F(ab')₂が得られる。Fab分子において、可変ドメインはそれぞれ、好ましくは、ヒト起源の免疫グロブリン定常ドメインに融合している。このため、重鎖可変ドメインは、CH1ドメイン（いわゆる、Fdフラグメント）に融合している場合があり、軽鎖可変ドメインは、CLドメインに融合している場合がある。Fab分子を宿主細胞におけるそれぞれの核酸のリコンビナント発現により産生することができる。以下を参照のこと。

10

【0080】

免疫グロブリンの可変ドメイン又はこのような可変ドメインに由来する分子を、異なる分子状況に置くための多くの技術が開発されてきた。それらも、本発明の「抗体」とみなされるべきである。一般的には、これらの抗体分子は、免疫グロブリンと比較してサイズがより小さく、単一のアミノ酸鎖又は幾つかのアミノ酸鎖を含む場合がある。例えば、一本鎖可変フラグメント(scFv)は、短いリンカー、通常、セリン(S)又はグリシン(G)と共に連結された、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変領域の融合物である（WO第88/01649号；同第91/17271号；Huston et al.; International Reviews of Immunology, Volume 10, 1993, 195 - 217）。「単一ドメイン抗体」又は「ナノボディ」は、単一のIg様ドメイン中に抗原結合部位を有する（WO第94/04678号；同第03/050531号、Ward et al., Nature, 1989 Oct 12;341(6242):544-6；Reverts et al., Expert Opin Biol Ther. 5(1):111-24, 2005）。同じか又は異なる抗原に対する結合特異性を有する1つ以上の単一ドメイン抗体同士を連結させることができる。ダイアボディは、2つの可変ドメインを含む2つのアミノ酸鎖からなる二価の抗体分子である（WO第94/13804号、Holliger et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1993 Jul 15;90(14):6444-8）。抗体様分子の他の例は、免疫グロブリンスーパーファミリー抗体である（IgSF；Srinivasan and Roeske, Current Protein Pept. Sci. 2005, 6(2): 185-96）。異なる概念により、定常ドメインCH1を欠く一本鎖ヒンジ及びエフェクタードメインに連結されたFvドメインを含む、いわゆる、小モジュラー免疫薬(SMIP)がもたらされる（WO第02/056910号）。

20

30

【0081】

本明細書で使用する場合、「結合する」又は「特異的に結合する」という用語は、in vitroアッセイにおいて、抗体又は（例えば、本明細書に記載される結合分子中の）抗原結合部位が抗原のエピトープに結合することを指す。親和性は、抗体分子上の単一の抗原結合部位と単一のエピトープとの間の相互作用である。これは、平衡会合定数 $K_a = k_{on} / k_{off}$ 又は平衡解離定数 $K_d = k_{off} / k_{on}$ により表わされる。

40

【0082】

抗体分子の結合親和性を親和性成熟として公知のプロセスにより増強することができる（Marks et al., 1992, Biotechnology 10:779-783；Barbas, et al., 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813；Shier et al., 1995, Gene 169:147-155）。したがって、親和性成熟抗体も、本発明に包含される。

【0083】

エピトープは、抗体又は抗原結合部分により結合される抗原の領域である。「エピトープ」という用語は、抗体又は抗原結合部分に特異的に結合可能な任意のポリペプチド決定基を含む。特定の実施態様では、エピトープ決定基は、分子の化学的に活性な表面基、例

50

例えば、アミノ酸、グリカン側鎖、ホスホリル又はスルホニルを含み、特定の実施態様では、特定の三次元構造特性及び/又は特定の電荷特性を有する場合がある。立体配座エピトープと非立体配座エピトープとは、変性溶媒の存在下では前者への結合は失われるが後者への結合は失われないという点で区別される。本明細書で使用する場合、「結合する」及び「特異的に結合する」という用語は、精製された野生型抗原を使用した *in vitro* アッセイ、好ましくは、プラズモン共鳴アッセイ (BIAcore (登録商標), GE-Healthcare Uppsala, Sweden) における、抗体又は抗原結合部分の抗原のエピトープへの結合を指す。

【0084】

「一本鎖 Fv フラグメント」(scFv) は、抗体重鎖可変ドメイン (VH)、リンカー及び抗体軽鎖可変ドメイン (VL) を含むポリペプチドであり、ここで、前記抗体ドメイン及び前記リンカーは、N末端からC末端方向に下記順序: a) VH - リンカー - VL、b) VL - リンカー - VH のうちの1つを有し、ここで、前記リンカーは、長さが15 ~ 25個のアミノ酸、好ましくは、20個のアミノ酸のポリペプチドである。

【0085】

本明細書で使用する場合、2つ以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈における「同一」又は「% 同一性」という用語は、最大の対応について比較され、アライメントされる場合、同じか又は同じである特定の割合のヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する2つ以上の配列又は部分配列を指す。% 同一性を決定するために、配列を最適な比較目的でアラインメントする (例えば、第2のアミノ酸又は核酸配列との最適なアラインメントのために、第1のアミノ酸又は核酸配列の配列にギャップを導入することができる)。ついで、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドにより占められる場合には、分子は、その位置で同一である。2つの配列間の% 同一性は、配列により共有される同一位置の数の関数である (すなわち、% 同一性 = 同一位置の数 / 位置の総数 (例えば、重複する位置) × 100)。一部の実施態様では、比較される2つの配列は、必要に応じてギャップが配列内に導入された後、同じ長さである (例えば、比較される配列を超えて伸長する更なる配列を除く)。例えば、可変領域配列が比較される場合、リーダー及び/又は定常ドメイン配列は考慮されない。2つの配列間の配列比較のために、「対応する」CDRは、両方の配列中の同じ位置にある CDR (例えば、各配列の CDR - H1) を指す。

【0086】

2つの配列間の% 同一性又は% 類似性の決定を、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 のアルゴリズムであり、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877において修飾されている。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索をNBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12を使用して行い、目的のタンパク質をコードする核酸に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3を使用して行い、目的のタンパク質に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためのギャップ付きアラインメントを得るために、Gapped BLASTをAltschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるように利用することができる。代替的には、PSI-Blastを使用して、分子間の距離関係 (Id.) を検出する反復検索を行うことができる。BLAST、Gapped BLAST及びPSI-Blastプログラムを利用する場合、各プログラム (例えば、XBLAST及びNBLAST) のデフォルトパラメータを使用することができる。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, CABIOS(1989)のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GCG配列

10

20

30

40

50

アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティー12及びギャップペナルティー4を使用することができる。配列分析のための更なるアルゴリズムは、当技術分野において公知であり、Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5に記載されているようなADVANCE及びADAM並びにPearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8に記載されているFASTAを含む。FASTA内では、k t u pが検索の感度及び速度を設定する制御オプションである。k t u p = 2の場合、比較される2つの配列中の類似領域は、アライメントされた残基の対を見ることにより見つけられる。k t u p = 1の場合、単一のアライメントされたアミノ酸を調べ、k t u pをタンパク質配列について2もしくは1に又はDNA配列について1~6に設定することができる。k t u pが指定されていない場合のデフォルトは、タンパク質では2、DNAでは6である。代替的には、タンパク質配列アラインメントをHiggins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402に記載されているように、CLUSTALWアルゴリズムを使用して行うことができる。

【0087】

投与される分子の「治療上有効量」は、例えば、眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患の臨床症状を予防し、改善し又は治療するのに必要な最少量、特に、これらの障害に有効な最少量である。

【0088】

本明細書で使用する場合、「一価」、「二価」、「四価」という用語は、結合分子中の抗原結合要素の数(それぞれ1、2又は4)を指す。

【0089】

本明細書で使用する場合、「単一特異性」、「二重特異性」という用語は、結合分子が特異的に結合する異なる抗原又はエピトープの数(1、2)を指す。

【0090】

例として、典型的なモノクローナル抗体(MAb)は、二価かつ単一特異性であり、両方とも同じエピトープを認識する2つの抗原結合アームを有する。二重特異性抗体は、2つの異なる抗原又はエピトープを認識し、結合することが可能な2つの抗原結合部位を有する。

【0091】

TrkB結合

トロポミオシンレセプターキナーゼB(TrkB)は、チロシンレセプターキナーゼB又はBDNF/NT-3増殖因子レセプター又は神経栄養チロシンキナーゼレセプター2型としても公知であり、ヒトにおいてNTRK2遺伝子(Genbank ID: 4915)によりコードされるタンパク質である。TrkBは脳由来神経栄養因子(BDNF)についてのレセプターである。

【0092】

神経栄養チロシンキナーゼレセプターB(TrkB; 遺伝子記号: NTRK2)は、網膜ニューロン及びグリア細胞により発現される。正常な網膜では、TrkBシグナル伝達は、細胞ストレスに対抗し、細胞生存を促進する。病気にかかった眼、例えば、糖尿病性網膜症又は地図状萎縮において、視力障害及び視力喪失を引き起こす網膜ニューロン及びグリア細胞の喪失及び機能障害が生じる。ベースレベル(糖尿病性網膜症では低下する)を上回るTrkBシグナル伝達の活性化により、ニューロン及びグリア細胞の喪失及び機能障害が打ち消され、このため、視覚機能を改善することができる。さらに、TrkB活性化は、病気にかかった眼において失われたシナプス結合を再生し、それにより、視覚機能の回復を促進する可能性を有する。リガンドが結合すると、TrkBは、ホモ二量体化を受け、続けて、自己リン酸化を受ける。リン酸化部位(Y516、Y702、Y706、Y707又はY817)に応じて、種々のシグナル伝達経路が活性化され、軸索/神経突起伸長を誘引し、シナプス可塑性を向上させ又は細胞生存を増加させる別個の重複シグ

10

20

30

40

50

ナル伝達カスケードをレギュレーションする P L C 1 又は A K T 及び E R K の異なるサブフォームの活性を含む。

【 0 0 9 3 】

本発明の結合分子の T r k B 結合成分、例えば、s c F v 又は s c F v₂ は、天然又はリコンビナントヒト T r k B に特異的に結合する。T r k B に結合することにより、本発明の結合分子は、T r k B シグナル伝達を活性化し、したがって、本発明の結合分子は、T r k B アゴニストとして作用する。

【 0 0 9 4 】

本発明の結合分子は、特定の「T r k B 抗原エピトープ」及び「T r k B エピトープ」を認識することができる。特に、本発明の結合分子は、ヒト T r k B の細胞外ドメイン中のエピトープに結合する。好ましくは、結合分子の T r k B 結合成分は、T r k B アゴニストであり、より好ましくは、完全なアゴニストである。

【 0 0 9 5 】

ヒト T r k B の細胞外ドメインは、下記配列（配列番号：2 2 6）を本質的に含む。

【 0 0 9 6 】

CPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITEIFIANQKRLEIINEDDVEAYVGL
RNLTI VDSGLKFVAHKAF LKNSNLQHINFTRNKLTSLSRKHFRHLDLSELILVGNPFTCS C
DIMWIKTLQEAKSSPDTQDLYCLNESSKNIPLANLQIPNCGLP SANLAAPNLTVEEGKSIT
LSCSVAGDPVPMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGSLRITNISSDDSGKQISCVAENLVGE
DQDSVNLT VHFAPTITFLESPTS DHHWCIPFTVKGNPKPALQWFYNGAILNESKYICTKI
HVTNHT EYHGCLQLDNPTHMNGDYTLIAKNEYGKDEKQISAHF MGWPGIDDGANPNY
PDVIYEDYGTAA NDIGD TTNRSNEIPSTDVTDK TGREH

【 0 0 9 7 】

本明細書で使用する場合、「T r k B 抗原エピトープ」及び「T r k B エピトープ」という用語は、トロポミオシンレセプターキナーゼ B に特異的に結合する、本発明の結合分子又は結合分子フラグメントの抗原結合部位に結合可能な分子（例えば、ペプチド）又は分子のフラグメントを指す。これらの用語は、例えば、本発明の結合分子又は結合分子フラグメントのいずれかにより認識される T r k B 抗原決定基をさらに含む。本発明の結合分子又は結合分子フラグメントは、

配列番号：2 0 1（C D R 1）、配列番号：2 0 2（C D R 2）及び配列番号：2 0 3（C D R 3）のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 並びに

配列番号：2 0 4（C D R 1）、配列番号：2 0 5（C D R 2）及び配列番号：2 0 6（C D R 3）のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 又は

配列番号：2 0 7（C D R 1）、配列番号：2 0 8（C D R 2）及び配列番号：2 0 9（C D R 3）のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 又は

配列番号：2 1 0（C D R 1）、配列番号：2 1 1（C D R 2）及び配列番号：2 1 2（C D R 3）のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R

から選択される軽鎖 C D R と重鎖 C D R との組み合わせを有する。

【 0 0 9 8 】

T r k B 抗原エピトープは、タンパク質、タンパク質フラグメント、ペプチド等に含まれる場合がある。エピトープは、最も一般的には、タンパク質、短いオリゴペプチド、オリゴペプチド模倣物（すなわち、T r k B 抗原の抗体結合特性を模倣する有機化合物）又はそれらの組み合わせである。

【 0 0 9 9 】

V E G F 結合

血管内皮増殖因子（V E G F）は、V E G F - A 又は血管透過性因子（V P F）とも呼ばれる最も重要な血管新生促進因子の 1 つである。V E G F は、胎盤増殖因子（P I G F）、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、V E G F - E 及び V E G F - F を含む遺伝子ファミリーに属する。ヒト V E G F の単一遺伝子の m R N A の選択的スプライシングにより、少なくとも 6 つのアイソフォーム（V E G F 1 2 1、V E G F 1 4 5、V E G

F 1 6 5、V E G F 1 8 3、V E G F 1 8 9 及び V E G F 2 0 6) がもたらされ、V E G F 1 6 5 が、最も豊富なアイソフォームである。

【 0 1 0 0 】

V E G F と相互作用する 2 つの V E G F チロシンキナーゼレセプター (V E G F R)、すなわち、V E G F R - 1 (F l t - 1 としても公知) 及び V E G F R - 2 (K D R 又は F I K - 1 としても公知) が特定されている。V E G F R - 1 は、V E G F に対して最も高い親和性を有するが、V E G F R - 2 は、V E G F に対して幾らか低い親和性を有する。Ferrara (Endocrine Rev. 2004, 25: 581-611) により、V E G F の詳細な説明が提供されており、正常及び病理学的プロセスにおけるそのレセプターとの相互作用及びその機能を Hoeber et al. Pharmacol. Rev. 2004, 56: 549-580 に見出すことができる。

10

【 0 1 0 1 】

V E G F は、正常な血管新生及び異常な血管新生の両方の重要なレギュレーターであることが報告されている (Ferrara and Davis-Smyth, Endocrine Rev. 1997, 18: 4-25 ; Ferrara J. Mol Med. 1999, 77: 527-543)。血管形成のプロセスに寄与する他の成長因子と比較して、V E G F は、血管系内の内皮細胞に対するその高い特異性において固有である。

【 0 1 0 2 】

V E G F は、特に、眼疾患に關与する。眼液中の V E G F 濃度は、糖尿病性網膜症及び他の虚血関連網膜症を有する患者における血管の活性増殖の存在と高度に關連している。さらに、研究から、加齢性黄斑変性症 (A M D) に罹患した患者の脈絡膜新生血管膜における V E G F の局在を実証されている。

20

【 0 1 0 3 】

本発明の結合分子、例えば、免疫グロブリン (I g) 分子の V E G F 結合成分は、V E G F 分子内の 1 つ以上のエピトープに特異的に結合するという点で、V E G F に対する特異性を有する。V E G F に結合することにより、本発明の結合分子は、V E G F アンタゴニストとして作用する。好ましくは、本発明の結合分子は、V E G F - A に特異的に結合する。

【 0 1 0 4 】

V E G F 結合成分のその抗原である V E G F への特異的結合を例えば、本明細書に記載されたアッセイ、散乱分析及び / 又は競合的結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素イムノアッセイ (E I A 及び E L I S A) 及びサンドイッチ競合アッセイ並びに当技術分野においてそれ自体公知のその種々の変形形態を含む、それ自体公知の任意の適切な方法で決定することができる。同じことが、T r k B 結合成分がその抗原に結合する場合にも当てはまる。

30

【 0 1 0 5 】

抗原 V E G F に関して、本発明の V E G F 結合成分、例えば、免疫グロブリン (I g) 分子は、種に関して限定されない。このため、免疫グロブリン (I g) 分子は、好ましくは、ヒトにおける治療目的が意図される場合、ヒト V E G F に結合する。ただし、別のは乳類種由来の V E G F に結合する免疫グロブリン (I g) 分子も、本発明の範囲内である。ある種形態の V E G F に結合する免疫グロブリン (I g) 分子は、1 つ以上の他の種に由来する、ヒトのものとは異なる配列を有する V E G F と交差反応する場合がある。例えば、ヒト V E G F に結合する免疫グロブリン (I g) 分子は、霊長類の 1 つ以上の他の種由来の V E G F 及び / 又は疾患のための動物モデル、特に、血管新生に対する V E G F 媒介作用に關連する疾患及び障害のための動物モデル (例えば、本明細書で言及された種及び動物モデル) に使用される動物の 1 つ以上の種、例えば、サル、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ由来の V E G F はとの交差反応性を示す場合がある。このような交差反応性を示す免疫グロブリン (I g) 分子は、研究及び / 又は薬剤開発において有利である。本発明の免疫グロブリン単一可変ドメインを認知された疾患モデル、例えば、サル、特に、カニクイザルもしくはアカゲザル又はマウス及びラットにおいて試験することが可能であるためである。

40

50

【 0 1 0 6 】

好ましくは、治療用 V E G F アンタゴニストの開発中の動物モデルとしての使用が意図される、ヒト以外の種由来の 1 つ以上の V E G F 分子との交差反応性を考慮して、V E G F 結合成分は、ヒト V E G F と高度の同一性を有する目的の V E G F の領域中のエピトープを認識する。

【 0 1 0 7 】

したがって、本発明の結合分子、例えば、免疫グロブリン (I g) 分子の V E G F 結合成分は、そのレセプターへの結合に関連する V E G F の領域に全体的に又は部分的に位置するエピトープを認識する。好ましい態様によれば、本発明の結合分子の V E G F 結合成分は、V E G F レセプター活性化を、好ましくは実質的に、最も好ましくは完全に遮断する。

10

【 0 1 0 8 】

上記されたように、V E G F とそのレセプターとの間の相互作用を遮断する V E G F 結合成分の能力を実施例に記載されるように、増幅発光近接ホモジニアスアッセイ (AlphaScreen (登録商標))、競合 ELISA 又はプラズモン共鳴 (S P R) ベースのアッセイ (Biacore (登録商標)) により決定することができる。

【 0 1 0 9 】

T r k B 及び V E G F 結合分子

本発明は、少なくとも 2 つの異なるターゲットに対する結合特異性を有する結合分子に関する。本発明に関して、結合分子は、抗体に由来する。結合分子を調製するための技術は、異なる特異性を有する 2 つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対のリコンビナント共発現 (Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)、WO 第 9 3 / 0 8 8 2 9 号及び Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991) を参照のこと) 及び「ノブ - イン - ホール」操作 (例えば、US 第 5 , 7 3 1 , 1 6 8 号を参照のこと) を含むが、これらに限定されない。また、本発明の結合分子を、抗体 F c - ヘテロ二量体分子を調製するための静電的ステアリング効果を操作すること (WO 第 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 号) ; 2 つ以上の抗体又はフラグメントを架橋すること (例えば、US 第 4 , 6 7 6 , 9 8 0 号及び Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) を参照のこと) ; ロイシンジッパーを使用して、二重特異性抗体を産生すること (例えば、Kostelny et al., Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992) を参照のこと) ; 二重特異性抗体フラグメントを調製するための「ダイアボディ」技術を使用すること (例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) を参照のこと) 及び一本鎖 F v (s F v) 二量体を使用すること (例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) を参照のこと) 及び例えば、Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991) に記載されているような三重特異性抗体を調製することによっても調製することができる。

20

30

【 0 1 1 0 】

一実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子 (V E G F)、好ましくは、V E G F - A に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼ B (T r k B) に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合部位を含むか又はそれらからなる。関連する実施態様では、結合分子は、二重特異性かつ四価である。

40

【 0 1 1 1 】

別の実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子 (V E G F) に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼ B (T r k B) に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合部位とを含むか又はそれらからなり、ここで、V E G F に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合部位は、免疫グロブリン (I g) 分子、好ましくは、I g G 分子である。関連する実施態様では、結合分子は、二重特異性かつ四価である。

【 0 1 1 2 】

別の実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子 (V E G F) に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼ B (T r k B) に特

50

異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含むか又はそれらからなり、ここで、T r k Bに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、1つ以上のs c F vを好ましくは、N末端からC末端へのV L - V H配向で含む。関連する実施態様では、結合分子は、二重特異性かつ四価である。

【0113】

別の実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子(V E G F)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB(T r k B)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含むか又はそれらからなり、ここで、V E G Fに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、免疫グロブリン(I g)分子、好ましくは、I g G分子であり、ここで、T r k Bに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、I g分子の重鎖のC末端に融合している。関連する実施態様では、結合分子は、二重特異性かつ四価である。

10

【0114】

別の実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子(V E G F)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB(T r k B)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含むか又はそれらからなり、V E G Fに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、免疫グロブリン(I g)分子、好ましくは、I g G分子であり、ここで、T r k Bに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、1つ以上のs c F vを好ましくは、N末端からC末端へのV L - V H配向で含む。関連する実施態様では、結合分子は、二重特異性かつ四価である。

20

【0115】

別の実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子(V E G F)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB(T r k B)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含むか又はそれらからなり、ここで、V E G Fに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、免疫グロブリン(I g)分子、好ましくは、I g G分子であり、ここで、T r k Bに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、1つ以上のs c F vを好ましくは、N末端からC末端へのV L - V H配向で含み、I g分子の重鎖のC末端に融合している。関連する実施態様では、結合分子は、二重特異性かつ四価である。

【0116】

好ましい実施態様では、本発明の結合分子は、(i)それぞれがV E G Fに特異的な重鎖可変領域、定常I g Gドメイン及びT r k Bに特異的なs c F vを含むか又はそれらからなる2つの重鎖と、(ii)それぞれがV E G Fに特異的な軽鎖可変領域を含むか又はそれらからなる2つの軽鎖とを含むか又はそれらからなる。

30

【0117】

加えて、これらの一本鎖F vフラグメントを、システイン残基の取り込みを介して、V HドメインとV Lドメインとの間、V Hドメイン内又はV Lドメイン内のジスルフィド結合の取り込みによりさらに安定化させることができる。N末端という用語は、ポリペプチド鎖の最初のアミノ酸を示す。一方、C末端という用語は、ポリペプチド鎖のC末端の最後のアミノ酸を示す。したがって、本発明の実施態様は、1つ以上のs c F vがジスルフィド結合を形成するための追加のシステイン残基を含むものである。

40

【0118】

一実施態様では、本発明は、(i)2つの重鎖及び2つの軽鎖を有し、V E G Fに特異的に結合するI g分子と、(ii)それぞれがT r k Bに特異的に結合する2つのs c F v分子(s c F v)とを含む多重特異的結合タンパク質である、結合分子を提供する。好ましくは、I g分子の各重鎖は、そのC末端に融合している1つのs c F vを有し、それにより、二重特異性で四価の結合タンパク質を形成している。

【0119】

一実施態様では、本発明は、
(i)それぞれがN末端からC末端に向かって、

50

- V E G F に特異的な重鎖可変ドメイン (例えば、マウス、ヒト化又はヒト V H ドメイン)
- I g G (例えば、ヒト I g G 1 又は I g G 4) の定常ドメイン
- ペプチドリンカー (例えば、G S ミニリンカー) 及び
- T r k B に特異的な s c F v (例えば、N 末端から C 末端への V H ドメイン (例えば、マウス、ヒト化又はヒト V H ドメイン) を含む s c F v)、リンカー及び V L ドメイン (例えば、マウス、ヒト化又はヒト V L ドメイン) 又はその逆に、V L ドメイン、リンカー及び V H ドメイン)

含む 2 つの重鎖と、

(i i) それぞれが N 末端から C 末端に向かって

V E G F に特異的な軽鎖可変ドメイン (例えば、マウス、ヒト化又はヒト V L ドメイン)、
軽鎖定常ドメイン (例えば、ヒトカッパ鎖)

を含む 2 つの軽鎖と

を有する、結合分子 (本明細書において、多重特異性結合タンパク質又は修飾 I g 分子とも呼ばれる) を提供する。

【 0 1 2 0 】

本発明は、血管内皮増殖因子 (V E G F) に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼ B (T r k B) に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合部位とを有する、結合分子を提供する。

【 0 1 2 1 】

特異的なターゲット抗原に結合する結合部位を調製する方法は、当技術分野において周知である。当業者であれば、これらの方法を容易に使用して、V E G F 又は T r k B ターゲット抗原に対して必要な特異性を有する抗原結合部位を考案することができる。

【 0 1 2 2 】

抗体及び抗体フラグメントを生成する方法は、当技術分野において周知である。例えば、抗体を抗体分子の *i n v i v o* 産生の誘導、免疫グロブリンライブラリーのスクリーニング (Orlandi et al, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837 ; Winter et al 1991, Nature 349:293-299) 又は培養中の細胞系統によるモノクローナル抗体分子の生成を利用する幾つかの方法のいずれか 1 つにより生成することができる。これらは、ハイブリドーマ技術、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術及びエプスタイン - バーウイルス (E B V) - ハイブリドーマ技術 (Kohler et al 1975. Nature 256:4950497 ; Kozbor et al 1985. J. Immunol. Methods 81 :31 -42 ; Cote et al 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030 ; Cole et al 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120) を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 2 3 】

当技術分野において公知であり、本明細書に記載された方法を使用して、V E G F 及び / 又は T r k B ターゲット抗原に対して必要な特異性を有する結合部位を有する抗体並びに本明細書に記載された結合分子を調製することは、当業者には日常的であろう。このような抗体からの結合ドメインの単離は、日常的な実践であり、実際、本明細書に記載された抗体及び結合分子を生成するのに使用することができる方法に関する更なる情報が、添付の実施例において提供される。

【 0 1 2 4 】

本発明者らは、表 1 に示されるように、本発明の V E G F / T r k B に対する結合分子を考案し、これらの分子の選択を準備し、添付の実施例において検討する。

【 0 1 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1:

| 結合分子 | 配列 | 配列番号: | |
|-----------------|---|-------|----|
| TPP-11735 軽鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSQSGVPSRFRSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYYCQH FWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCV LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 1 | |
| TPP-11735 重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITNYDI IHWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFP PLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKS CDKTHCTCPPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKARGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNYTQKSLSL S PGGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTN YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGH STSPWAMDYWGQGT LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQVIRRS LAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFRSGSGSDYFTFTI SSLQPEDFATYYCQSNSTSP LTFGQGTKVEIK | 2 | 10 |
| TPP-11736 軽鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSQSGVPSRFRSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYYCQH FWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCV LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 3 | 20 |
| TPP-11736 重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITNYDI IHWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFP PLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKS CDKTHCTCPPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKARGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNYTQKSLSL S PGGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQVIRRS LAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFRSGSGSDYFTFTI SSLQPEDFATYYCQSNSTSP LTFGQGTKVEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTN YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGH STSPWAMDYWGQGT LVTVSS | 4 | 30 |
| TPP-11737 軽鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSQSGVPSRFRSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYYCQH FWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCV LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 5 | |
| TPP-11737 重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITNYDI IHWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFP PLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKS CDKTHCTCPPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV | 6 | 40 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| | DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSEKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPHYAMDYWGQGLVTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENVYSNLAWYQQKPKGAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIAIYYCQHFWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| TPP-11738 輕鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENVYSNLAWYQQKPKGAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIAIYYCQHFWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 7 |
| TPP-11738 重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNYDIIWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMRDTSSTVYMESSLRSED TAVYYCARLLKYYRRFRYYAIDYWGQGTFTVTVSSASTKGPVFPPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVL QSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSEKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGAPKLLIYASFLYSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIAIYYCQSYTTPPTFGQGTKVEIKGGSEKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPHYAMDYWGQGLVTVSS | 8 |
| TPP-14936 輕鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENVYSNLAWYQQKPKGAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIAIYYCQHFWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 9 |
| TPP-14936 重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNYDIIWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMRDTSSTVYMESSLRSED TAVYYCARLLKYYRRFRYYAIDYWGQGTFTVTVSSASTKGPVFPPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVL QSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSEKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPHYAMDYWGQGLVTVSS | 10 |
| TPP-14937 輕鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENVYSNLAWYQQKPKGAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIAIYYCQHFWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 11 |
| TPP-14937 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNYDIIWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMRDTSSTVYMESSLRSED | 12 |

10

20

30

40

| | | |
|---------------------------------------|---|-----------|
| <p>重鎖</p> | <p>TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNYTQKSLSLS PGGGSEGGSSGSGSESKSTGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGG TDFTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGGTKVEIKGGSEK SSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFT YGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTAAADFKRRFTFSLDTFSK STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTLVTV SS</p> | <p>10</p> |
| <p>TPP-16061 輕鎖</p> | <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR TSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSGVP SRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYYCQH FWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC</p> | <p>13</p> |
| <p>TPP-16061 重鎖</p> | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYDI IWRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNYTQKSLSLS PGGGGGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQVIRRLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVP SRFSGSGG TDFTLTISLQPEDFATYYCQSNSTPLTFGGTKVEIKGGSEK SSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINA SWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGY TNYADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS</p> | <p>14</p> |
| <p>TPP-16062 輕鎖</p> | <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR TSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSGVP SRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYYCQH FWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC</p> | <p>15</p> |
| <p>TPP-16062 重鎖</p> | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYDI IWRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNYTQKSLSLS PGGGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQV IRRLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVP SRFSGSGSGTDFTL TISLQPEDFATYYCQSNSTPLTFGGTKVEIKGGSEKSSGSG SESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHW VRQAPGKGLEWVGAIYPYSGY TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS</p> | <p>16</p> |
| <p>TPP-16063</p> | <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR TSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSGVP SRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYYCQH FWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL</p> | <p>17</p> |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|--|----|
| 輕鎖 | LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| TPP-16063 重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNYDI IWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSSTVYMELSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQVIRRSLS AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAP GKGLIEWVGAIPYSGYTNYSVKGFRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGLTVTVSS | 18 |
| TPP-16064 輕鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRITSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLAGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDFATYYCQH FWGSPFTFGQGTKEIKRTVAAPSFI FPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 19 |
| TPP-16064 重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNYDI IWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSSTVYMELSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQVIRRSLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSNTSPLTFGQGTKEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGL EWVGAIPYSGYTNYSVKGFRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGLTVTVSS | 20 |
| TPP-19984 輕鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRITSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLAGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDFATYYCQH FWGSPFTFGQGTKEIKRTVAAPSFI FPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 21 |
| TPP-19984 重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTNYDI IWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSSTVYMELSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYG MNWVRQAPGKGLIEWVGAIPYSGYTNYSVKGFRFTISADTSKNTAYL AYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSA SQDISNLYNQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPTWTFGQGTKEIK | 22 |

10

20

30

40

| | | |
|----------------------------|---|-----------|
| <p>TPP-19985</p> <p>軽鎖</p> | <p>DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIATYYCQH FWGSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>23</p> |
| <p>TPP-19985</p> <p>重鎖</p> | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTNYDIIWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSLED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAPVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GG ASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGPTYAADFKRRF TFSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVW GQGLTVTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSSLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTITISLQPEDFATYYCQQYSTVFPWTFGQGTKVE IK</p> | <p>24</p> |
| <p>TPP-14938</p> <p>軽鎖</p> | <p>DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQVIRRSALAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSAGVPSRFSGSGSGTDFTLTITISLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>25</p> |
| <p>TPP-14938</p> <p>重鎖</p> | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGL EWVGAITYPSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAED TAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAPVLS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGSEKSSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFSTNYDIIWVRQAPGQGLEWVMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTM TRDTSTSTVYMELSLRSLEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQ GTTVTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRF SGSGSGTDYTFITISLQPEDIATYYCQHFWGSPFTFGQGTKLEIK</p> | <p>26</p> |
| <p>TPP-14939</p> <p>軽鎖</p> | <p>DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQVIRRSALAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSAGVPSRFSGSGSGTDFTLTITISLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>27</p> |
| <p>TPP-14939</p> <p>重鎖</p> | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGL EWVGAITYPSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAED TAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAPVLS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGSEKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRT SENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTD</p> | <p>28</p> |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|--|----|
| | HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGGQQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYD IIWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTKEYNEKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTVSS GGSEKSSGGSGSEKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRT SENVYSNLAWYQQKPKGAPKLLIYAASNLQSGVPSRFRSGSGSDT YFTTISLQPEDIAIYYCQHFWSGSPFTFGQGTKEIK | |
| TPP-19987 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGRVITTCASQDISNYLNWYQQKPKGAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 35 |
| TPP-19987 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGGSGGGGSGGGGQQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYFTFTNYDIIWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTKEYNEKFKGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYW GQGTTVTVSSGGSEKSSGGSGSEKSTGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCRTSENVYSNLAWYQQKPKGAPKLLIYAASNLQSGVPS RFRSGSGSDTYFTTISLQPEDIAIYYCQHFWSGSPFTFGQGTKEI K | 36 |
| TPP-19988 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGRVITTCASQDISNYLNWYQQKPKGAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 37 |
| TPP-19988 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRTSENVYSNL AWYQQKPKGAPKLLIYAASNLQSGVPSRFRSGSGSDTYFTTISL QPEDIAIYYCQHFWSGSPFTFGQGTKEIKGGSEKSSGGSGSEKSS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYDIIWVRQAP GQGLEWMGYINPYNDGTKEYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTVSS | 38 |
| TPP-19989 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGRVITTCASQDISNYLNWYQQKPKGAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 39 |
| TPP-19989 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPLA | 40 |

10

20

30

40

| | | |
|---------------------------------------|--|-----------|
| <p>重鎖</p> | <p>PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGSGGGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVDRVTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSG TDYFTTISLQPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTN YDI IWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMESSLRSED TAVYYCARLLK YRRFRYYAIDYWGQGT TTVV SS</p> | <p>10</p> |
| <p>TPP-22171 輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC</p> | <p>41</p> |
| <p>TPP-22171 重鎖</p> | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGIWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGSGGGGSGGGGSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYD IIWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTST VYMESSLRSED TAVYYCARLLK YRRFRYYAIDYWGQGT TTVVSS GGSEKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVDRVTITCRT SENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTD YTFTISLQPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIK</p> | <p>42</p> |
| <p>TPP-22172 輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC</p> | <p>43</p> |
| <p>TPP-22172 重鎖</p> | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGIWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGSGGGGSGGGGSGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCK ASGYTFTNYDIIWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRV TMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARLLK YRRFRYYAIDYW GQGT TTVVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASV DRVTITCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPS RFSGSGSGTDYFTTISLQPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLE IK</p> | <p>44</p> |
| <p>TPP-22173</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCL</p> | <p>45</p> |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|---|----|
| 輕鎖 | LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| TPP-22173 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVPVSRFSGSGSDYFTFTISSL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEGKSSGSGSEKSKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYDI I WVRQAP GQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS | 46 |
| TPP-22174 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDINSYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 47 |
| TPP-22174 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVPVSRFSGSGSDYFTFTISSL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEGKSSGSGSEKSKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYDI I WVRQAP GQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS | 48 |
| TPP-22175 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDINSYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 49 |
| TPP-22175 重鎖 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVPVSRFSGSGSDYFTFTISSL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEGKSSGSGSEKSKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYDI I WVRQAP GQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS | 50 |

10

20

30

40

50

| | | |
|-----------------|---|----|
| | YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGQGTKLEIK | |
| TPP-22176 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC | 51 |
| TPP-22176 重鎖 | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYD IIWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTKEYNEKFKGRVTMTRDTSST VYMESSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSS GGSEKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRT SENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVPVSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGQGTKLEIK | 52 |
| TPP-22177 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTGF TLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC | 53 |
| TPP-22177 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYD IIWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTKEYNEKFKGRVTMTRDTSST VYMESSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSS GGSEKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRT SENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVPVSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGQGTKLEIK | 54 |
| TPP-22178 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTGF TLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC | 55 |
| TPP-22178 重鎖 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYD IIWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTKEYNEKFKGRVTMTRDTSST | 56 |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|--|----|
| | VYMESSLRSEDVAVYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQTTVTVSS GGSEKSSGSGSEKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRT SENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDATYYCQHFWSGPFTEFGQGTKEIK | |
| TPP-22179 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC | 57 |
| TPP-22179 重鎖 | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDRKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYD IIWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDSTST VYMESSLRSEDVAVYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQTTVTVSS GGSEKSSGSGSEKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRT SENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDATYYCQHFWSGPFTEFGQGTKEIK | 58 |
| TPP-22180 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC | 59 |
| TPP-22180 重鎖 | QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDRKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYD IIWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDSTST VYMESSLRSEDVAVYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQTTVTVSS GGSEKSSGSGSEKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRT SENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDATYYCQHFWSGPFTEFGQGTKEIK | 60 |
| TPP-22181 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC | 61 |
| TPP-22181 重鎖 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDRKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD | 62 |

10

20

30

40

| | | |
|---------------------------------------|--|-----------|
| <p>輕鎖</p> | <p>YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | |
| <p>TPP-22187 重鎖</p> | <p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDYFTTISL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGQGTKEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYDI IWVRQAP GQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSS</p> | <p>74</p> |
| <p>TPP-22188 輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>75</p> |
| <p>TPP-22188 重鎖</p> | <p>EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDYFTTISL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGQGTKEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYDI IWVRQAP GQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSS</p> | <p>76</p> |
| <p>TPP-22189 輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>77</p> |
| <p>TPP-22189 重鎖</p> | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDYFTTISL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGQGTKEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYDI IWVRQAP GQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL</p> | <p>78</p> |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|--|----|
| | RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTVSS | |
| TPP-22190 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTGFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 79 |
| TPP-22190 重鎖 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNYTQKLSLSL PGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGGTDTYFTTISL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGQGTKEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTNYDI IWRQAP GQGLEWGMGINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTVSS | 80 |
| TPP-22191 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTGFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 81 |
| TPP-22191 重鎖 | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNYTQKLSLSL PGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGGTDTYFTTISL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGQGTKEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTNYDI IWRQAP GQGLEWGMGINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTVSS | 82 |
| TPP-22192 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTGFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 83 |
| TPP-22192 重鎖 | QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNYTQKLSLSL PGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGGTDTYFTTISL | 84 |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|--|----|
| | QPEDIATYYCQHFWSGPFPTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFNIDIWVRQAP GQGLEWVMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSS | |
| TPP-22193 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 85 |
| TPP-22193 重鎖 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EHWGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEKS CDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVTV DVSHEDEPKVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNNHYTQKSLSL PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDVRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVPSRFSGSGSG TDYFTFISSLQPEDATYYCQHFWSGPFPTFGQGTKLEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFN YDIWVRQAPGQGLEWVMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTV SS | 86 |
| TPP-22194 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 87 |
| TPP-22194 重鎖 | EVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLS CAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EHWGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEKS CDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVTV DVSHEDEPKVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNNHYTQKSLSL PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDVRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVPSRFSGSGSG TDYFTFISSLQPEDATYYCQHFWSGPFPTFGQGTKLEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFN YDIWVRQAPGQGLEWVMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TTVTV SS | 88 |
| TPP-22195 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 89 |
| TPP-22195 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EHWGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEKS CDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVTV DVSHEDEPKVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL | 90 |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|---|----|
| | HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQGVPSRFRSGSGG TDYFTFTISSLQPEDATYYCQHFHWSPTFGQGTKEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTN YDI IWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTV SS | |
| TPP-22196 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 91 |
| TPP-22196 重鎖 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGVINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQGVPSRFRSGSGG TDYFTFTISSLQPEDATYYCQHFHWSPTFGQGTKEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTN YDI IWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTV SS | 92 |
| TPP-22197 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 93 |
| TPP-22197 重鎖 | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGVINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQGVPSRFRSGSGG TDYFTFTISSLQPEDATYYCQHFHWSPTFGQGTKEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTN YDI IWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTV SS | 94 |
| TPP-22198 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 95 |

10

20

30

40

| | | |
|----------------------------|---|------------|
| <p>TPP-22198</p> <p>重鎖</p> | <p>QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVWINTYTGEPYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCVSMHEALHNNHYTQKSLSL PGGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPKGAPKLLIYAASNLSQGVPSRFSGSGSG TDYFTTISLQPEDIATYYCQHFVWSPFTFGQGTKLEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFN YDI IWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMESSLRSEDTAVYYCARLLKRYRFRYYAIDYWGQGTITVTV SS</p> | <p>96</p> |
| <p>TPP-22199</p> <p>輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>97</p> |
| <p>TPP-22199</p> <p>重鎖</p> | <p>QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVWINTYTGEPYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCVSMHEALHNNHYTQKSLSL PGGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFN YDI IWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST VYMESSLRSEDTAVYYCARLLKRYRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPKGAPKLLIYAASNLSQGVPSRFSGSGSGT DYFTTISLQPEDIATYYCQHFVWSPFTFGCGTKLEIK</p> | <p>98</p> |
| <p>TPP-22200</p> <p>輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>99</p> |
| <p>TPP-22200</p> <p>重鎖</p> | <p>EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVWINTYTGEPYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCVSMHEALHNNHYTQKSLSL PGGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFN YDI IWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST VYMESSLRSEDTAVYYCARLLKRYRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPKGAPKLLIYAASNLSQGVPSRFSGSGSGT DYFTTISLQPEDIATYYCQHFVWSPFTFGCGTKLEIK</p> | <p>100</p> |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|---|-----|
| TPP-22201 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 101 |
| TPP-22201 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGGGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYD IIWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSST VYMELSSLRSEDYAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRT SENVYSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTD YFTTISLQPEDYATYYCQHFVWSPFTFGCGTKLEIK | 102 |
| TPP-22202 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 103 |
| TPP-22202 重鎖 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGGGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYD IIWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSST VYMELSSLRSEDYAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRT SENVYSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTD YFTTISLQPEDYATYYCQHFVWSPFTFGCGTKLEIK | 104 |
| TPP-22203 輕鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 105 |
| TPP-22203 重鎖 | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGGGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYD IIWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSST VYMELSSLRSEDYAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS | 106 |

10

20

30

40

| | | |
|------------------------------|---|------------|
| <p>輕鎖</p> | <p>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | |
| <p>TPP-22212 重鎖</p> | <p>EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSACAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPVFPPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFGSGSGTDYFTFISL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYDI IWRQAP GQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS</p> | <p>124</p> |
| <p>TPP-22213 輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDINSYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>125</p> |
| <p>TPP-22213 重鎖</p> | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPVFPPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFGSGSGTDYFTFISL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYDI IWRQAP GQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS</p> | <p>126</p> |
| <p>TPP-22214 輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDINSYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>127</p> |
| <p>TPP-22214 重鎖</p> | <p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPVFPPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENVYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFGSGSGTDYFTFISL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKS TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYDI IWRQAP GQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTITVTVSS</p> | <p>128</p> |

10

20

30

40

| | | |
|----------------------------|---|------------|
| <p>TPP-22215</p> <p>輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTGFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>129</p> |
| <p>TPP-22215</p> <p>重鎖</p> | <p>EVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDEPKVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGGGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDVRTITCRTSENVY AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVP SRFSGSGSDYFTFTISSL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEKSSGSGSES TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYDIIWVRQAP GQCLEWMGYINPYNDGT KYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSL RSED TAVYYCARLLK YRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSS</p> | <p>130</p> |
| <p>TPP-22216</p> <p>輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTGFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>131</p> |
| <p>TPP-22216</p> <p>重鎖</p> | <p>QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDEPKVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGGGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDVRTITCRTSENVY AWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVP SRFSGSGSDYFTFTISSL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEKSSGSGSES TGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYDIIWVRQAP GQCLEWMGYINPYNDGT KYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSL RSED TAVYYCARLLK YRRFRYYAIDYWGQGT TTVTVSS</p> | <p>132</p> |
| <p>TPP-22217</p> <p>輕鎖</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> | <p>133</p> |
| <p>TPP-22217</p> <p>重鎖</p> | <p>QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDEPKVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNYTQKLSLS PGGGGGGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDVRTITCRTSENVY SNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVP SRFSGSGSDYFTFTISSL QPEDIATYYCQHFWSGSPFTFGCGTKLEIKGGSEK</p> | <p>134</p> |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|--|-----|
| | SSGSGSEKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFN YDI IWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGGTTVTV SS | |
| TPP-22218 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 135 |
| TPP-22218 重鎖 | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGIWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKS CDKTHCPCPAPAEAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVTV DVSHEDEPKFENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNNHYTQKSLSL PGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDVRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGG TDYFTFISLQPEDFATYYCQHFWSGPTFGCGTKLEIKGGSEGK SSGSGSEKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFN YDI IWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGGTTVTV SS | 136 |
| TPP-22219 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 137 |
| TPP-22219 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGIWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKS CDKTHCPCPAPAEAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVTV DVSHEDEPKFENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNNHYTQKSLSL PGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDVRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGG TDYFTFISLQPEDFATYYCQHFWSGPTFGCGTKLEIKGGSEGK SSGSGSEKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFN YDI IWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDVAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGGTTVTV SS | 138 |
| TPP-22220 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 139 |
| TPP-22220 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGIWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKS CDKTHCPCPAPAEAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVTV DVSHEDEPKFENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL | 140 |

10

20

30

40

| | | |
|---------------------------|---|-----|
| | HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNNHYTKSLSL PGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGG TDYFTFISSLQPEDIATYYCQHFHWSPTFGCGTKLEIKGGSEK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFN YDI IWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTV SS | |
| TPP-2221 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 141 |
| TPP-2221 重鎖 | EVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKRVKPEK CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNNHYTKSLSL PGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGG TDYFTFISSLQPEDIATYYCQHFHWSPTFGCGTKLEIKGGSEK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFN YDI IWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTV SS | 142 |
| TPP-2222 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 143 |
| TPP-2222 重鎖 | QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNPKSNTKVDKRVKPEK CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNNHYTKSLSL PGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITC RTSENVYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGG TDYFTFISSLQPEDIATYYCQHFHWSPTFGCGTKLEIKGGSEK SSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFN YDI IWVRQAPGQCLEWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTTVTV SS | 144 |
| VEGF バインダー Ranibizumab | <u>S A S Q D I S N Y L N</u> | 145 |

10

20

30

40

| | | |
|---|--|-----|
| L-CDR1 | | |
| VEGF バインダー Ranibizumab L-CDR2 | <u>F T S S L H S</u> | 146 |
| VEGF バインダー Ranibizumab L-CDR3 | <u>Q Q Y S T V P W T</u> | 147 |
| VEGF バインダー Ranibizumab H-CDR1 (CCG) | <u>G Y D F T H Y G M N</u> | 148 |
| VEGF バインダー Ranibizumab H-CDR2 (CCG) | <u>W I N T Y T G E P T Y A A D F K R</u> | 149 |
| VEGF バインダー Ranibizumab H-CDR3 (CCG) | <u>Y P Y Y Y G T S H W Y F D V</u> | 150 |
| VEGF バインダー Ranibizumab H-CDR1 (Kabat) | <u>H Y G M N</u> | 151 |
| VEGF バインダー Ranibizumab H-CDR2 (Kabat) | <u>W I N T Y T G E P T Y A A D F K R</u> | 152 |
| VEGF バインダー Ranibizumab H-CDR3 (Kabat) | <u>Y P Y Y Y G T S H W Y F D V</u> | 153 |
| VEGF バインダー Ranibizumab | <u>G Y D F T H Y</u> | 154 |

10

20

30

40

50

| | | |
|---|--|-----|
| H-CDR1 (Chothia) | | |
| VEGF バインダー Ranibizumab H-CDR2 (Chothia) | <u>N T Y T G E</u> | 155 |
| VEGF バインダー Ranibizumab H-CDR3 (Chothia) | <u>Y P Y Y Y G T S H W Y F D V</u> | 156 |
| VEGF バインダー B20 L-CDR1 | <u>R A S Q V I R R S L A</u> | 157 |
| VEGF バインダー B20 L-CDR2 | <u>A A S N L A S</u> | 158 |
| VEGF バインダー B20 L-CDR3 | <u>Q Q S N T S P L T</u> | 159 |
| VEGF バインダー B20 H-CDR1 (CCG) | <u>G F T I N A S W I H</u> | 160 |
| VEGF バインダー B20 H-CDR2 (CCG) | <u>A I Y P Y S G Y T N Y A D S V K G</u> | 161 |
| VEGF バインダー B20 H-CDR3 (CCG) | <u>W G H S T S P W A M D Y</u> | 162 |
| VEGF バインダー B20 | <u>A S W I H</u> | 163 |

10

20

30

40

50

| | | |
|---------------------------------------|--|-----|
| H-CDR1 (Kabat) | | |
| VEGF バインダー B20 H-CDR2 (Kabat) | <u>A I Y P Y S G Y T N Y A D S V K G</u> | 164 |
| VEGF バインダー B20 H-CDR3 (Kabat) | <u>W G H S T S P W A M D Y</u> | 165 |
| VEGF バインダー B20 H-CDR1 (Chothia) | <u>G F T I N A S</u> | 166 |
| VEGF バインダー B20 H-CDR2 (Chothia) | <u>Y P Y S G Y</u> | 167 |
| VEGF バインダー B20 H-CDR3 (Chothia) | <u>W G H S T S P W A M D Y</u> | 168 |
| VEGF バインダー G6 L-CDR1 | <u>R A S Q D V S T A V A</u> | 169 |
| VEGF バインダー G6 L-CDR2 | <u>S A S F L Y S</u> | 170 |
| VEGF バインダー G6 L-CDR3 | <u>Q Q S Y T T P P T</u> | 171 |
| VEGF バインダー G6 | <u>G F T I S D Y W I H</u> | 172 |

10

20

30

40

50

| | | |
|--------------------------------------|---|-----|
| H-CDR1 (CCG) | | |
| VEGF バインダー G6 H-CDR2 (CCG) | <u>G I T P A G G Y T Y Y A D S V K G</u> | 173 |
| VEGF バインダー G6 H-CDR3 (CCG) | <u>F V F F L P Y A M D Y</u> | 174 |
| VEGF バインダー G6 H-CDR1 (Kabat) | <u>D Y W I H</u> | 175 |
| VEGF バインダー G6 H-CDR2 (Kabat) | <u>G I T P A G G Y T Y Y A D S V K G</u> | 176 |
| VEGF バインダー G6 H-CDR3 (Kabat) | <u>F V F F L P Y A M D Y</u> | 177 |
| VEGF バインダー G6 H-CDR1 (Chothia) | <u>G F T I S D Y</u> | 178 |
| VEGF バインダー G6 H-CDR2 (Chothia) | <u>T P A G G Y</u> | 179 |
| VEGF バインダー G6 H-CDR3 (Chothia) | <u>F V F F L P Y A M D Y</u> | 180 |
| VEGF バインダー B20 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQVIRRLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTITISLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIK | 181 |

10

20

30

40

50

| | | |
|--------------------------------|--|-----|
| 可変軽鎖 (VL) | | |
| VEGF バインダー B20 可変重鎖 (VH) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGL EWVGAITYPSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLLVTVSS | 182 |
| VEGF バインダー G6 可変軽鎖 (VL) | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIK | 183 |
| VEGF バインダー G6 可変重鎖 (VH) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGL EWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLLVTVSS | 184 |
| VEGF バインダー B20 軽鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQVIRRLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 185 |
| VEGF バインダー B20 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGL EWVGAITYPSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCD KTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPG | 186 |
| VEGF バインダー G6 軽鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 187 |
| VEGF バインダー G6 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGL EWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDK KTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPG | 188 |
| VEGF バインダー | DIQLTQSPSSLSASVGRVITTCASQDISNYLNWYQQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIK | 189 |

10

20

30

40

| | | | |
|---|--|-----|----|
| Ranibizumab 可変軽鎖 (VL) | | | |
| VEGF バインダー Ranibizumab 可変重鎖 (VH) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSS | 190 | |
| VEGF バインダー Ranibizumab (1Q) 可変重鎖 (VH) | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSS | 191 | 10 |
| VEGF バインダー Ranibizumab (6Q) 可変重鎖 (VH) | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSS | 192 | |
| VEGF バインダー Ranibizumab (70G) 可変軽鎖 (VL) | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIK | 193 | 20 |
| VEGF バインダー Ranibizumab (1Q/6Q) 可変重鎖 (VH) | QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSS | 194 | |
| VEGF バインダー Ranibizumab 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 195 | 30 |
| VEGF バインダー Ranibizumab 重鎖 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EWVWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKS CDKTHCTCPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG | 196 | 40 |

| | | | |
|--|---|-----|----|
| VEGF バインダー Ranibizumab (1Q) 重鎖 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EHWVWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PG | 197 | |
| VEGF バインダー Ranibizumab (6Q) 重鎖 | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EHWVWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PG | 198 | 10 |
| VEGF バインダー Ranibizumab (70G) 軽鎖 | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQKPGKAPK VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSFI FPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 199 | 20 |
| VEGF バインダー Ranibizumab (1Q/6Q) 重鎖 | QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGL EHWVWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PG | 200 | |
| TrkB バインダー-C2 L-CDR1 | <u>R T S E N V Y S N L A</u> | 201 | 30 |
| TrkB バインダー-C2 L-CDR2 | <u>A A S N L Q S</u> | 202 | |
| TrkB バインダー-C2 L-CDR3 | <u>Q H F W G S P F T</u> | 203 | |
| TrkB バインダー-C2 | <u>G Y T F T N Y D I I</u> | 204 | 40 |

| | | |
|--------------------------------------|---|-----|
| H-CDR1 (CCG) | | |
| TrkB バインダー-C2 H-CDR2 (CCG) | <u>Y I N P Y N D G T K Y N E K F K G</u> | 205 |
| TrkB バインダー-C2 H-CDR3 (CCG) | <u>L L K Y R R F R Y Y A I D Y</u> | 206 |
| TrkB バインダー-C2 H-CDR1 (Kabat) | N Y D I I | 207 |
| TrkB バインダー-C2 H-CDR2 (Kabat) | Y I N P Y N D G T K Y N E K F K G | 208 |
| TrkB バインダー-C2 H-CDR3 (Kabat) | L L K Y R R F R Y Y A I D Y | 209 |
| TrkB バインダー-C2 H-CDR1 (Chothia) | G Y T F T N Y | 210 |
| TrkB バインダー-C2 H-CDR2 (Chothia) | N P Y N D G | 211 |
| TrkB バインダー-C2 H-CDR3 (Chothia) | L L K Y R R F R Y Y A I D Y | 212 |
| TrkB バインダー-C2 (100C) 可変軽鎖 (VL) | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIAATYYCQH FWGSPFTFGCGTKLEIK | 213 |
| TrkB バインダー-C2 (44C) 可変重鎖 (VH) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYDIIWVRQAPGQCL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGTVTVSS | 214 |
| TrkB バインダー-C2 | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIAATYYCQH FWGSPFTFGCGTKLEIK | 215 |

10

20

30

40

50

| | | |
|-----------------------------------|--|-----|
| 可変軽鎖 (VL) | | |
| TrkB バインダーC2 可変重鎖 (VH) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYDI IWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TVTVSS | 216 |
| 6GS | GGSGGS | 217 |
| 10L1 | GGGGSGGGGS | 218 |
| 15L1 | GGGGSGGGSGGGGS | 219 |
| 20L1 | GGGGSGGGSGGGSGGGGS | 220 |
| 20L3 | GGSEGKSSGSGSESKSTGGS | 221 |
| TrkB バインダー VL-VH (44C/100C) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTF TISSLQPED IATYYCQH FWGSPFTFGCGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYDI IWVRQAPGQCLEWWMGYINP YNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCAR LLKYRRFRYYAIDYWGQGT TVTVSS | 222 |
| TrkB バインダー VH-VL (44C/100C) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYDI IWVRQAPGQCL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TVTVSSGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRTSENVYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTF TISSLQPED IATYYCQHFWS PFTFGCGTKLEIK | 223 |
| TrkB バインダー VL-VH | DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRTSENVYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTF TISSLQPED IATYYCQH FWGSPFTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYDI IWVRQAPGQGLEWWMGYINP YNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCAR LLKYRRFRYYAIDYWGQGT TVTVSS | 224 |
| TrkB バインダー VH-VL | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYDI IWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDGTYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARLLKYRRFRYYAIDYWGQGT TVTVSSGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRTSENVYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTF TISSLQPED IATYYCQHFWS PFTFGQGTKLEIK | 225 |
| 4GS | GGGS | 227 |

10

20

30

40

【 0 1 2 6 】

更なる実施態様では、本発明の結合分子又は TrkB 結合分子は、以下に開示される TrkB バインダーのいずれかに基づくことができる。これらのバインダーは、WO 第 2018 / 224630 号にも開示されている。

【 0 1 2 7 】

50

【表 2】

表2:

| | | |
|-------------------------------------|--|-----|
| TrkB バインダー 277 L-CDR1 | <u>K S S Q S L L Y S S N Q K N Y L A</u> | 228 |
| TrkB バインダー 277 L-CDR2 | <u>W A S T R E S</u> | 229 |
| TrkB バインダー 277 L-CDR3 | <u>Q Q Y Y S Y P Y T</u> | 230 |
| TrkB バインダー 277 H-CDR1 (CCG) | <u>G Y T F T G Y W M H</u> | 231 |
| TrkB バインダー 277 H-CDR2 (CCG) | <u>Y I N P S T D Y T E Y N Q K F K D</u> | 232 |
| TrkB バインダー 277 H-CDR3 (CCG) | <u>S R T G N Y</u> | 233 |
| TrkB バインダー 277 H-CDR1 (Kabat) | <u>G Y W M H</u> | 234 |
| TrkB バインダー 277 H-CDR2 (Kabat) | <u>Y I N P S T D Y T E Y N Q K F K D</u> | 235 |
| TrkB バインダー 277 H-CDR3 (Kabat) | <u>S R T G N Y</u> | 236 |

10

20

30

40

50

| | | |
|---|---|-----|
| TrkB バインダー 277 H-CDR1 (Chothia) | G Y T F T G Y | 237 |
| TrkB バインダー 277 H-CDR2 (Chothia) | N P S T D Y | 238 |
| TrkB バインダー 277 H-CDR3 (Chothia) | S R T G N Y | 239 |
| TrkB バインダー 277-gr_VL, (ヒト化) 可変軽鎖 | DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK | 240 |
| TrkB バインダー 277-gr_VH, (ヒト化) 可変重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGL EWMGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARSRTGNYWGQGTLLTVSS | 241 |
| TrkB バインダー 277-33_VL: (ヒト化) 可変軽鎖 | DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQQYYSYPYTFGGGTKLEIK | 242 |
| TrkB バインダー 277-33_VH, (ヒト化) 可変重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGL EWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMESSLTSED TAVYYCARSRTGNYWGQTTTVSS | 243 |

10

20

30

40

50

| | | |
|---|--|-----|
| TrkB バインダー 277-35_VL: (ヒト化) 可変軽鎖 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSYPYTFGGGKLEIK | 244 |
| TrkB バインダー 277-35_VH, (ヒト化) 可変重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYWMHWVRQRPGQGL EWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARSRGTGNYWGQGTTVTVSS | 245 |
| TrkB バインダー 277-42_VL, (ヒト化) 可変軽鎖 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSYPYTFGGGKLEIK | 246 |
| TrkB バインダー 277-42_VH, (ヒト化) 可変重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYWMHWVRQRPGQGL EWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARSRGTGNYWGQGTTVTVSS | 247 |
| TrkB バインダー 277-44_VL, (ヒト化) 可変軽鎖 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK | 248 |
| TrkB バインダー 277-44_VH, (ヒト化) 可変重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGL EWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLTSED TAVYYCARSRGTGNYWGQGTTVTVSS | 249 |

10

20

30

40

50

| | | |
|---|--|-----|
| TrkB バインダー 277-48_VL, (ヒト化) 可変軽鎖 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQQYYSYPYTFGGGTKLEIK | 250 |
| TrkB バインダー 277-48_VH, (ヒト化) 可変重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYWMHWVRQRPGQGL EWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARSRTGNYWGQTTVTVSS | 251 |
| TrkB バインダー 277-51_VL, (ヒト化) 可変軽鎖 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQQYYSYPYTFGGGTKLEIK | 252 |
| TrkB バインダー 277-51_VH, (ヒト化) 可変重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYWMHWVRQRPGQGL EWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRATLTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARSRTGNYWGQTTVTVSS | 253 |
| TrkB バインダー 277-64_VL, (ヒト化) 可変軽鎖 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQQYYSYPYTFGGGTKLEIK | 254 |
| TrkB バインダー 277-64_VH, (ヒト化) 可変重鎖 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGL EWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARSRTGNYWGQTTVTVSS | 255 |

10

20

30

40

50

| | | |
|--|---|------------|
| <p>TrkB バインダー</p> <p>277-67_VL,</p> <p>(ヒト化)</p> <p>可変軽鎖</p> | <p>DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK</p> | <p>256</p> |
| <p>TrkB バインダー</p> <p>277-67_VH,</p> <p>(ヒト化)</p> <p>可変重鎖</p> | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGL EWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARSRTGNYWGQGTTVTVSS</p> | <p>257</p> |

10

【 0 1 2 8 】

好ましい実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子（VEGF）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB（TrkB）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、ここで、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：201（CDR1）、配列番号：202（CDR2）及び配列番号：203（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖CDR並びに配列番号：204（CDR1）、配列番号：205（CDR2）及び配列番号：206（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDR又は配列番号：207（CDR1）、配列番号：208（CDR2）及び配列番号：209（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDR又は配列番号：210（CDR1）、配列番号：211（CDR2）及び配列番号：212（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDRを含み、ここで、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：145（CDR1）、配列番号：146（CDR2）及び配列番号：147（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖CDR並びに配列番号：148（CDR1）、配列番号：149（CDR2）及び配列番号：150（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDR又は配列番号：151（CDR1）、配列番号：152（CDR2）及び配列番号：153（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDR又は配列番号：154（CDR1）、配列番号：155（CDR2）及び配列番号：156（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDRを含む。

20

30

【 0 1 2 9 】

さらに好ましい実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子（VEGF）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB（TrkB）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、ここで、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：213又は215のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：214又は216のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含み、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：189又は193のアミノ酸配列と少なくとも80%、

40

50

81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：190、191、192又は194のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含む。

【0130】

さらに好ましい実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子（VEGF）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB（TrkB）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、ここで、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：213又は215のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：214又は216のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含み、ここで、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：189又は193のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：190、191、192又は194のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含む。

10

【0131】

さらに好ましい実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子（VEGF）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB（TrkB）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、ここで、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：213のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：214のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含み、ここで、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：193のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：191のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含む。

20

【0132】

さらに好ましい実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子（VEGF）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB（TrkB）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、ここで、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：213又は215のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：214又は216のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含み、ここで、軽鎖可変ドメインにおける軽鎖CDRは、sa配列番号：201（CDR1）、配列番号：202（CDR2）及び配列番号：203（CDR3）のアミノ酸配列からなり、重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：204（CDR1）、配列番号：205（CDR2）及び配列番号：206（CDR3）のアミノ酸配列からなり又は重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：207（CDR1）、配列番号：208（CDR2）及び配列番号：209（CDR3）のアミノ酸配列からなり又は重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：210（CDR1）、配列番号：211（CDR2）及び配列番号：212（CDR3）のアミノ酸配列からなり、ここで、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：189又は193のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のア

30

40

50

ミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：190、191、192又は194のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含み、ここで、軽鎖可変ドメインにおける軽鎖CDRは、配列番号：145(CDR1)、配列番号：146(CDR2)及び配列番号：147(CDR3)のアミノ酸配列からなり、重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：148(CDR1)、配列番号：149(CDR2)及び配列番号：150(CDR3)のアミノ酸配列からなり又は重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：151(CDR1)、配列番号：152(CDR2)及び配列番号：153(CDR3)のアミノ酸配列からなり又は重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：154(CDR1)、配列番号：155(CDR2)及び配列番号：156(CDR3)のアミノ酸配列からなる。

10

【0133】

さらに好ましい実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子(VEGF)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB(TrkB)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、ここで、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：213のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：214のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含み、ここで、軽鎖可変ドメインにおける軽鎖CDRは、配列番号：201(CDR1)、配列番号：202(CDR2)及び配列番号：203(CDR3)のアミノ酸配列からなり、重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：204(CDR1)、配列番号：205(CDR2)及び配列番号：206(CDR3)のアミノ酸配列からなり又は重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：207(CDR1)、配列番号：208(CDR2)及び配列番号：209(CDR3)のアミノ酸配列からなり又は重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：210(CDR1)、配列番号：211(CDR2)及び配列番号：212(CDR3)のアミノ酸配列からなり、ここで、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：193のアミノ酸配列のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：191のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖可変ドメインとを含み、ここで、軽鎖可変ドメインにおける軽鎖CDRは、配列番号：145(CDR1)、配列番号：146(CDR2)及び配列番号：147(CDR3)のアミノ酸配列からなり、重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：148(CDR1)、配列番号：149(CDR2)及び配列番号：150(CDR3)のアミノ酸配列からなり又は重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：151(CDR1)、配列番号：152(CDR2)及び配列番号：153(CDR3)のアミノ酸配列からなり又は重鎖可変ドメインにおける重鎖CDRは、配列番号：154(CDR1)、配列番号：155(CDR2)及び配列番号：156(CDR3)のアミノ酸配列からなる。

20

30

【0134】

一実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子(VEGF)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB(TrkB)に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、ここで、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：228(CDR1)、配列番号：229(CDR2)及び配列番号：230(CDR3)のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖CDR並びに配列番号：231(CDR1)、配列番号：232(CDR2)及び配列番号：233(CDR3)のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDR又は配列番号：234(CDR1)、配列番号：235(CDR2)及び配列番号：236(CDR3)のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDR又は配列番号：237(CDR1)、配列番号：238(CDR2)及び配列番号：239(CDR3)のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDRを含み、ここで、VEGFに特異

40

50

的に結合する抗原結合部位は、配列番号：145（CDR1）、配列番号：146（CDR2）及び配列番号：147（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる軽鎖CDR並びに配列番号：148（CDR1）、配列番号：149（CDR2）及び配列番号：150（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDR又は配列番号：151（CDR1）、配列番号：152（CDR2）及び配列番号：153（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDR又は配列番号：154（CDR1）、配列番号：155（CDR2）及び配列番号：156（CDR3）のアミノ酸配列を含むかもしくはそれらからなる重鎖CDRを含む。

【0135】

別の実施態様では、結合分子は、血管内皮増殖因子（VEGF）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位と、トロポミオシンレセプターキナーゼB（TrkB）に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、ここで、TrkBに特異的に結合する抗原結合部位は、軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインを含み、それぞれが、配列番号：240及び241、242及び243、244及び245、246及び247、248及び249、250及び251、252及び253、254及び255又は256及び257のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むか又はそれらからなり、ここで、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、配列番号：189又は193のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むか又はそれらからなる軽鎖可変ドメインと、配列番号：190、191、192又は194のアミノ酸配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むか又はそれらからなる重鎖可変ドメインとを含む。

【0136】

前述の実施態様のいずれかに関するさらに好ましい実施態様では、結合分子は、二重特異性かつ四価である。疑義を避けるために、本発明の結合分子をそれぞれのターゲットであるVEGF及びTrkBに結合させることにより、本発明の結合分子は、VEGFアンタゴニスト又はTrkBアゴニストそれぞれとして作用する。

【0137】

前述の実施態様のいずれかに関するさらに好ましい実施態様では、VEGFに特異的に結合する抗原結合部位は、免疫グロブリン（Ig）分子であり、TrkBに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、1つ以上のscFvを含む。

【0138】

前述の実施態様のいずれかに関するさらに好ましい実施態様では、1つ以上のscFvは、Ig分子の重鎖のC末端に融合している。

【0139】

前述の実施態様のいずれかに関するさらに好ましい実施態様では、VEGFに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、免疫グロブリン（Ig）分子、より好ましくは、IgGであり、TrkBに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位は、1つ以上のscFv、より好ましくは、2つのscFvを含む。

【0140】

本明細書に記載された抗体分子又は結合分子は、抗体分子の特性に所望の影響を有する他の分子実体に（融合タンパク質として）融合しているか又はそうでなければ（共有結合又は非共有結合により）連結されている場合がある。例えば、本明細書に記載された抗体又は結合分子の薬物動態特性、特に、一本鎖抗体又はドメイン抗体の場合、例えば、体液、例えば、血液中での安定性を改善するのが望ましい場合がある。これに関して、特に、

10

20

30

40

50

循環中のこのような抗体分子の半減期を延長するための多くの技術、例えば、ペグ化（WO第98/25971号；同第98/48837号；同第2004081026号）、血清タンパク質、例えば、アルブミンに対する親和性を有する別の抗体分子への抗体分子の融合もしくは他の共有結合（WO第2004041865号；WO第2004003019号）又は血清タンパク質、例えば、アルブミンもしくはトランスフェリンの全部もしくは一部との融合タンパク質としての抗体分子の発現（WO第01/79258号）が開発されてきた。

【0141】

抗体のFc領域は、多くの重要な機能的能力（「エフェクター機能」と呼ばれる）をもたらす多くのFcレセプターと相互作用するため、特定の実施態様では、抗体は、全長別紙又はFc領域の一部を含有する抗体である。後者は、抗体が抗原の関連部分とFcレセプター及び補体との両方に特異的結合を示す限りである。定常領域のタイプ及び長さの選択は、エフェクター機能、例えば、補体固定又は抗体依存性細胞媒介性細胞傷害が望ましい特徴であるかどうか及び抗体タンパク質の所望の薬理学的特性により決まる。

10

【0142】

本発明の実施態様では、scFv部分の安定性をscFv内にジスルフィド結合を形成するために、2つのシステイン残基を極めて3次元的に近接して組み込むことにより工場させることができる。操作されたジスルフィド結合を介して安定化を達成するために、これらの位置における残基は、好ましくは、システイン残基で置換される。

【0143】

添付の実施例において実証されているように、本発明者らは、N末端からC末端へのVL-VH配向を有するTrkB-scFvがTrkBシグナル伝達を活性化するために、本発明の結合分子において機能することができることを示した。N末端からC末端へのVH-VL配向を有するTrkB-scFvも機能することができるが、この配向では、活性が低下してしまう場合がある。したがって、本発明の好ましい実施態様は、順序がN末端からC末端へのVL-VHである場合である。

20

【0144】

本発明のさらに好ましい実施態様は、TrkBに特異的に結合する1つ以上のscFvがペプチドリンカー、好ましくは、約4~20個のアミノ酸の長さ（例えば、6、9、10、12又は15のいずれか1つ）を有するペプチドリンカーにより、VEGFに特異的に結合するIg分子（例えば、ヒトIgG1、IgG1(KO)、IgG1FcRnmut、IgG4Pro）に融合している。好ましくは、scFvは、Ig分子の重鎖のC末端に融合している。好ましくは、Ig分子は、IgGである。

30

【0145】

scFv分子をIgG分子の重鎖のC末端に連結させる方法又は可変ドメインをscFv分子に連結させる方法は、当技術分野において周知である。典型的には、グリシン及びセリンの小さなリンカー配列（GSミニリンカーと呼ばれる）のアミノ酸が使用される。リンカー中のアミノ酸の数は、4（GGGS）（配列番号：227）、6（GSGGS）（配列番号：217）、10（GGGSGGGGS）（配列番号：218）、15（GGGSGGGSGGGGS）（配列番号：219）、20（GGGSGGGSGGGGS）（配列番号：220）又はそれ以上で変動させることができる。実際には、通常、リンカーは、目的のIgGをコードする核酸分子（この場合、VEGF結合部位の重鎖の可変ドメイン及びIgGタイプの定常ドメインをコードする核酸を含むであろう）を、リンカー配列（例えば、5、10、15又は20個のアミノ酸のうちいずれか1つのGSミニリンカー、好ましくは、配列番号：218のリンカー）をコードする核酸分子により離間された所望のscFvをコードする核酸（この場合、TrkB結合部位についてのVL-VH配向又はVH-VL配向のいずれかの重鎖及び軽鎖の可変ドメインをコードする核酸を含むであろう）と組み合わせることにより形成される。ついで、以下でさらに説明されるように、この完全なHC-scFvコード核酸分子を発現ベクター内に配置し、適切な宿主細胞に導入して、完全なIgG重鎖-scFv単一ポリペプチ

40

50

ドが形成される。

【0146】

好ましくは、s c F V分子とI g G分子の重鎖のC末端との間のG Sミニリンカーは、1 0 L 1 (配列番号: 2 1 8)である。

【0147】

本発明の実施態様では、本発明における結合分子による補体産物C 1 q又はF cガンマレセプターへの結合が、2 3 4位及び2 3 5位においてLからAへの定方向突然変異誘発を有するI g G 4定常領域又はI g G 1定常領域の利用により除去される。

【0148】

本発明の実施態様では、本発明の結合分子は、可溶性F cガンマレセプター又は補体C 1 qによる意図しない架橋を回避するように操作されたF c領域又はその関連セクションを有する場合がある。一実施態様では、このような結合分子又は抗体変異体は、親抗体よりはるかに低いF cガンマレセプター及び補体C 1 qに対する親和性を有する(以下において、特に断りない限り、抗体分子の文脈における又はI g GもしくはF c領域の文脈における「親」という用語はそれぞれ、突然変異(操作)分子が由来する非操作抗体分子、F c領域又はI g Gを指す。したがって、本発明の実施態様は、I g分子が野生型F c領域と比較して、F cガンマレセプターもしくは補体レセプター又はその両方に対して低下した親和性を有するF c変異体を含むものである。このようなI g分子は、本明細書において、I g G 1 (K O)と呼ばれる。

【0149】

新生児F cレセプター(F c R n)とのその相互作用を最適化することにより、例えば、H 3 1 0 A位のC H 2ドメインにおける点突然変異又はH 4 3 5 A位での点突然変異により、血清レベル(半減期)を改変するように操作されたF c領域又はその関連セクションを含む結合分子も企図される。このようなI g分子は、本明細書において、I g G 1 F c R n m u tと呼ばれる。

【0150】

重鎖の他のI g G 4分子とのスワッピングを除去するI g G 4のヒンジ領域変異体を含むI g分子を含む結合分子がさらに企図される。このようなI g分子は、本明細書において、I g G 4 P r oと呼ばれる。

【0151】

本発明の更なる態様は、本発明の結合分子もしくは本発明の抗体分子をコードする単離された核酸分子又はこのような核酸分子を含む発現ベクターを提供する。

【0152】

一部の実施態様では、本発明の結合分子又は本発明の抗体分子は、抗体重鎖及び/又は軽鎖ポリペプチドを含む。当業者であれば理解することができるように、重鎖ポリペプチド、軽鎖ポリペプチド又は重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドをコードする核酸分子を容易に調製することができる。

【0153】

軽鎖及び重鎖をコードする核酸分子を、標準的な方法を使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)により化学的かつ酵素的に合成することができる。まず、合成遺伝子を生成するのに使用することができ、当技術分野において公知の方法(例えば、Gait, 1984)を使用して、適切なオリゴヌクレオチドを合成することができる。オリゴヌクレオチドから合成遺伝子を生成する方法は、当技術分野において公知である(例えば、Stemmer et al., 1995; Ye et al., 1992; Hayden et Mandecki, 1988; Frank et al., 1987)。

【0154】

本発明の核酸分子は、配列表に示されたポリペプチド配列をコードするD N A分子を含むが、これらに限定されない。また、本発明は、W O第2 0 0 7 / 0 4 2 3 0 9号に定義されているように、高ストリンジェンシー結合及び洗浄条件下で、配列表に示されたポリペプチド配列をコードするD N A分子にハイブリダイゼーションする核酸分子に関する。好ましい分子(m R N Aの観点から)は、本明細書に記載されたD N A分子のうちの1つ

10

20

30

40

50

と少なくとも75%又は80%(好ましくは、少なくとも85%、より好ましくは、少なくとも90%、最も好ましくは、少なくとも95%)の相同性又は配列同一性を有する分子である。例として、真核細胞における抗体の発現を考慮して、配列表に示されたDNA配列は、真核細胞におけるコドン使用頻度に一致するように設計されている。E. coli中で抗体を発現させるのが望ましい場合、これらの配列をE. coliコドン使用頻度に一致するように変更することができる。本発明のDNA分子の変異体を例えば、WO第2007/042309号に記載されているように、幾つかの異なる方法で構築することができる。

【0155】

本発明の更なる態様は、

(a) 以下の分子の発現を可能にする条件下で、本発明の宿主細胞を培養することと、

(b) 該分子を回収することと、場合により、

を含む、本明細書に記載された結合分子又は抗体分子の製造方法を提供する。

【0156】

本発明のこの態様の実施態様は、この製造方法が本発明の結合分子をさらに精製しかつ/又は修飾しかつ/又は製剤化する工程(c)をさらに含むものである。

【0157】

本発明の結合分子又は抗体を製造するために、全長軽鎖及び/もしくは重鎖又はそれらのフラグメントをコードするDNA分子は、配列が転写制御配列及び翻訳制御配列に操作可能に連結されるように、発現ベクター内に挿入される。

【0158】

本発明の結合分子又は抗体を製造するために、当業者であれば、当技術分野において周知の非常に多様な発現系、例えば、Kipriyanov and Le Gall, *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2004 Mar;7(2):233-42にレビューされた発現系から選択することができる。

【0159】

発現ベクターは、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、EBV由来エピソーム等を含む。発現ベクター及び発現制御配列は、宿主細胞と適合するように選択される。本明細書に記載された抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子又は結合分子の重鎖の遺伝子(例えば、そのC末端がscFv配列に付着した免疫グロブリン重鎖配列を含む遺伝子)を別々のベクター内に挿入することができる。特定の実施態様では、軽鎖配列及び重鎖配列の両方のDNA配列が、同じ発現ベクター内に挿入される。好都合なベクターは、機能的に完全なヒトCH又はCL免疫グロブリン配列をコードするものであり、上記されたように、任意のVH又はVL配列を容易に挿入し、発現させることができるように操作された適切な制限部位を有するものである。定常鎖は、通常、抗体軽鎖について、カッパ又はラムダであり、抗体重鎖については、任意のIgGアイソタイプ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)又はアレル変異体を含む他の免疫グロブリンである場合があるが、これらに限定されない。

【0160】

また、リコンビナント発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖(例えば、本明細書に記載された結合分子又は抗体の重鎖及び軽鎖)の分泌を促進するシグナルペプチドもコードすることができる。抗体鎖をコードするDNAを、シグナルペプチドが成熟抗体鎖DNAのアミノ末端にインフレームで連結されるようにベクター内にクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド又は非免疫グロブリンタンパク質由来の異種ペプチドである場合がある。代替的には、抗体鎖(例えば、本明細書に記載された結合分子又は抗体の重鎖及び軽鎖)をコードするDNA配列は、シグナルペプチド配列を予め含有することができる。

【0161】

抗体鎖(例えば、本明細書に記載された結合分子又は抗体の重鎖及び軽鎖)をコードするDNA配列に加えて、リコンビナント発現ベクターは、プロモーター、エンハンサー、終止シグナル及びポリアデニル化シグナル並びに宿主細胞における抗体鎖の発現を制御する他の発現制御エレメントを含むレギュラトリー配列を保有する。プロモーター配列(ほ

10

20

30

40

50

乳類細胞における発現のために例示される)についての例は、(CMV)由来のプロモーター及び/又はエンハンサー(例えば、CMVシミアンウイルス40(SV40)(例えば、SV40プロモーター/エンハンサー)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))、ポリオーマ並びに強力なほ乳類プロモーター、例えば、ネイティブな免疫グロブリンプロモーター及びアクチンプロモーターである。ポリアデニル化シグナルについての例は、BGHポリA、SV40後期又は初期ポリAであり、代替的には、免疫グロブリン遺伝子の3'UTR等を使用することができる。

【0162】

また、リコンビナント発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製をレギュレーションする配列(例えば、複製起点)及び選択可能なマーカー遺伝子を保有する場合がある。本明細書に記載された結合分子又は抗体の重鎖もしくはその抗原結合部分及び/又は軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子並びにこれらのDNA分子を含むベクターを宿主細胞、例えば、細菌細胞又は高等真核細胞、例えば、ほ乳類細胞内に、リポソーム媒介性トランスフェクション、ポリカチオン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、マイクロインジェクション、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション又はウイルスベクターによる移入を含む当技術分野において周知のトランスフェクション法に従って導入することができる。

10

【0163】

好ましくは、本明細書に記載された結合分子又は抗体の重鎖及び軽鎖をコードする核酸分子は、宿主細胞、好ましくは、ほ乳類細胞に同時トランスフェクトされる2つのベクター上に存在する。

20

【0164】

したがって、更なる態様は、本明細書に記載された結合分子又は抗体の、重鎖をコードする核酸分子を含む発現ベクター及び軽鎖をコードする核酸分子を含む発現ベクターを含む、宿主細胞を提供する。

【0165】

発現のための宿主として利用可能なほ乳類細胞系統は、当技術分野において周知であり、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣(CHO、CHO-DG44)細胞、NSO、SP2/0細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒトガン細胞(例えば、HepG2)、A549細胞、3T3細胞又は任意のこのような細胞系統の派生体/子孫を含む。ヒト、マウス、ラット、サル及びげっ歯類細胞系統を含む(が、これらに限定されない)他のほ乳類細胞又は酵母、昆虫及び植物細胞を含む(が、これらに限定されない)他の真核細胞又は原核細胞、例えば、細菌を使用することができる。本発明の結合分子は、宿主細胞における結合分子の発現を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することにより産生される。

30

【0166】

本明細書に記載された結合分子及び抗体分子は、好ましくは、分泌ポリペプチドとして培養培地から回収されるか又は例えば、分泌シグナルなしで発現される場合、宿主細胞のライゼートから回収される場合がある。本明細書に記載された結合分子又は抗体の実質的に均質な調製物が得られるように、リコンビナントタンパク質及び宿主細胞タンパク質に使用される標準的なタンパク質精製法を使用して、本明細書に記載された結合分子又は抗体分子を精製する必要がある。例として、本発明の結合分子及び抗体を得るのに有用な最新技術の精製法は、第1の工程として、培養培地又はライゼートからの細胞及び/又は微粒子細胞デブリの除去を含む。ついで、結合分子又は抗体は、夾雑可溶性タンパク質、ポリペプチド及び核酸から、例えば、免疫親和性又はイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、Sephadexクロマトグラフィー、シリカ又はカチオン交換樹脂でのクロマトグラフィーにより精製される。本明細書に記載されたVEGF及びTrkB単一結合分子を得るための工程における最終工程として、精製された結合分子を治療用途について以下に記載されるように、乾燥させ、例えば、凍結乾燥させることができる。

40

【0167】

50

本発明の更なる態様は、医薬に使用するための、本発明の結合分子を提供する。また、医薬におけるこの使用及び以下に記載される疾患の処置のための使用も、本発明の T r k B 結合分子、s c F v 及び抗体を含むと理解されたい。

【0168】

本発明の結合分子は、例えば、眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患の治療/処置における使用のために、好ましくは、神経/神経眼又は網膜の疾患の処置のために示される。更なる態様では、本発明は、眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患の治療及び/又は予防のための方法に関し、この方法は、ヒト(例えば、w A M D に患っているか又は地理状萎縮を発症するリスクがある個体)に有効量の本発明の結合分子を投与し、それにより、眼もしくは網膜の疾患又は神経変性疾患の1つ以上の症状を改善することを含む。

10

【0169】

「処置」及び「治療」等の用語は、本明細書で使用する場合、1つ以上の症状の緩和又は軽減、疾患又は障害の退行、それらの進行の遅延又は停止を含む(が、これらに限定されない)任意の臨床的に望ましい又は有益な効果をもたらす疾患又は障害の治療的及び予防的又はサプレッション的手段を含むことを意味する。このため、例えば、処置という用語は、疾患又は障害の症状の発症前又は発症後に結合分子を投与し、それにより、疾患又は障害の1つ以上の徴候を予防し又は除去することを含む。別の例として、この用語は、疾患の症状と闘うための、疾患の臨床症状発現後に結合分子を投与することを含む。さらに、処置が疾患の改善をもたらすか否かにかかわらず、投与が疾患又は障害の臨床パラメータ、例えば、組織傷害の程度又は転移の量もしくは程度に影響を及ぼす臨床症状の発症後及び臨床症状の発症後の結合分子の投与は、本明細書で使用する場合、「処置」又は「治療」を含む。さらに、本発明の組成物が、単独で又は別の治療剤と組み合わせて、結合分子を使用しない場合の症状と比較して、処置される障害の少なくとも1つの症状を軽減し又は改善する限り、その結果は、その障害の全ての症状が軽減されるかどうかにかかわらず、根底にある障害の有効な処置とみなされるべきである。

20

【0170】

本発明の結合分子を眼又は網膜の疾患を有するか又はそれを有するリスクがある対象に投与することができる。本発明は、さらに、眼又は網膜の疾患の予防及び/又は治療のための医薬の製造における結合分子の使用を提供する。本明細書で使用する場合、「対象」という用語は、例えば、ヒト及び非ヒトほ乳類、例えば、霊長類、げっ歯類及びイヌを含む、結合分子を投与することができる任意のほ乳類患者を意味する。本明細書に記載された方法を使用する処置が特に意図された対象は、ヒトを含む。結合分子を単独で又は他の組成と組み合わせて投与することができる。

30

【0171】

一実施態様では、本発明の結合分子は、黄斑変性症、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、網膜色素変性症、遺伝性網膜ジストロフィー、遺伝性黄斑ジストロフィー、近視性変性症、地図状萎縮症、加齢黄斑変性症に続発する地図状萎縮症、網膜動脈閉塞症、眼内炎、ブドウ膜炎、嚢胞様黄斑浮腫、任意の網膜疾患に続発する脈絡膜新生血管膜、視神経症、緑内障、網膜剥離、中毒性網膜症、放射線網膜症並びに外傷性網膜症、前駆型及び軽度から中等度のアルツハイマー病、アルツハイマー病を有する患者の疾患進行の遅延、ハンチントン病、パーキンソン病、大うつ病性障害、統合失調症、統合失調症に関連する認知障害の処置、減弱精神病症候群を有する個体における初発精神病の予防、統合失調症を有する患者における再発の予防、処置抵抗性うつ病、過食症、肥満又はメタボリックシンドロームの処置に使用される。

40

【0172】

好ましい実施態様では、本発明の結合分子は、w A M D の処置に有用性を有する。さらに好ましくは、本発明の結合分子は、w A M D の処置及び地理状萎縮の処置に有用性を有する。さらに好ましい実施態様では、本発明の結合分子は、加齢性黄斑変性症に続発する地図状萎縮の処置に有用性を有する。さらに好ましい実施態様では、本発明の結合分子は、地理状萎縮の処置又は地理状萎縮を発症するリスクがある患者の処置に有用性を有する

50

。さらに好ましい実施態様では、本発明の結合分子は、地理状萎縮の予防に有用性を有する。最も好ましい実施態様では、本発明の結合分子は、地理状萎縮を発症するリスクがある患者における w A M D の処置に有用性を有する。

【 0 1 7 3 】

別の実施態様では、本発明の結合分子は、難聴の処置、特にシスプラチン誘発性難聴並びに騒音性及び加齢性難聴の処置に有用である場合がある。

【 0 1 7 4 】

本発明の結合分子は、硝子体内、経口、非経口、皮下、腹腔内、肺内及び鼻腔内を含む、任意の適切な手段により投与される。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与を含む。加えて、本発明の結合分子は、パルス注入により、特に、用量を減らして適切に投与される。一態様では、投与は、投与が短期であるか又は慢性であるかに部分的に依存して、注射、最も好ましくは、静脈内注射又は皮下注射により提供される。好ましくは、本発明の結合分子は、眼への硝子体内注射により提供される。

【 0 1 7 5 】

更なる態様では、本発明の結合分子は、結合分子の投与に有用な装置、例えば、シリンジ、注射ペン又は他の装置と組み合わせて使用される。更なる態様では、本発明の結合分子は、例えば、結合分子の使用のための説明書を伴う添付文書も含む、パーツキットに含まれる。

【 0 1 7 6 】

本発明の結合分子及びそれを含む組成物の有効性を関与する具体的な疾患に応じて、それ自体公知の任意の適切な *in vitro* アッセイ、細胞ベースアッセイ、*in vivo* アッセイ及び/もしくは動物モデル又はそれらの任意の組み合わせを使用して試験することができる。適切なアッセイ及び動物モデルは、当業者に明らかであろうし、例えば、以下の実施例で使用されるアッセイ及び動物モデルを含む。

【 0 1 7 7 】

実際の医薬上有効量又は治療用量は、当然、当業者に公知の要因、例えば、患者の年齢及び体重、投与経路並びに疾患の重症度により決まるであろう。いずれにしも、本発明の結合分子は、患者の固有の状態に基づいて、医薬上有効量を送達することが可能となる用量及び様式で投与されるであろう。

【 0 1 7 8 】

本発明の結合分子をそれ自体で又は他の薬理学的に活性な成分、例えば、最新技術もしくは標準治療化合物と組み合わせて使用することができる。

【 0 1 7 9 】

したがって、本発明の更なる態様は、本発明の結合分子を薬学的に許容し得る担体及び場合により、1種以上の更なる有効成分と共に含む、医薬組成物を提供する。

【 0 1 8 0 】

結合分子の硝子体内注射のために、一般的には、処置の間のより長い間隔が好ましい。一実施態様では、本発明の結合分子は、6週間毎、好ましくは、7週間毎、また好ましくは、8週間毎、さらに好ましくは、9週間毎、より好ましくは、10週間毎、さらに好ましくは、11週間毎、より好ましくは、12週間毎に投与される。さらに好ましい実施態様では、TrkB抗体は、3か月に1回投与される。本発明の具体的な結合分子及びその具体的な薬物動態及び他の特性に応じて、投与頻度は、さらに長い、例えば、13週間毎、14週間毎、15週間毎、16週間毎、17週間毎、18週間毎、19週間毎又は20週間毎である場合がある。

【 0 1 8 1 】

代替的には、例えば、負荷用量を含む他の投与計画を適用することができ、ここで、本発明の結合分子を3つの負荷用量について毎月、ついで、12週間毎に注射することができる。同様に、投与頻度をこのような場合にも延長することができ、さらに長い、例えば、13週間毎、14週間毎、15週間毎、16週間毎、17週間毎、18週間毎、19週間毎又は20週間毎である場合がある。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 2 】

約 2 . 5 mg/眼の予想推定ヒト用量は、5 0 μLが眼内に注射されるであろう 5 0 mg/mL 製剤に相当する。

【 0 1 8 3 】

治療に使用するために、本発明の結合分子は、動物又はヒトへの投与を容易にするのに適した医薬組成物に製剤化される。本明細書に記載された結合分子又は抗体分子の典型的な製剤を、結合分子を生理学的に許容し得る担体、賦形剤又は安定剤と混合することにより、凍結乾燥もしくは何等かの乾燥製剤又は水溶液もしくは水性もしくは非水性懸濁液の形態に調製することができる。担体、賦形剤、修飾剤又は安定剤は、利用される用量及び濃度で無毒である。それらは、バッファー系、例えば、ホスファート、シトラート、アセタート並びに他の無機又は有機酸及びそれらの塩；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤、例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルアルコール又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルパラベン又はプロピルパラベン；カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3 - ペンタノール及び m - クレゾール；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドンもしくはポリエチレングリコール (P E G) ；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリシン；グルコース、マンノース、スクロース、トレハロース、デキストリンもしくはデキストランを含む単糖類、二糖類、オリゴ糖類もしくは多糖類及び他の炭水化物；キレート剤、例えば、E D T A ；糖アルコール、例えば、マンニトールもしくはソルビトール；塩形成カウンターイオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Z n - タンパク質錯体）並びに / 又はイオン性もしくは非イオン性界面活性剤、例えば、T W E E N (商標) (ポリソルベート) 、 P L U R O N I C S (商標) もしくは脂肪酸エステル、脂肪酸エーテルもしくは糖エステルを含む。また、有機溶媒、例えば、エタノール又はイソプロパノールも製剤中に含有させることができる。また、賦形剤は、放出修飾又は吸収修飾機能を有する場合もある。

【 0 1 8 4 】

通常、水溶液又は懸濁液が好ましいであろう。一般的には、治療用タンパク質、例えば、本発明の結合分子に適した製剤は、緩衝タンパク質溶液、例えば、適切な濃度（例えば、0 . 0 0 1 ~ 4 0 0 mg/ml、好ましくは、0 . 0 0 5 ~ 2 0 0 mg/ml、より好ましくは、0 . 0 1 ~ 2 0 0 mg/ml、より好ましくは、1 . 0 ~ 1 0 0 mg/ml）のタンパク質を含む溶液である。

【 0 1 8 5 】

ただし、上記与えられた成分及びその量は、1つの好ましい選択肢のみを表わすことは、当業者には明らかであろう。その代替形態及び変形形態は、当業者には直ちに明らかであろうし又は上記開示から出発して容易に想到することができる。

【 0 1 8 6 】

T r k B 結合分子

本発明の結合分子における T r k B 結合部位 (2 つの s c F v) の設計が、T r k B 結合及び活性化の最適な立体形成を明らかに支持するという驚くべき知見（これは、更なる抗原結合部位、例えば、V E G F 結合部位又は V E G F 誘発クラスター形成メカニズムとは無関係である場合がある）に基づいて、さらに、本発明は、2つの s c F v を含むか又はそれからなり、ここで、各 s c F v が T r k B に特異的に結合し、両方とも T r k B アゴニストとして作用する、T r k B 結合分子に関する。

【 0 1 8 7 】

理論に拘束されることを望むものではないが、本発明者らは、2つの s c F v を T r k B 結合分子内で組み合わせることにより、観察された完全な T r k B アゴニスト活性をもたらす最適な立体形成が達成されると考える。このため、一態様では、T r k B 結合分子は、完全な T r k B アゴニストであり、すなわち、T r k B 結合分子は、天然のリガンド

10

20

30

40

50

である BDNF と同様に TrkB の活性化に有効である。

【0188】

TrkB 結合分子中の 2 つの scFv 同士が結合して、TrkB 結合分子を形成していると理解される。TrkB 結合分子中の 2 つの scFv 同士が融合しているか又はそうでなければ共有結合している場合がある。代替的には、2 つの scFv は、ペプチドリンカー、好ましくは、例えば、約 4 ~ 20 個のアミノ酸の長さを有するペプチドリンカー、より好ましくは、フレキシブルペプチドリンカーを介して連結されている場合がある。

【0189】

TrkB 結合分子中の各 scFv は、TrkB タンパク質内の同じか又は異なるエピトープに結合することができる。好ましくは、両方の scFv が、同じ TrkB エピトープに結合する。

10

【0190】

TrkB 結合分子中の scFv は、N 末端から C 末端に向かって、VH ドメイン（例えば、マウス、ヒト化又はヒト VH ドメイン）、リンカー及び VL ドメイン（例えば、マウス、ヒト化又はヒト VL ドメイン）又はその逆に、VL ドメイン、リンカー及び VH ドメインを含むことができる。好ましくは、TrkB 結合分子中の scFv は、N 末端から C 末端への VL - VH 配向を有する。

【0191】

加えて、一本鎖 Fv フラグメントを、システイン残基の取り込みを介して、VH ドメインと VL ドメインとの間、VH ドメイン内又は VL ドメイン内のジスルフィド結合の取り込みによりさらに安定化させることができる。N 末端という用語は、ポリペプチド鎖の最初のアミノ酸を示す。一方、C 末端という用語は、ポリペプチド鎖の C 末端の最後のアミノ酸を示す。したがって、一実施態様では、一方又は両方の scFv は、ジスルフィド結合を形成するための追加のシステイン残基を含む。

20

【0192】

さらに関連する態様では、TrkB 結合分子は、Ig 分子をさらに含むことができる。この点において、Ig 分子は、モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラ抗体、抗体のフラグメント、例えば、Fv、Fab、Fab' 又は F(ab')₂ フラグメント、一本鎖抗体、例えば、一本鎖可変フラグメント (scFv)、小モデュラー免疫薬 (SMIP)、ドメイン抗体、ナノボディ又はダイアボディであることができる。

30

【0193】

更なる Ig 分子を加えることにより、完全な TrkB アゴニスト効果を達成するための TrkB 結合分子内の 2 つの scFv の最適な立体形成が支持される。この効果は、TrkB 結合分子の立体形成に基づくものであり、Ig 分子の特異性に基づくものではないため、Ig 分子の特異性に依存しないと考えられる。したがって、Ig 分子を任意のターゲットに結合するように設計することができる。観察された完全なアゴニスト効果は、主に、TrkB 結合分子内の scFv の立体形成に基づいていると考えられるため、Ig 分子は、任意のターゲットに特異的に結合しない場合もあるということになる。

【0194】

40

さらに好ましい実施態様では、Ig 分子は、Fc 領域を含むか又はそれからなる。好ましくは、この実施態様では、各 scFv は、Fc 領域の重鎖の C 末端に融合している。この実施態様に関する更なる実施態様では、各 scFv は、ペプチドリンカー、好ましくは、約 4 ~ 20 個のアミノ酸の長さを有するペプチドリンカーにより、Fc 領域に融合している。

【0195】

また、ここで、TrkB 結合分子中の 2 つの scFv 及び Ig 分子同士が結合して、TrkB 結合分子を形成していると理解される。scFv は、Ig 分子に直接融合しているかもしくはそうでなければ共有結合している場合があり又はそれらは、リンカー、好ましくは、例えば、約 4 ~ 20 個のアミノ酸の長さを有するペプチドリンカー、より好ましく

50

は、フレキシブルペプチドリンカーを介して I g 分子に連結されている場合がある。

【0196】

好ましくは、s c F v は、I g 分子の重鎖の C 末端に融合している。好ましくは、I g 分子は、I g G、F (a b) 又は F (a b ')₂ である。したがって、好ましい実施態様では、T r k B 結合分子は、2つの s c F v 及び I g G、F (a b) 又は F (a b ')₂ を含むか又はそれらからなり、ここで、各 s c F v は、T r k B に特異的に結合する。関連する好ましい実施態様では、T r k B 結合分子は、二重特異性かつ四価であり、2つの s c F v 及び 1つの I g G 又は F (a b ')₂ を含むか又はそれらからなり、ここで、各 s c F v は、T r k B に特異的に結合する。好ましい実施態様では、I g 分子、より好ましくは、I g G、F (a b) 又は F (a b ')₂ は、V E G F に特異的に結合する。

10

【0197】

s c F v 分子を I g 分子、例えば、I g G 分子等の重鎖の C 末端に連結させる方法又は可変ドメインを s c F v 分子に連結させる方法は、当技術分野において周知である。典型的には、グリシン及びセリンの小さなリンカー配列 (G S ミニリンカーと呼ばれる) のアミノ酸が使用される。リンカー中のアミノ酸の数は、4 (G G G S) (配列番号 : 2 2 7)、6 (G G S G G S) (配列番号 : 2 1 7)、10 (G G G G S G G G G S) (配列番号 : 2 1 8)、15 (G G G G S G G G G S G G G G S) (配列番号 : 2 1 9)、20 (G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S) (配列番号 : 2 2 0) 又はそれ以上で変動させることができる。実際には、通常、リンカーは、目的の I g をコードする核酸分子を、リンカー配列 (例えば、5、10、15 又は 20 個のアミノ酸のうちのいずれか 1つの G S ミニリンカー、好ましくは、配列番号 : 2 1 8 のリンカー) をコードする核酸分子により離間された所望の s c F v をコードする核酸 (この場合、T r k B 結合部位についての V L - V H 配向又は V H - V L 配向のいずれかの重鎖及び軽鎖の可変ドメインをコードする核酸を含むであろう) と組み合わせることにより形成される。ついで、先で説明されたように、この完全な H C - s c F v コード核酸分子を発現ベクター内に配置し、適切な宿主細胞に導入して、完全な I g 重鎖 - s c F v 単一ポリペプチドが形成される。

20

【0198】

好ましくは、s c F v 分子と I g 分子の重鎖の C 末端との間の G S ミニリンカーは、10 L 1 (配列番号 : 2 1 8) である。

【0199】

一態様では、T r k B 結合分子は、天然の T r k B リガンドである B D N F より、T r k B 下流シグナル伝達経路の活性化を強力に誘引する。更なる態様では、T r k B 結合分子は、B D N F のものと同等のパターンで、T r k B 媒介性シグナル伝達経路を介して遺伝子発現をレギュレーションする。

30

【0200】

更なる態様では、T r k B 結合分子は、T r k B リン酸化及び / 又は活性化に特異的であり、T r k A 又は T r k C を非特異的にリン酸化せず / 活性化しない。

【0201】

一実施態様では、T r k B 結合分子は、
 (i) それぞれが N 末端から C 末端に向かって、
 - (場合により) 重鎖可変ドメイン (例えば、マウス、ヒト化又はヒト V H ドメイン)
 - 好ましくは、I g G (例えば、ヒト I g G 1 又は I g G 4) の定常ドメイン
 - (場合により) ペプチドリンカー (例えば、G S ミニリンカー) 及び
 - T r k B に特異的な s c F v (例えば、N 末端から C 末端への V H ドメイン (例えば、マウス、ヒト化又はヒト V H ドメイン) を含む s c F v)、リンカー及び V L ドメイン (例えば、マウス、ヒト化又はヒト V L ドメイン) 又はその逆に、V L ドメイン、リンカー及び V H ドメイン
 含む 2つの重鎖と、

40

(i i) それぞれが N 末端から C 末端に向かって

(場合により) 軽鎖可変ドメイン (例えば、マウス、ヒト化又はヒト V L ドメイン)、

50

好ましくは、I g Gの軽鎖定常ドメイン（例えば、ヒトカッパ鎖）を含む2つの軽鎖とを含むか又はそれらからなる。

【0202】

ここから、本発明を、下記非限定的な実施例により説明する。

【0203】

実施例

方法

T r kレセプターを発現するC H O細胞の培養

ヒトT r k Bレセプターを発現するC H O細胞（ThermoFisher Scientific, #K1491）及びヒトT r k A又はT r k Cレセプターを発現するカスタマイズされたC H O細胞を、10% ウシ胎児血清、glutamax、非必須アミノ酸、20mM H E P E S、5 μg/mL プラストサイジン及び200 μg/mL ゼオシンを補充したD M E M（Lonza, #BE12-604F）中で培養した。カニクイザル、ウサギ又はラットT r k Bレセプターを発現するカスタマイズされたC H O細胞を、Hams F12（Lonza #BE12-615F）と、5% ウシ胎仔血清、8mM グルタミン、0.5 mg/mL G 4 1 8を含むD M E M（Lonza #BE12-604F）との1：1混合物中で培養した。マウスT r k Bレセプターを発現するカスタマイズされたC H O細胞を、10% ウシ胎仔血清、glutamax、10mM H E P E S及び0.8 mg/mL G 4 1 8を補充したD M E M（Lonza #BE12-604F）で培養した。

【0204】

ヒト、カニクイザル、ウサギ、ラット又はマウスT r kレセプターを発現するC H O細胞におけるT r k A / B / C及びE R K 1 / 2リン酸化の分析

各T r kレセプターを発現する5000個のC H O細胞を、384ウェル透明組織培養プレート（BD Falcon, #353963）の各キャピティに播種し、37℃及び5% C O 2での加湿インキュベーター中でインキュベーションした。播種の24時間後、細胞の上清を室温飢餓培地（0.1% B S A（Sigma, #A-3059）を含むが、他に補充しないD M E M）で置き換えた。15分後、上昇する濃度のヒトB D N F（R&D #248-BD又はBachem #H-5594）、ヒトN G F（Biovision #4303R-20）、ヒトN T - 3（Sigma #N1905）、アゴニスト性抗体又はアイソタイプ対照を含む飢餓培地を室温において45分間トリプテートで加えて、T r k B及びE R K 1 / 2リン酸化を刺激した。飢餓培地単独を対照とした。

【0205】

一部の実験では、B D N F又はアゴニスト性抗体を細胞の刺激の前に、2、10、50又は200 ng/mL ヒトV E G F（R&D Systems #293-VE-050）の有無で、1時間プレインキュベーションした。これらの実験では、ヒトV E G F単独とのインキュベーションを対照とした。

【0206】

アゴニスト性T r k B抗体が、T r k BのB D N F誘発リン酸化及び/又は下流E R K 1 / 2リン酸化を制限するか否かを分析するために、ヒトT r k Bレセプターを発現するC H O細胞をB D N Fなし又は一定濃度の0.3 nM、1 nMもしくは3 nM B D N Fで、上昇する濃度の抗体と共にインキュベーションした。

【0207】

刺激後、細胞上清を除去し、細胞を、完全ミニプロテアーゼ阻害剤錠剤（Roche #04693124001）並びにホスファターゼ阻害剤カクテル2（Sigma #P5726）及び3（Sigma #P0044）並びに1mM P M S F（Sigma #93482）を補充した溶解バッファー（1×T r i t o n溶解バッファー（Cell Signaling Technology #9803-S）中において、ウェットアイス上で20分間溶解させた。得られたライゼートを製造業者の説明書に従って、市販のアッセイ（Perkin Elmer #ALSU-PTRKAB-A10K）を使用する、Y 6 8 0 / 6 8 1でのT r k Aリン酸化、Y 7 0 6 / 7 0 7でのT r k Bリン酸化又はY 7 0 9 / 7 1 0でのT r k Cリン酸化の定量に使用した。T 2 0 2 / Y 2 0 4（E R K 1）及びT 1 8 5 / Y

10

20

30

40

50

187 (ERK2) での ERK1/2 リン酸化の定量を製造業者の説明書に従って、別の市販のアッセイ (Perkin Elmer #TGRES10K 又は ALSU-PERK-A10K) を使用して同様に行った。リン酸化事象を反映するアクセプタービーズの発光を Perkin Elmer EnVision マイクロプレートリーダーにおいて、570 nm で記録した。生データ (平均 ± SEM) 及び非線形回帰 (log (アゴニスト) 対応答 (3つのパラメータ)) を含むデータを GraphPad Prism (バージョン 8) による提示のために作成した。

【0208】

TrkB 細胞外ドメイン (TrkB-ECD) の機能的特徴

ヒト TrkB を安定に発現する CHO 細胞を上昇する濃度の TrkB-ECD (R&D Systems #1494-TB) を伴う、上昇する濃度の天然のリガンドである BDNF 又は 10 nM BDNF と共にインキュベーションした。TrkB 活性化を、上記概説された Y706 / 707 での TrkB リン酸化を測定することにより評価した。データは、平均 + / - SEM を表わす。

10

【0209】

TrkB レセプターの内部移行アッセイ

刺激の 24 時間前に、25000 個のヒト TrkB レセプターを発現する CHO 細胞を、96 ウェル黒色透明底部組織培養プレート (PerkinElmer, #6055300) の各キャビティに播種し、37 °C 及び 5% CO₂ の加湿インキュベーター中でインキュベーションした。CHO / hTrkB 細胞の上清を飢餓培地 (0.1% BSA (Sigma, #A-3059) 及び 20 mM Hepes (Lonza, #BE17-737F) を含む DMEM) で置き換え、細胞を 37 °C で 30 分間インキュベーションした。ついで、細胞を、上昇する濃度の BDNF (R&D #248-BD 又は Bachem #H-5594) 又はアゴニスト性 TrkB 抗体単独又は 1 nM BDNF と飢餓培地中の上昇する濃度のアゴニスト性抗体との組み合わせで、37 °C において 50 分間刺激した。細胞を 4% パラホルムアルデヒド中で 20 分間固定し、洗浄し、PBS 中の 5% 正常口バ血清中において 1 時間ブロッキングし、1 µg/mL ヤギ抗 TrkB 抗体 (R&D Systems, #AF-397) と共に、室温で一晩インキュベーションし、続けて、徹底的に洗浄し、2 µg/mL AlexaFluor 647 口バ抗ヤギ抗体 (ThermoFisher Scientific, #A21447) 及び 1 µg/mL Hoechst #H3570 中において、室温で 2 時間インキュベーションした。徹底的な洗浄後、細胞を PBS / 0.05% Tween-20 中の 2 µg/mL HCS-Cellmask green (ThermoFisher Scientific, #H32714) で 1 時間染色した。細胞表面レセプターを、20 × 水対物レンズを備えた PerkinElmer Opera Phenix High Content Screening System で撮像し、PerkinElmer Harmony High-Content Imaging and Analysis ソフトウェアで分析した。データを、蛍光閾値を上回る細胞の割合の高低をそれぞれ表わすヒートマップの暗視野及び明視野を有するヒートマップとして又は閾値を上回る表面 TrkB 染色強度を有する細胞の割合を表わす図としてのいずれかで提示する。後者の場合、生データ (平均 ± SEM) 及び非線形回帰 (log (アゴニスト) 対応答 (3つのパラメータ)) を含むデータを GraphPad Prism (バージョン 8) による提示のために作成した。

20

30

【0210】

VEGF 誘発 VEGF レセプター 2 リン酸化及び下流シグナル伝達の阻害

40

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC; Cell Systems #ACBR1181) を、サプリメント (Promocell #C-39210) 及び 10 U/mL ペニシリン / ストレプトマイシンそれぞれを含む内皮細胞基礎培地 (Promocell #C-22210) 中においてゼラチン (Millipore #ES-006B) 被覆プレート上で培養した。VEGF 捕捉の分析のために、12000 個の細胞を、通常の増殖培地を使用して、96 ウェル透明組織培養プレートの各キャビティに播種し、37 °C 及び 5% CO₂ での加湿インキュベーター中でインキュベーションした。24 時間後、培地を飢餓培地 (0.1% BSA (Sigma, #A-3059) 及び 10 U/mL ペニシリン / ストレプトマイシンを補充した Promocell #C-22210) で置き換え、細胞を 37 °C 及び 5% CO₂ での加湿インキュベーター中で 20 時間飢餓状態にした。VEGF R2 シグナル伝達の刺激前に、50 ng/mL ヒト VEGF (R&D Systems #293-VE-050)

50

を、アンタゴニスト性抗体又はEyleaの有無で、室温において飢餓培地中で30～60分間プレインキュベーションし、ついで、37℃に15分間予め温めた。細胞刺激を、予め形成されたVEGF-抗体/Eylea複合体又はVEGF単独を細胞に加えることにより、37℃に温めたプレート上において5分間で達成した。飢餓培地単独を対照とした。細胞を溶解バッファー(Perkin Elmer #ALSU-PVGFR-A500)中において、室温で10分間溶解し、ついで、氷上でさらに10分間インキュベーションした。製造業者の説明書に従い、市販のアッセイを使用して、Y1175でのVEGFR2リン酸化(Perkin Elmer #ALSU-A500又は#ALSU-PVGFR-A10K)、Y951でのVEGFR2リン酸化(Perkin Elmer #ALSU-PVGFR-B500)、T202/Y204(ERK1)及びT185/Y187(ERK2)でのERK1/2リン酸化(Perkin Elmer #TGRES10K又はALSU-PERK-A10K)、Y419でのSrcリン酸化(Perkin Elmer #ALSU-PSRC-A10K)、Thr180/Tyr182でのp38-MAPKリン酸化(Perkin Elmer #ALSU-PP38-B500)を定量した。上記言及されたリン酸化事象を反映するアクセプタービーズの発光をPerkin Elmer EnVisionマイクロプレートリーダーにおいて、570nmで記録し、生データ(平均±SEM)及び非線形回帰(log(アゴニスト)対応答(3つのパラメータ))を含むデータをGraphPad Prism(バージョン8)による提示のために作成した。

10

【0211】

二重特異性かつ四価のDoppelmaabによるVEGF捕捉に対するTrkB結合の影響を調べるために、VEGF誘発VEGFR2リン酸化の阻害をTrkB-ECDの非存在下又は存在下で、飢餓状態のHRMECにおいて評価した。刺激前に、上昇する濃度の各Doppelmaabを100nM TrkB-ECD(R&D Systems #1494-TB)と共に、飢餓培地中において、室温で1時間インキュベーションし、続けて、50ng/mLヒトVEGFと共にさらに1時間インキュベーションした。対照として、HRMECを(i)飢餓培地単独、(ii)50ng/mLヒトVEGF、(iii)50ng/mLヒトVEGFと上昇する濃度のTrkB-ECDとの予め形成された複合体(室温で1時間)、(iv)50ng/mLヒトVEGFと上昇する濃度の各Doppelmaabとの予め形成された複合体(室温で1時間)及び(v)上昇する濃度のTrkB-ECD単独と共にインキュベーションした。VEGF-Aの捕捉を上記概説されたように、Y1175でのVEGFレセプター2(VEGFR2)リン酸化を測定することにより評価した。

20

30

【0212】

VEGF誘発HRMEC増殖の阻害

3000個のHRMECを、サプリメント(Promocell #C-39210)及び10U/mLペニシリン/ストレプトマイシンを含む内皮細胞基礎培地(Promocell #C-22210)を使用して、透明平底96ウェルプレートの各キャビティに播種し、37℃及び5%CO₂の加湿インキュベーター中でインキュベーションした。16時間後、増殖培地を飢餓培地(2%ウシ胎児血清を補充した内皮細胞基礎培地(Promocell #C-22210))で置き換え、細胞を37℃、5%CO₂での加湿インキュベーター中において、8時間飢餓状態にした。刺激前に、ヒトVEGF(R&D Systems #293-VE-050)を、アンタゴニスト性抗体又はEyleaの有無で、室温において飢餓培地中で60分間プレインキュベーションした。細胞刺激を、予め形成されたVEGF-抗体/Eylea複合体又はVEGF単独を細胞に加えることにより行った。飢餓培地単独を対照とした(ベース増殖)。細胞増殖を総HRMEC核面積の自動位相コントラスト画像ベース定量化により評価した(Essen Bioscience, IncuCyte S3)。総HRMEC核面積は、HRMEC数に比例すると考えられた。ウェル当たり4つの画像を4時間毎に、10×対物レンズを使用して、合計96時間記録した。データは、時間の関数としての相対細胞数(時点tでの細胞数/t=0での細胞数)を表わし、t=0での細胞数を1に設定した。一部の試験では、各増殖曲線とベース成長曲線(飢餓培地中での増殖)との間の面積を、各化合物濃度の10を底とする対数に対してプロットした。必要に応じて、生データ(平均±SEM)及び非線形回帰(log(アゴニスト)対応答(3つのパラメータ))を含むデータをGraphPad Prism(バージョン

40

50

ョン 8) による提示のために作成した。

【 0 2 1 3 】

V E G F 誘発 H R M E C 発芽の阻害

V E G F 誘発発芽の阻害を、H R M E C に基づくスフェロイドアッセイにおいて評価した。H R M E C を、2 0 % Methocoel (内皮基礎培地中の 1 . 2 % メチルセルロース及び 1 0 % ウシ胎児血清) を含有する通常の増殖培地に再懸濁させ、5 0 0 個の H R M E C を含有する滴 2 5 μ l を正方形ペトリ皿に適用した。プレートを上下逆さまにして、細胞を吊り下げた滴中で培養した。これにより、スフェロイドの自発的な形成が可能となった。2 4 時間後、スフェロイドを収集し、4 8 ウェルプレートにおいて、Methocoel - コラーゲン混合物 (M 1 9 9 培地中の 3 mg/mL ラットテールコラーゲン I (Corning # 3 5 4 2 3 6) と混合した、8 0 % Methocoel 及び 2 0 % F C S 1 : 1) に包埋し、3 7 及び 5 % C O ₂ での加湿インキュベーター中で 3 0 分間インキュベーションして、コラーゲン重合を達成した。刺激前に、ヒト V E G F (R & D Systems # 2 9 3 - V E - 0 5 0) を、2 % ウシ胎児血清を補充した基礎内皮増殖培地中において、アンタゴニスト性抗体又は Eylea の有無で、室温において 6 0 分間プレインキュベーションした。発芽の刺激を、予め形成された V E G F - 抗体 / Eylea 複合体又は V E G F 単独をスフェロイドに 2 4 時間加えることにより行った。2 % ウシ胎児血清を補充し、V E G F を含まない基礎内皮増殖培地を対照とした。4 % パラホルムアルデヒド中に固定した後、細胞を徹底的に洗浄し、0 . 2 % Triton X - 1 0 0 を含有する P B S 中の 2 μ g/mL HCS - Cellmask green (ThermoFisher Scientific, # H 3 2 7 1 4) で一晩染色した。スフェロイドを ZEISS LSM 7 8 0 共焦点顕微鏡で分析した。H R M E C の三次元発芽を Z スタックの最大投影画像から、手作業で定量化し、スフェロイド当たりの累積発芽長 (mm) として表わすか又は Zeiss ZEN 撮像ソフトウェアで半自動化し、スフェロイド外周長 (ピクセル) として表わすかのいずれかをした。データを GraphPad Prism (バージョン 8) による提示のために作成し、平均 + / - S E M を表わす。

【 0 2 1 4 】

網膜電図

一般的な手法

網膜電図 (E R G) は、種々の網膜ニューロンの光誘発電氣的活動を評価するための非侵襲的電気生理学的技術であり、これにより、網膜機能の種々の態様、例えば、薄暗い光又は色覚を定量することが可能となる。E R G は、Espion E 3 E R G 記録システム (Diagnosys LLC) を使用して、角膜と参照電極との間の電位変化として測定した。E R G 記録前に、動物を少なくとも 2 時間暗順応させ、ケタミン (Ketanest、約 1 0 0 mg/kg) 及びキシラジン (Rompun、約 7 mg/kg) の i . p . 注射により麻酔した。動物を、体温を 3 7 $^{\circ}$ C で一定に保つため、加熱したステージに置いた。瞳孔を局所トロピカミド及び 1 0 % フェニレフリンで拡張させた。角膜に 2 % Methocel 溶液 (OmniVision) の滴を載せて、記録中に角膜眼が乾燥しないようにした。記録を、金ループ電極を使用して、両眼で行った。参照電極を Methocel で湿らせ、動物の頬に取り付けた、歯のないワニ口クリップとした。電氣的接地のために、クリップを動物の尾部に取り付けた。E R G シグナルを 1 kHz でサンプリングし、0 . 1 5 Hz の低周波数及び 5 0 0 Hz の高周波カットオフを使用して記録した。光刺激は、発光ダイオードのセット又はキセノン電球 (1 cd \cdot s / m² 以上のフラッシュの場合) により発せられる全視野フラッシュ (持続時間約 4 ms) からなされた。全てのフラッシュを暗所又はバックグラウンド光のいずれかにおいて、Ganzfeld 刺激装置 (ColorDome; Diagnosys) により発生させた。

【 0 2 1 5 】

E R G プロトコール

まず、E R G 応答を暗順応動物 (桿体駆動応答を単離するため) から記録し、続けて、赤色バックグラウンド光 (5 0 cd/m²、紫外線錐体駆動 E R G 応答を単離するため) に順応させた動物から記録し、最後に、緑色 - 青色バックグラウンド光 (2 5 . 5 cd/m²、M 錐体駆動 E R G 応答を単離するため) に順応させた。

10

20

30

40

50

【0216】

暗順応 E R G の場合、応答を $1 \cdot 10^{-5} \sim 100 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ の範囲の一連の閃光により誘発した。 $1 \cdot 10^{-5}$ 及び $3 \cdot 10^{-5} \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ の輝度を有するフラッシュについて、20 回の試行の応答を平均した。 $0.05 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ までの $1 \cdot 10^{-4}$ 間のフラッシュについて、10 回の試行の応答を平均し、 $0.1 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ のフラッシュについて、8 回の試行の応答を平均し、 $1 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ のフラッシュについて、5 回の試行を平均した。 $10 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ の最後のフラッシュについて、3 回の試行の反応を記録し、 $100 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ の最後のフラッシュについて、1 回のフラッシュを記録した。

【0217】

個々のフラッシュ間の間隔を網膜が各フラッシュから完全に回復する（フラッシュにより誘発される応答振幅の低下又は暗示時間の短縮の兆候はない）ことを確実にするように選択した。これらの基準に基づいて、フラッシュ間の間隔を $1 \cdot 10^{-5}$ 及び $3 \cdot 10^{-5} \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ のフラッシュについて 2 秒、 $0.05 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ までの $1 \cdot 10^{-4}$ 間のフラッシュについて 5 秒、 $0.1 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ のフラッシュについて 10 秒及び $1 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ のフラッシュについて 20 秒とした。 $10 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 及び $100 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ の 1 回のフラッシュ後、それぞれ 30 秒及び 120 秒の回復期間を取った。

【0218】

UV 錐体駆動及び M 錐体駆動応答の記録のために、まず、動物を赤色バックグラウンド光に、その後、緑色バックグラウンド光に 2 分間光適応させた。光応答を 0.02 、 0.04 、 0.08 、 0.17 、 0.35 、 0.83 、 1.66 、 2.90 及び $4.15 \mu\text{W}/\text{m}^2$ それぞれの UV フラッシュ及び $0.1 \sim$ 最大 $110 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ のフラッシュの M 錐体フラッシュにより誘発した。10 回の試行の全ての応答を、3 秒のフラッシュ間隔で平均した。

【0219】

動物及び S T Z 処置

オスの Brown Norway ラット (BN ラット) を Charles River (Germany) から入手した。高血糖を S T Z の i . p . 注射 ($65 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重) により誘発した。試験には、応答しない動物又は応答が不十分な動物、すなわち、S T Z 適用後 7 日目の血糖濃度が 20 mM 未満の動物を含めなかった。体重及び血糖値を定期的にモニターした。S T Z を硝子体内投与の約 3 週間前に投与した。

【0220】

用量及び硝子体内注射

i v t 注射のために、ラットを $2.5 \sim 3\%$ イソフルラン (Forene; Abbvie) で麻酔した。局所麻酔のために、 $4 \text{ mg}/\text{mL}$ オキシブプロカイン塩酸塩 (Novesine; Omnivision) の滴を投与した。 $5 \mu\text{L}$ を、($10 \mu\text{L}$ の Hamilton ガラスシリンジに取り付けた) 34 ゲージ針により、各眼の角膜縁のすぐ後ろの硝子体内に注射した。

【0221】

データ分析

E R G を、Espion E3 E R G 記録システム (Diagnosys LLC) を使用して、角膜と参照電極との間の電位変化として測定した。

【0222】

Matlab ソフトウェアを使用して計算する前に、種々のセットの各 E R G フラッシュが一貫していることを証明した。その後、各フラッシュから平均曲線を計算した。

【0223】

E R G a / b 波振幅を決定するために、E R G データを処理し、MATLAB ソフトウェア (バージョン R 2014a ; MathWorks) を使用して分析した。この場合、データを個々のマクロでソートし、Matlab ルーチン用のファイルを作成した。

【0224】

b 波振幅を a 波応答の底部から b 波ピークのピークまで計算した。b 波暗示時間を b 波のピークに達するのに必要なフラッシュ刺激後の時間として測定した。

10

20

30

40

50

【0225】

刺激強度の関数としてのb波の振幅を、最小二乗フィッティング法(GraphPad Prism、バージョン6.0.1及びそれ以降のバージョンのGraphPad Prism)を使用することによりフィットさせた。a波振幅をベースライン(ゼロライン)から負のa波応答まで計算した。

【0226】

統計分析を一元配置分散分析により行った。

【0227】

実施例1

ヒトVEGF及びヒトTrkBを認識する結合分子の全体的な設計

10

図1

本発明者らは、VEGF及びTrkBに結合し、それぞれVEGFアンタゴニスト及びTrkBアゴニストとして作用する、結合分子を開発した。使用された分子設計は、重鎖のC末端に結合された異なる特異性のscFvを有する、1つのターゲット抗原に対する特異性を有するIgG抗体(「マスター抗体」と呼ばれる)を有する。図1に、設計模式図を示す。好ましくは、結合分子は、二重特異性かつ四価である。

【0228】

二重特異性分子は、scFvの可変重(VH)ドメインと可変軽(VL)ドメインとの間に柔軟なペプチド配列を含有し、scFvドメインは、更なる一連のリンカーを介して、マスターIgG抗体に連結される。一構成では、scFvは、VLドメインがscFvの「N末端」を形成し、このため、マスター抗体の重鎖のC末端に融合し、一方、VHがscFvのC末端、実際には、重鎖ポリペプチド全体を形成するように配向される。ただし、この「N-VL-VH-C」構造を逆にすることができる、すなわち、「N-VH-VL-C」とすることができる。と理解することができる。

20

【0229】

この概念の実現可能性を試験するために、図1に示されたフォーマットに基づく数多くの異なる二重特異性分子を調製し、シリーズ1から出発してシリーズ4までの数サイクルの分子設計にわたってさらに最適化した。

【0230】

下記実施例では、VEGF及びTrkBに結合する種々のシリーズの二重特異性分子及びこのフォーマットの変形形態を生成するのに使用される方法並びにこれらの分子の生体活性を説明する。

30

【0231】

実施例2

VEGF及びTrkBを認識する結合ドメインの調製

図1

理解することができるように、ヒトVEGF及びTrkBに結合する二重特異性分子を調製するために、それらの個々のターゲット抗原に結合する可変ドメインを得る必要がある。

【0232】

この目的で、免疫グロブリン(Ig)VH及びVL遺伝子を種々のVEGF及びTrkBバインダーから取得し、本発明の二重特異性分子にフォーマットした。全体として、3種類のVEGF結合ドメインをB20、G6及びRanibizumabと呼ばれる個々のVEGFバインダーから得た。TrkBへの結合のために、結合ドメインをC2と呼ばれる個々のTrkBバインダーから得た(WO第2010086828号)。

40

【0233】

本発明の二重特異性分子への個々のバインダーのフォーマット化を当業者に公知の日常的な方法により行う。簡潔に、scFvをコードする遺伝子セグメントを構築するために、可変ドメインをコードするVL遺伝子とVH遺伝子とのペアを、ペプチド配列GGSEGGKSSGSGSESKSTGGS(配列番号:221)のフレキシブルリンカーをコー

50

ドする遺伝子セグメントにより連結させた。次に、得られた s c F v をコードする遺伝子セグメントを、ヒト I g G 抗体の重鎖をコードする遺伝子の 3' 末端にインフレームでクローニングした。これらのコードセグメントをオーバーラップ P C R 法により合成し、発現ベクター p T T 5 内にクローニングした。

【 0 2 3 4 】

ついで、F a b (2) 部分をコードする V L 遺伝子と V H 遺伝子とのペアを実施例 1 に概説された二重特異性フォーマットにフォーマットした。V H 遺伝子を、ヒト I g G をコードする遺伝子の 5' 末端でインフレーム融合物として、p T T 5 発現ベクター内にクローニングした。s c F v バインダーをコードする遺伝子を、同じ I g G をコードするセグメントの 3' 末端にインフレームでクローニングした。同様に、V L 遺伝子を、ヒト I g G カッパ軽鎖をコードする遺伝子とのインフレーム融合物として p T T 5 発現ベクター内にクローニングした。

【 0 2 3 5 】

In-Fusion (登録商標) H D クローニングキット (Clonotech, U.S.A.) を V H 遺伝子及び V L 遺伝子の方向性クローニングのために、上記手法において使用した。線状化ベクターの末端に相補的な 1 5 b p の伸長を有する V L / V H 用の P C R プライマーを合成した。P C R を、製造業者の標準プロトコールを使用して行い、アンプリコンを精製するか又はクローニングエンハンサーで処理し、ついで、適切なベクター内にクローニングした。ついで、E. coli を製造業者の説明書 (Clonotech, U.S.A.) に従ってトランスフォーメーションした。D N A ミニプレップを配列決定した。

【 0 2 3 6 】

各発現ベクターは、鎖をコードする遺伝子のための真核生物プロモーターエレメント、シグナル配列及び重鎖又は軽鎖をコードする遺伝子、原核生物選択マーカー遺伝子、例えば、アンピシリンのための発現カセット並びに複製起点を含有する。これらの D N A プラスミドをアンピシリン耐性 E. coli コロニー中で増殖させ、精製した。

【 0 2 3 7 】

発現ベクターを C H O - E 細胞にトランスフェクションした。無血清培地における懸濁液中で増殖するトランスフェクションされた C H O - E 細胞を 1 4 0 rpm での撹拌下での振とうフラスコ中において、3 7 °C 及び 5 % C O 2 で培養し、指数増殖の条件で維持した。トランスフェクションの日に、細胞を 1 mg 軽鎖プラスミド及び 0 . 5 mg 重鎖プラスミドで化学的にトランスフェクションした。ついで、それらを Gibco (登録商標) FreeStyle (商標) C H O 発現培地 (Life Technologies, NY, US) 1 L 中において、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個/ml で播種した。ついで、細胞をオービタル振とう下で、1 0 ~ 1 2 日間インキュベーションし、市販の供給溶液 1 5 0 ml を 1 回供給して、タンパク質を発現させた。細胞培養上清中の結合分子力価を、Octet (登録商標) 機器 (Pall ForteBio, CA, US) 及び protA バイオセンサーチップを使用し、製造業者の説明書に従って決定した。

【 0 2 3 8 】

リコンビナント結合分子を、MabSelect (商標) SuRe (商標) (Cytiva) を使用するプロテイン A 親和性クロマトグラフィー、続けて、サイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200, Cytiva) 又はカチオン交換クロマトグラフィー (POROS (商標) 50 HS, ThermoFisher) のいずれかにより、培養上清から精製し、6 0 mM N a O A c バッファー、1 0 0 mM N a C l (p H 5 . 0) 中で保存した。サンプルの純度及び不均質性の程度を質量分光法及び分析用サイズ排除クロマトグラフィーにより評価した。全てのサンプルは、機能試験前に、9 0 % のモノマー含量を有し、< 1 0 % の不純物を含有することが確認された。

【 0 2 3 9 】

この結果、以下の表 3 に示されるように、異なるシリーズ 1 ~ シリーズ 4 による二重特異性で四価の結合分子が生成され、以下、Doppelmab (D M a b) とも呼ばれる (Vekaramani et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 504, Issue 1, 26 September 2018, Pages 19-24 も参照のこと)。

10

20

30

40

50

【 0 2 4 0 】

【 表 3 】

表3:

| | Fab | ScFv/ 配向 | リンカー | シリーズ | 修飾 |
|-----------|-------------|----------------------|------|------|----|
| TPP-11735 | C2 | B20 VH-VL | 20L3 | 1 | |
| TPP-11736 | C2 | B20 VL-VH | 20L3 | 1 | |
| TPP-11737 | C2 | G6 VH-VL | 20L3 | 1 | |
| TPP-11738 | C2 | G6 VL-VH | 20L3 | 1 | |
| TPP-14936 | C2 | Ranibizumab VH-VL | 20L3 | 1 | |
| TPP-14937 | C2 | Ranibizumab VL-VH | 20L3 | 1 | |
| TPP-16061 | C2 | B20 VL-VH | 20L1 | 1 | |
| TPP-16062 | C2 | B20 VL-VH | 15L1 | 1 | |
| TPP-16063 | C2 | B20 VL-VH | 10L1 | 1 | |
| TPP-16064 | C2 | B20 VL-VH | 6GS | 1 | |
| TPP-19984 | C2 | Ranibizumab VH-VL | 10L1 | 1 | |
| TPP-19985 | C2 | Ranibizumab VH-VL | 20L1 | 1 | |
| TPP-14938 | B20 | C2 VH-VL | 20L3 | 2 | |
| TPP-14939 | B20 | C2 VL-VH | 20L3 | 2 | |
| TPP-14940 | Ranibizumab | C2 VH-VL | 20L3 | 2 | |
| TPP-14941 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 20L3 | 2 | |
| TPP-19986 | Ranibizumab | C2 VH-VL | 10L1 | 3 | |
| TPP-19987 | Ranibizumab | C2 VH-VL | 20L1 | 3 | |
| TPP-19988 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 3 | |
| TPP-19989 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 20L1 | 3 | |
| TPP-22171 | Ranibizumab | C2 VH-VL | 10L1 | 4 | CC |
| TPP-22173 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | CC |

10

20

30

40

50

| | | | | | |
|-----------|-------------|-------------------|------|---|-----------|
| TPP-22180 | Ranibizumab | C2 VH-VL | 10L1 | 4 | 1Q6Q70G |
| TPP-22187 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | 1Q |
| TPP-22188 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | 6Q |
| TPP-22189 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | 70G |
| TPP-22190 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | 1Q70G |
| TPP-22191 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | 6Q70G |
| TPP-22192 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | 1Q6Q70G |
| TPP-22204 | Ranibizumab | C2 VH-VL | 10L1 | 4 | CC1Q6Q70G |
| TPP-22211 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | CC1Q |
| TPP-22212 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | CC6Q |
| TPP-22213 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | CC70G |
| TPP-22214 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | CC1Q70G |
| TPP-22215 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | CC6Q70G |
| TPP-22216 | Ranibizumab | C2 VL-VH | 10L1 | 4 | CC1Q6Q70G |
| TPP-23457 | Ranibizumab | TPP-6830 VH-VL | 10L1 | 4 | |
| TPP-23459 | Ranibizumab | TPP-6830 VL-VH | 10L1 | 4 | |

10

20

30

【0241】

簡潔に、下記設計活動を行った。

【0242】

シリーズ1

シリーズ1において、二重特異性結合分子中にTrkB結合部分として抗原結合フラグメント(Fab)を有する結合分子を生成した。VEGF結合部分をscFv(2)としてフォーマットし、種々のVEGFバインダー、例えば、B20、G6又はRanibizumabを評価した。さらに、種々のVL-VH又はVH-VL配向を試験し、複数のリンカー、例えば、20L3、20L1、15L1、10L1、6GSを結合分子の設計に使用した。

【0243】

シリーズ2

シリーズ2において、二重特異性結合分子中にVEGF結合部分として抗原結合フラグメント(Fab)を有する結合分子を生成し、再度、種々のVEGFバインダーを評価した。今回、TrkB結合部分をscFv(2)としてフォーマットし、種々のVL-VH又はVH-VL配向を試験した。

【0244】

シリーズ3

シリーズ3において、結合分子を二重特異性結合分子中の抗原結合フラグメント(Fab)及びVEGF結合部分としてのRanibizumabに基づいて生成した。再度、TrkB結合部分をscFv(2)としてかつC2 TrkBバインダーに基づいてフォーマットした

40

50

。V L - V H又はV H - V L配向における並べ替え及び種々のリンカーを試験した。

【0245】

シリーズ4

最後のシリーズ4において、種々の突然変異、例えば、V H E 1 Q、V H E 6 Q及び/又はV L D 7 0 GをRanibizumabの結合部分に導入し、C C架橋の安定化効果をT r k B結合s c F v部分において分析した。

【0246】

ここから、これらの設計活動の結果並びに特性及び生体活性に対するそれらの影響を下記実施例においてより詳細に記載する。

【0247】

実施例3

C 2、B D N F並びに第1シリーズの4種類のDoppelma b T P P - 1 1 7 3 5、7 3 6、7 3 7及び7 3 8によるヒトT r k B活性化の比較

図2A～図2B

ヒトT r k Bを安定に発現するC H O細胞を、上昇する濃度の天然のT r k BリガンドであるB D N F、C 2抗体、I g G 1アイソタイプ対照又は4つのDoppelma b T P P - 1 1 7 3 5、T P P - 1 1 7 3 6、T P P - 1 1 7 3 7、T P P - 1 1 7 3 8と共にインキュベーションした。T r k B活性化を、(A) Y 7 0 6 / 7 0 7でのT r k Bリン酸化又はT r k Bの下流である(B) T 2 0 2 / Y 2 0 4 (E R K 1)及びT 1 8 5 / Y 1 8 7 (E R K 2)それぞれでのE R K 1 / 2リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とする。

【0248】

結果

D M a bによるT r k B活性化は、親C 2分子と実質的に同一であった。また、D M a bは、親C 2分子と同じ性質も示し、B D N Fの約40～50%でT r k B活性化の有効性を有する部分的T r k Bアゴニスト(p T r k B)として作用した。しかし、D M a bは、配列又は配向/レイアウトを変化させることなく、親C 2抗体の(F a b)₂部分全体を組み込んだが、これは、非常に有望な結果であった。この特異的なフォーマットへのフォーマット化が、T r k BバインダーのT r k B及びT r k B下流シグナル伝達を活性化する能力に負の影響を及ぼさないことを示したためである。予想どおり、アイソタイプ対照はT r k Bを活性化しなかった。

【0249】

実施例4

C 2、B D N F及び第1シリーズのDoppelma b T P P - 1 1 7 3 5 / 7 3 6によるカニクイザル/ウサギ/ラット/マウスT r k B活性化の比較

図3A～図3D

(A)カニクイザルT r k B、(B)ウサギT r k B、(C)ラットT r k B又は(D)マウスT r k Bを安定に発現するC H O細胞を上昇する濃度の天然のT r k BリガンドであるB D N F、C 2抗体又はDoppelma b T P P - 1 1 7 3 5もしくはT P P - 1 1 7 3 6と共にインキュベーションした。T r k B活性化をY 7 0 6 / 7 0 7でのT r k Bリン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とする。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0250】

結果

再度、D M a bによるT r k B活性化は、親C 2分子と実質的に同一であり、活性化は、ヒトT r k Bレセプターの活性化と同等であった。このアッセイにおいても、D M a bは、親C 2分子と同じ特性を示し、B D N Fの約40～50%でT r k B活性化の有効性を有する部分的T r k Bアゴニスト(p T r k B)として作用した。

【0251】

実施例5

10

20

30

40

50

T P P - 1 1 7 3 5 / 7 3 6 / 7 3 7 / 7 3 8 媒介性 T r k B 活性化の選択性

図 4 A ~ 図 4 C

(A) ヒト T r k A、(B) ヒト T r k B 又は (C) ヒト T r k C を安定に発現する C H O 細胞を上昇する濃度の C 2 抗体又は 4 つの Doppel mab T P P - 1 1 7 3 5、T P P - 1 1 7 3 6、T P P - 1 1 7 3 7、T P P - 1 1 7 3 8 と共にインキュベーションした。T r k レセプターの活性化を、Y 7 0 6 / 7 0 7 でのレセプターリン酸化を測定することにより評価した。上昇する濃度の T r k A (N G F)、T r k B (B D N F) 及び T r k C (N T - 3) についての天然のリガンドとのインキュベーションを対照として使用した。最低化合物濃度を溶媒単独とする。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【 0 2 5 2 】

結果

試験された Doppel mab はいずれも、T r k A 又は T r k C を活性化しなかった。全ての Doppel mab は、T r k B に対して非常に特異的 / 選択的であった。

【 0 2 5 3 】

実施例 6

ヒト T r k B レセプターの C 2、T P P - 1 1 7 3 6 及び / 又は B D N F 誘発内部移行の比較

図 5 A ~ 図 5 B

(A) ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞を上昇する濃度の天然の T r k B リガンドである B D N F 又は上昇する濃度の C 2 抗体もしくは Doppel mab T P P - 1 1 7 3 6 を伴う 1 nM B D N F と共にインキュベーションした。(B) T r k B 内部移行を、細胞の透過化を伴わない表面 T r k B レセプターの免疫蛍光染色、続けて、共焦点顕微鏡分析により評価した。ヒートマップの暗視野及び明視野はそれぞれ、蛍光閾値を上回る細胞の割合の高低を表わす。

【 0 2 5 4 】

結果

B D N F は、T r k B レセプター内部移行を誘発した (レーン 1 + 2 ; ヒートマップフィールドは、上から下に暗くなっている)。

【 0 2 5 5 】

抗体 C 2 及び T P P - 1 1 7 3 6 は、T r k B レセプターの B D N F 誘発内部移行を低下させた (レーン 3 ~ 5 及び 6 ~ 8 ; ヒートマップフィールドは、下から上に暗くなっていることが留意される)。

【 0 2 5 6 】

実施例 7

ヒト V E G F の存在下又は非存在下での C 2 及び T P P - 1 1 7 3 6 (第 1 のシリーズ) によるヒト T r k B 活性化の比較

図 6

ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞を 2 0 0 n g / m L ヒト V E G F - A (h V E G F) とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度の C 2 ツール抗体又は Doppel mab T P P - 1 1 7 3 6 と共にインキュベーションした。T r k B 活性化を、T r k B の下流である T 2 0 2 / Y 2 0 4 (E R K 1) 及び T 1 8 5 / Y 1 8 7 (E R K 2) での E R K 1 / 2 リン酸化を測定することにより評価した。抗体を伴わない、上昇する濃度のヒト V E G F - A とのインキュベーションを対照とした。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均を表わす。明確にするために、エラーバーを省略する。

【 0 2 5 7 】

結果

ヒト V E G F 単独とのインキュベーションにより、E R K 1 / 2 リン酸化は変化しなかった。

【 0 2 5 8 】

また、ヒト V E G F とのプレインキュベーションにより、C 2 又は T P P - 1 1 7 3 6

10

20

30

40

50

による E R K 1 / 2 リン酸化の効力も有効性も実質的に変化しなかった。

【 0 2 5 9 】

実施例 8

S T Z 誘発糖尿病ラットにおける D M a b 1 1 7 3 6 及び C 2 の神経保護の有効性

図 7

アゴニスト性 T r k B ツール抗体 (C 2) 及び Doppelmab T P P - 1 1 7 3 6 の I V T 注射を使用した糖尿病誘発網膜神経変性のラットモデルにおける T r k B 活性化の神経保護機能。動物を S T Z で処置して、高血糖を誘発した。網膜機能を処置の前後に、網膜電図 (E R G) により評価した。糖尿病誘発により、S T Z 処置後 3 週間以内に暗示時間の遅延がもたらされた。この時点で、動物に、アイソタイプ対照抗体 (抗 T N P) もしくは C 2 (それぞれ $19 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) 又は等モル量の T P P - 1 1 7 3 6 ($25 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) を硝子体内投与した。処置の 2 週間後、E R G 記録を繰り返し、分析した。抗体の硝子体内適用の直前及び同適用後 2 週間での桿体駆動 B 波暗示置換遅延を図 7 に示す。平均 \pm S E M ; $n \cdot s \cdot p > 0.05$ 、有意差なし ; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$; テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。

10

【 0 2 6 0 】

結果

投与の 2 週間後、抗 T N P 抗体処置では、抗 T N P 処置前の時点と比較して、糖尿病誘発桿体駆動 b 波暗示時間は短縮しなかった ($t = 2$ 週間で 15.4 ms 対 $t = 0$ で 13.3 ms ; $p > 0.05$ 、有意差なし) 。

20

【 0 2 6 1 】

投与の 2 週間後、T P P - 1 1 7 3 6 及び C 2 処置動物は、抗体処置前の時点と比較して、糖尿病誘発桿体駆動 b 波暗示時間遅延の有意な短縮を示した (C 2 : $t = 2$ 週間で 8.62 ms 対 $t = 0$ で 14.4 ms ; $*** p < 0.01$; T P P - 1 1 7 3 6 $t = 2$ 週間で 10.3 ms 対 $t = 0$ で 16.1 ms ; $** p < 0.01$) 。

【 0 2 6 2 】

T r k B 活性化の *i n v i t r o* アッセイにおける初期の測定と一致して、C 2 及び T P P - 1 1 7 3 6 は、*i n v i v o* において同様の神経保護効果を示した。

【 0 2 6 3 】

実施例 9

Eylea 並びに第 1 のシリーズの 4 つの Doppelmab T P P - 1 1 7 3 5、7 3 6、7 3 7 及び 7 3 8 によるヒト V E G F - A の捕捉の比較 - V E G F 誘発 V E G F R 2 リン酸化の阻害

30

図 8 A ~ 図 8 B

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された結合分子又は Eylea とのプレインキュベーションの有無で、 50 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。

【 0 2 6 4 】

V E G F - A の捕捉を、Y 1 1 7 5 での V E G F レセプター 2 (V E G F R 2) リン酸化を測定することにより評価した。(A) Doppelmab T P P - 1 1 7 3 5、- 7 3 6、- 7 3 7 及び - 7 3 8 の比較。(B) T P P - 1 1 7 3 6 及び T P P - 1 1 7 3 8 と Eylea との比較。非刺激細胞 (ベース) 及び抗体処理を伴わない 50 ng/ml ヒト V E G F を対照とした。データは、平均 \pm S E M を表わす。

40

【 0 2 6 5 】

結果

T P P - 1 1 7 3 7 対 T P P - 1 1 7 3 8 : これらの分子は両方とも、s c F v として G 6 抗 V E G F 分子を有した。7 3 7 は、V H - V L 配向で連結されており、一方、7 3 8 は、V L - V H 配向を有する。V L - V H 配向は、G 6 抗 V E G F 抗体に基づいて、はるかに良好に作用したことが判明した。

【 0 2 6 6 】

50

TPP - 11735 対 TPP - 11736 : これらの分子は両方とも、scFvとして B20 抗 VEGF 分子を有した。このアッセイにおける B20 VEGF 抗体について、2つの配向の間に性能差はほとんど無かった。

【0267】

TPP - 11736 対 TPP - 11738 : これらの分子は、scFvとして B20 (VL - VH) 又は G6 (VL - VH) 抗 VEGF 分子のいずれかを有した。両結合分子は、同様の効力 (IC50 約 4 nM) を示したが、TPP - 11736 はより有効であった。

【0268】

Eylea (IC50 = 0.7 nM) は、TPP - 11736 又は TPP - 11738 (約 4 nM) のいずれかと比較して、より強力である。

10

【0269】

実施例 10

Eylea 並びに第 1 のシリーズの 4 つの Doppelmaab TPP - 11735、736、737 及び 738 による ヒト VEGF - A の捕捉の比較 - VEGF 誘発 ERK1 / 2 リン酸化の阻害

図 9A ~ 図 9B

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された抗体又は Eylea とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF と共にインキュベーションした。

【0270】

20

VEGF - A の捕捉を、T202 / Y204 (ERK1) 及び T185 / Y187 (ERK2) での ERK1 / 2 リン酸化を測定することにより評価した TrkB 活性化により評価した。(A) Doppelmaab TPP - 11735、-736、-737 及び -738 の比較。(B) TPP - 11736、-738 と Eylea との比較。非刺激細胞 (ベース) 及び抗体処理を伴わない 50 ng/ml ヒト VEGF を対照とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

【0271】

結果

TPP - 11737 対 TPP - 11738 : これらの分子は両方とも、scFvとして G6 抗 VEGF 分子を有した。737 は、VH - VL 配向で連結されており、一方、738 は、VL - VH 配向を有する。VL - VH 配向は、G6 抗 VEGF 抗体に基づいて、はるかに良好に作用したことが判明した。

30

【0272】

TPP - 11735 対 TPP - 11736 : これらの分子は両方とも、scFvとして B20 抗 VEGF 分子を有した。このアッセイにおける B20 VEGF 抗体について、2つの配向の間に性能差はほとんど無かった。

【0273】

TPP - 11736 対 TPP - 11738 : これらの分子は、scFvとして B20 (VL - VH) 又は G6 (VL - VH) 抗 VEGF 分子のいずれかを有した。両結合分子は、同様の効力 (IC50 約 4 nM) を示したが、TPP - 11736 はより有効であった。

40

【0274】

Eylea (IC50 = 2 nM) は、TPP - 11736 又は TPP - 11738 (約 10 nM) のいずれかと比較して、より強力である。

【0275】

実施例 11

Eylea 及び第 1 のシリーズの 4 つの Doppelmaab TPP - 11736 による ヒト VEGF - A の捕捉の比較 - VEGF 誘発 p38 MAPK リン酸化の阻害

図 10

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の TPP - 11736 又は Eylea とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF

50

G Fと共にインキュベーションした。V E G F - Aの捕捉を、T 1 8 0 / Y 1 8 2でのp 3 8 M A P Kリン酸化を測定することにより評価した。非刺激細胞（ベース）及び抗体処理を伴わない5 0 ng/ml ヒトV E G Fを対照とした。データは、平均+ / - S E Mを表わす。

【0 2 7 6】

結果

Eylea (I C 5 0 = 約 0 . 7 4 nM) は、T P P - 1 1 7 3 6 (約 7 . 4 nM) より約 1 0 倍強力であった

【0 2 7 7】

実施例 1 2

第 1 のシリーズの 4 つの Doppelmab T P P - 1 1 7 3 5、7 3 6、7 3 7 及び 7 3 8 並びに Eylea による ヒト V E G F - A の 捕 捉 の 比 較 - V E G F 誘 発 性 H R M E C 増 殖 の 阻 害 図 1 1 A ~ 図 1 1 E

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を 飢 餓 状 態 に し、ついで、上昇する濃度の示された結合分子又は Eylea とのプレインキュベーションの有無で、1 0 ng/mL ヒト V E G F と共にインキュベーションした。分子濃度を mol/L で示す。V E G F - A の 捕 捉 を、H R M E C 細胞数の自動化された画像ベースの定量化により評価した (IncuCyte)。画像を合計 9 6 時間にわたって 4 時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0 での細胞数を 1 に設定した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均+ / - S E M を表わす。

【0 2 7 8】

結果

T P P - 1 1 7 3 7 対 T P P - 1 1 7 3 8 : これらの分子は両方とも、s c F v として G 6 抗 V E G F 分子を有した。T P P - 1 1 7 3 7 は、V H - V L 配向で連結されており、一方、T P P - 1 1 7 3 8 は、V L - V H 配向を有する。明らかに、V L - V H 配向は、G 6 の場合に非常に良好に機能した。T P P - 1 1 7 3 7 の効果は実質的に無かった。

【0 2 7 9】

T P P - 1 1 7 3 5 (V H - V L) 対 T P P - 1 1 7 3 6 (V L - V H) : これらの分子は両方とも、s c F v として B 2 0 抗 V E G F 分子を有する。再度、V L - V H 配向は、より良好に機能した。

【0 2 8 0】

7 3 6 対 7 3 8 : B 2 0 (V L - V H) 対 G 6 (V L - V H) : このアッセイにおいて、T P P - 1 1 7 3 6 (B 2 0) は明らかにより有効であった。

【0 2 8 1】

最後に、Eylea は、T P P - 1 1 7 3 6 より有効であった。

【0 2 8 2】

シリーズ 1 - T P P - 1 1 7 3 5、T P P - 1 1 7 3 6、T P P - 1 1 7 3 7、T P P - 1 1 7 3 8 の知見の概要

T r k B 活性化

D M a b による T r k B 活性化は、親 C 2 分子と実質的に同一であった。これは、予想されなかったことである。C 2 T r k B バインダーの (F a b) 2 部全体が、配列又は配向 / レイアウトを変化させることなく、D M a b に組み込まれたためである。また、全ての Doppelmab (及び C 2) は、部分的 T r k B アゴニストに過ぎなかった。

【0 2 8 3】

V E G F 捕捉

明らかに、V L - V H 配向は、V E G F バインダーとして G 6 及び B 2 0 に対してより良好に作用し、B 2 0 (V L - V H) は、G 6 (V L - V H) より有効であった。また、両方の Doppelmab (B 2 0 及び G 6) は、i n v i t r o において Eylea より劣っていた。

【0 2 8 4】

これらの最初の知見に基づいて、本発明者らは、下記実施例において、Doppelmab (

10

20

30

40

50

TPP - 16061 ~ TPP - 16064) の VEGF 捕捉を改善するために、VL - VH 配向における B20 の種々のリンカーを生成し、試験することを開始した。

【0285】

実施例 13

C2、BDNF 並びに第 1 のシリーズの 4 つの Doppelmaab TPP - 16061、16062、16063 及び 16064 による ヒト TrkB 活性化の比較；TrkB リン酸化
図 12

【0286】

ヒト TrkB を安定に発現するヒト CHO 細胞を、上昇する濃度の天然の TrkB リガンドである BDNF、C2 抗体、TPP - 11736 (B20、scFv、20L3、VL - VH) 又は種々のリンカーを有する 4 つの Doppelmaab TPP - 16061 (B20、scFv、20L1、VL - VH)、TPP - 16062 (B20、scFv、15L1、VL - VH)、TPP - 16063 (B20、scFv、10L1、VL - VH)、TPP - 16064 (B20、scFv、6GS、VL - VH) と共にインキュベーションした。TrkB 活性化を Y706 / 707 での TrkB リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均を表わす。明確にするために、エラーバーを省略した。

10

【0287】

結果

DMaab TPP - 16061 ~ 16064 による TrkB 活性化は、親 C2 分子及び TPP - 11736 と実質的に同一であった。TrkB 活性化は、タンパク質の Fc と scFv (抗 VEGF) 部分との間のリンカーの差異とはほぼ無関係なようであった。これは、予想されたことであった。リンカーが、タンパク質の Fc と scFv (抗 VEGF) 部との間の TrkB (Fab)₂ フラグメントから離れて位置していたためである。それにもかかわらず、結合分子の活性に影響を及ぼすことなく、種々のリンカーを利用することができるという良好な確証であった。最後に、全ての提示された結合分子は、部分的 TrkB アゴニスト活性のみを示した。

20

【0288】

実施例 14

BDNF、TPP - 11736 並びに第 1 のシリーズの 2 つの Doppelmaab TPP - 16061 及び 16062 による ヒト TrkB 活性化の比較；ERK1 / 2 リン酸化
図 13

30

ヒト TrkB を安定に発現する CHO 細胞を上昇する濃度の天然の TrkB リガンドである BDNF、TPP - 11736 (B20、scFv、20L3、VL - VH) 又は種々のリンカーを有する 2 つの Doppelmaab TPP - 16061 (B20、scFv、20L1、VL - VH) 及び TPP - 16062 (B20、scFv、15L1、VL - VH) と共にインキュベーションした。TrkB 活性化を、T202 / Y204 (ERK1) 及び T185 / Y187 (ERK2) での ERK1 / 2 リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

【0289】

40

結果

DMaab TPP - 16061 及び 16062 による TrkB 活性化は、TPP - 11736 と実質的に同一であった。また、ここで、TrkB 活性化は、リンカーの差異とはほぼ無関係なようであり、提示された結合分子は、部分的 TrkB アゴニスト活性のみを示した。

【0290】

実施例 15

第 1 のシリーズの 4 つの Doppelmaab TPP - 16061、062、063 及び 064 と TPP - 11736 とによる ヒト VEGF - A 捕捉の比較 - (A) VEGF 誘発 VEGFR2 リン酸化の阻害、(B) ERK1 / 2 リン酸化

50

図 1 4 A ~ 図 1 4 B

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された抗体; TPP - 11736 (B20, scFv, 20L3, VL-VH) 又は種々のリンカーを有する4つのDoppelmaab TPP - 16061 (B20, scFv, 20L1, VL-VH)、TPP - 16062 (B20, scFv, 15L1, VL-VH)、TPP - 16063 (B20, scFv, 10L1, VL-VH)、TPP - 16064 (B20, scFv, 6GS, VL-VH) とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒトVEGFと共にインキュベーションした。VEGF-Aの捕捉を、(A) Y1175でのVEGFレセプター2 (VEGFR2) リン酸化又は(B) T202/Y204 (ERK1) 及びT185/Y187 (ERK2) それぞれでのERK1/2リン酸化を測定することにより評価した。非刺激細胞(ベース)及び抗体処理を伴わない50 ng/ml ヒトVEGFを対照とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

10

【0291】

結果

リンカーの差異は、VEGF捕捉の効力又は有効性に実質的に影響を及ぼさなかった。これは、リンカーがVEGF結合部位に近接して位置していたことを考えると、やや予想外であったが、種々のリンカーを結合分子の活性に影響を及ぼすことなく、利用することができることをさらに確認された。

【0292】

実施例 16

第1のシリーズの4つのDoppelmaab TPP - 16061、062、063及び064によるヒトVEGF-Aの捕捉の比較 - VEGF誘発HRMEC増殖の阻害

20

図 1 5

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、0.5 nM Doppelmaab又は1 nM Eyleaとのプレインキュベーションの有無で、10 ng/mL ヒトVEGFと共にインキュベーションした。VEGF-Aの捕捉を、HRMEC細胞数の自動化された画像ベースの定量化により評価した (IncuCyte)。画像を合計96時間にわたって4時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0での細胞数を1に設定した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0293】

結果

実施例15に示されたリン酸化アッセイと同様に、リンカーの差異は、親分子であるTPP - 11736と比較して、より良好に(又はより悪く)は機能しなかった。Eyleaを1 nMで使用した。Eyleaは一価の分子であると考えられ、一方、Doppelmaabは二価であるためである。これらの条件下で、Eyleaは、HRMECのVEGF誘発増殖の阻害においてより良好に機能した。

30

【0294】

実施例 17

Eylea、TPP - 11736並びに第1のシリーズの4つのDoppelmaab TPP - 16061、062、063及び064によるヒトVEGF-Aの捕捉の比較 - VEGF誘発HRMEC発芽の阻害

40

図 1 6

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を2.5 nM 示されたDoppelmaab又は5 nM Eyleaとの24時間のプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒトVEGFとのインキュベーションにより24時間誘発した。内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Zスタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均+/-SEMを表わす。n.s. p > 0.05 有意差なし対50 ng/mL hVEGF + 2.5 nM TPP - 11736。

【0295】

50

結果

実施例 15 に示されたリン酸化アッセイと同様に、リンカーの差異は、親分子である TPP - 11736 と比較して、より良好に（又はより悪く）は機能しなかった。Eylea を 1 nM で使用した。Eylea は一価の分子であると考えられ、一方、Doppelmab は二価であるためである。これらの条件下で、Eylea は、HRMEC の VEGF 誘発増殖の阻害においてより良好に機能した。

【0296】

シリーズ 1 - TPP - 16061、TPP - 16062、TPP - 16063、TPP - 16064 の知見の概要

TrkB 活性化：親分子である TPP - 11736 と比較して差異 / 改善は観察されなかった。

10

【0297】

VEGF 捕捉：親分子である TPP - 11736 と比較して差異 / 改善が無かった。

【0298】

これらの知見に基づいて、本発明者らは、TPP - 11736 (scFv としての B20) の VEGF 捕捉を TPP - 13788 (B20 IgG) と比較して、Fab としての B20 の再フォーマット化が VEGF 捕捉を改善するであろうかどうかを試験することを開始した。

【0299】

実施例 18

20

TPP - 11736 及び TPP - 13788 (B20 IgG) によるヒト VEGF - A の捕捉の比較 - VEGFR2、ERK1/2 及び p38 MAPK の VEGF 誘発リン酸化の阻害

図 17A ~ 図 17C

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の Doppelmab TPP - 11736 (scFv として B20 抗 VEGF) 又は TPP - 13788 (B20 IgG) とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF と共にインキュベーションした。VEGF - A の捕捉を、(A) Y1175 での VEGF レセプター 2 (VEGFR2) リン酸化、(B) T202/Y204 (ERK1) 及び T185/Y187 (ERK2) での ERK1/2 リン酸化又は (C) T180/Y182 での p38 MAPK リン酸化を測定することにより評価した。分子処理を伴わない 50 ng/ml ヒト VEGF を対照とした。データは、平均 +/- SEM を表わす。以下の表 4 に、対応するベストフィット IC50 (非線形回帰; log (アゴニスト) 対応答 (3 つのパラメータ)) を報告する。

30

【0300】

【表 4】

表 4:

| | TPP-11736 | TPP-13788 |
|----------------------------------|-----------|-----------|
| IC ₅₀ (VEGFR2 リン酸化) | 2.6 nM | 1.0 nM |
| IC ₅₀ (ERK1/2 リン酸化) | 9.1 nM | 3.0 nM |
| IC ₅₀ (p38 MAPK リン酸化) | 7.7 nM | 2.4 nM |

40

【0301】

結果

試験された B20 IgG である TPP - 13788 は、TPP - 11736 に対して約 3 倍向上した VEGF - A 捕捉能を示す。

50

【0302】

実施例 19

TPP - 11736 及び TPP - 13788 (B20 IgG) によるヒト VEGF - A の捕捉の比較 - VEGF 誘発 HRMEC 発芽の阻害

図 18

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) のスフェロイドをコラーゲンマトリックスに包埋した。内皮の発芽を 2.5 nM Doppelmab TPP - 11736 又は 2.5 nM TPP - 13788 (B20 IgG) とのブレインキューベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF とのインキュベーションにより 24 時間誘発した。内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Z スタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。n. s. p > 0.05 有意差なし対 50 ng/mL hVEGF + 2.5 nM TPP - 11736。

10

【0303】

結果

VEGFR2、ERK1/2 及び p38 MAPK リン酸化アッセイにおける VEGF 捕捉の改善にもかかわらず、VEGF 誘発発芽の TPP - 13788 (B20 IgG) 媒介性阻害は、TPP - 11736 の阻害より良好ではなかった。

【0304】

実施例 20

BDNF、TPP - 11736 並びに第 1 のシリーズの 2 つの Doppelmab TPP - 14936 及び TPP - 14937 によるヒト TrkB 活性化の比較; TrkB 及び ERK1/2 のリン酸化

20

図 19A ~ 図 19C

ヒト TrkB を安定に発現する CHO 細胞を、上昇する濃度の天然の TrkB リガンドである BDNF、TPP - 11736 (B20、scFv、20L3、VL-VH) 又は 2 つの Doppelmab TPP - 13936 (Ranibizumab、scFv、20L3、VH-VL) 又は TPP - 14937 (Ranibizumab、scFv、20L3、VL-VH) と共にインキュベーションした。TrkB 活性化を、(A) Y706/707 での TrkB リン酸化、(B 及び C) T202/Y204 (ERK1) 及び T185/Y187 (ERK2) それぞれでの ERK1/2 リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

30

【0305】

結果

DMab TPP - 14936 及び TPP - 14937 による TrkB 活性化は、TPP - 11736 と実質的に同一であった。これは、予想されたことであった。結合分子の TrkB 結合成分が、常に、Fab フラグメントとしての C2 であったためである。

【0306】

実施例 21

BDNF、TPP - 11736 及び Doppelmab TPP - 14936 による カニクイザル とラットの TrkB 活性化の比較; TrkB リン酸化

40

図 20A ~ 図 20B

(A) カニクイザル TrkB 又は (B) ラット TrkB を安定に発現する CHO 細胞を、上昇する濃度の天然の TrkB リガンドである BDNF、TPP - 11736 (B20、scFv、20L3、VL-VH) 又は TPP - 14936 (Ranibizumab、scFv、20L3、VH-VL) と共にインキュベーションした。TrkB 活性化を、Y706/707 での TrkB リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。

【0307】

結果

DMab TPP - 14936 による TrkB 活性化は、TPP - 11736 と実質的

50

に同一であった。再度、これは、予想されたことであった。2つの分子のTrkB結合成分が、両方の場合において、FabフラグメントとしてのC2であるためである。

【0308】

実施例22

TPP-11736、TPP-14936又はTPP-14937によるヒトVEGF-A捕捉の比較 - VEGFR2、ERK1/2及びSrcのVEGF誘発リン酸化の阻害
図21A~図21C

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のDoppelma TPP-11736(B20、scFv、20L3、VL-VH)、TPP-14936(Ranibizumab、scFv、20L3、VH-VL)又はTPP-14937(Ranibizumab、scFv、20L3、VL-VH)とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。VEGF-A捕捉を、(A)Y1175でのVEGFレセプター2(VEGFR2)リン酸化、(B)T202/Y204及びT185/Y187でのERK1/2リン酸化又は(C)Y419でのSrcリン酸化を測定することにより評価した。抗体処理を伴わない50ng/mlヒトVEGFを対照とした。データは、平均+/-SEMを表わす。以下の表5に、対応するベストフィットIC50値及び絶対有効性値(底部のプラトー)をそれぞれ報告する(非線形回帰;log(アゴニスト)対応答(3つのパラメータ))。

10

【0309】

【表5】

20

表5:

| | TPP-11736 | TPP-14936 | TPP-14937 |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| IC ₅₀ (VEGFR2リン酸化) | 2.4 nM | 1.9 nM | 4.3 nM |
| 底部のプラトー (VEGFR2リン酸化:カウント) | 482 | -1097 | -1407 |
| IC ₅₀ (ERK1/2リン酸化) | 5.6 nM | 3.5 nM | 5.6 nM |
| 底部のプラトー (ERK1/2リン酸化:カウント) | 3688 | -340,8 | -926,9 |
| IC ₅₀ (Scrリン酸化) | 4.0 nM | 3.4 nM | 5.8 nM |
| 底部のプラトー (Scrリン酸化:カウント) | 6300 | 4654 | 4571 |

30

【0310】

結果

VEGF捕捉の効力(IC50)は、TPP-11736とTPP-14936/TPP-14937との間で同様である。

【0311】

TPP-14936によるVEGF捕捉の効力(IC50)は、TPP-14937より幾らか良好である Ranibizumab scFvのVL-VH配向よりVH-VLがより良好である。

【0312】

TPP-14936及びTPP-14937によるVEGF捕捉は、TPP-1173

40

50

6より有効であった(底値はより小さかった)。

【0313】

実施例23

TPP-11736及びDoppelmab TPP-14936及びTPP-14937によるヒトVEGF-A捕捉の比較-VEGF誘発HRMEC発芽の阻害

図22

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を2.5nM Doppelmab TPP-11736(B20、scFv、20L3、VL-VH)、TPP-14936(Ranibizumab、scFv、20L3、VH-VL)又はTPP-14937(Ranibizumab、scFv、20L3、VL-VH)とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFとのインキュベーションにより24時間誘発した。内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Zスタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均+/-SEMを表わす。n.s. p>0.05 有意差なし、****p<0.0001。

10

【0314】

結果

TPP-14936及びTPP-14937によるVEGF捕捉は、VEGFR2/ERK1_2/Srcリン酸化アッセイにおいて同様であったが、VEGF誘発発芽の阻害には、劇的な差があった。TPP-11736とTPP-14937との間に有意差はなかったが、TPP-14936によるVEGF誘発HRMEC発芽の阻害は、TPP-14937又はTPP-11736よりはるかに有効であった。

20

【0315】

この予想外の知見から、抗VEGF scFvのVH-VL配向が、このアッセイにおける性能に重要であることが示された。VH-VLは、VL-VHよりはるかに良好である。興味深いことに、VL-VH配向は、TPP-11735対736(B20)の場合、また、TPP-11737対738(G6)の場合にも、VH-VLより良好であった。

【0316】

実施例24

Doppelmab TPP-11736、TPP-14936及びTPP-14937並びにEyleaによるヒトVEGF-A捕捉の比較-VEGF誘発HRMEC増殖の阻害

30

図23A~図23D

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された結合分子又はEyleaとのプレインキュベーションの有無で、10ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。結合分子/Eylea濃度をmol/Lで示す。VEGF-Aの捕捉を、HRMEC細胞数の自動化された画像ベースの定量化により評価した(IncuCyte)。画像を合計84時間にわたって4時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t=0での細胞数を1に設定した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0317】

40

結果

TPP-14936及びTPP-14937は、TPP-11736と比較して、より良好な効力、特に、VEGF誘発HRMEC増殖の阻害の有効性を示した。TPP-14936は、TPP-14937より強力であった。

【0318】

非常に驚くべきことに、TPP-14936及びTPP-14937は、Eyleaより有効であった。両Doppelmabは、ベースライン以下でも増殖を減少させた。Eyleaとは対照的に、それらは、VEGF誘発増殖の完全な阻害を示した。ただし、Eyleaは、TPP-14936及び14937よりさらに強力であった。

【0319】

50

シリーズ1 - TPP - 14936 / 14937の知見の概要

TrkB活性化：TPP - 11736と比較して、差異/改善は観察されなかった。両方の結合分子が、FabフラグメントとしてC2バインダーを有していたため、この種の話は、予想されたことであった。

【0320】

VEGF捕捉

リン酸化アッセイ：VEGF捕捉の効力(IC₅₀)は、TPP - 11736とTPP - 14936 / TPP - 14937との間で同様であった。TPP - 14936及びTPP - 14937によるVEGF捕捉は、TPP - 11736より有効であった(底部の値)。

10

【0321】

発芽アッセイ：TPP - 11736とTPP - 14937との間に有意差は無かった。TPP - 14936によるVEGF誘発HRMEC発芽の阻害は、TPP - 14937又はTPP - 11736よりはるかに有効であった。予想外に、抗VEGFであるRanibizumabのVH-VL配向は、VL-VHよりはるかに良好であった。

【0322】

増殖アッセイ：TPP - 14936及びTPP - 14937は、TPP - 11736と比較して、より良好な効力、特に、VEGF誘発HRMEC増殖の阻害の有効性を示した。TPP - 14936は、TPP - 14937より強力であり、TPP - 14936及びTPP - 14937は両方とも、Eyleaより有効であった。

20

【0323】

これらの知見に基づいて、本発明者らは、Doppelmabの逆のレイアウトをより良く理解することを開始し、VEGF捕捉及びscFvとしてのC2 TrkBバインダーの効力(有効性)を改善するために、FabとしてのRanibizumab/B20を試みた。ここから、下記結合分子を生成し、下記実施例(シリーズ2)において試験した：TPP - 14938(B20 Fab)、TPP - 14939(B20 Fab)、TPP - 14940(Ranibizumab Fab)、TPP - 14941(Ranibizumab Fab)。

【0324】

実施例25

BDNF、TPP - 11736並びに第2のシリーズの4つのDoppelmab TPP - 14938、TPP - 14939、TPP - 14940及びTPP - 14941によるヒトTrkB活性化の比較；TrkB及びERK1/2のリン酸化

30

図24A～図24B及び図25

ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を、上昇する濃度の天然のTrkBリガンドであるBDNF、TPP - 11736(FabとしてのC2)又は第2のシリーズの4つのDoppelmab TPP - 14938(scFvとしてのC2、20L3、VH-VL)、TPP - 14939(scFvとしてのC2、20L3、VL-VH)、TPP - 14940(scFvとしてのC2、20L3、VH-VL)及びTPP - 14941(scFvとしてのC2、20L3、VL-VH)と共にインキュベーションした。TrkB活性化を、(A)Y706/707でのTrkBリン酸化を測定することにより又は(B)T202/Y204(ERK1)及びT185/Y187(ERK2)それぞれでのERK1/2リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

40

【0325】

結果

TPP - 11736は、FabとしてC2 CDRを含有した。4つのDoppelmab TPP - 14938、TPP - 14939、TPP - 14940及びTPP - 14941は、scFvとしてC2を含有した。

【0326】

TPP - 11736又は元のC2抗体 - 両方とも、部分的TrkBレセプターアゴニス

50

トである - とは非常に対照的に、ここでは、4つの新規なDoppelmabは全て、完全なTrkBレセプターアゴニスト活性を示した。ここでは、これらのDoppelmabによるTrkB活性化は、天然のリガンドであるBDNFと同様に有効であった。これは、全く予想外であった。元のC2抗体単独では、部分的TrkBレセプターアゴニストを示したためである。理論に拘束されることを望むものではないが、単一の結合分子とのVEGF誘発クラスター形成及び結合分子の立体形成をTrkB活性化の有効性及び効力の観察された向上が担っている場合があると考えられる(図25も参照のこと)。

【0327】

また、TrkB活性化の効力も、TPP-14939及びTPP-14941と比較して、Doppelmab TPP-14938及びTPP-14940で幾らか良好であった。このため、C2 scFvの「VH-VL」配向は、TrkB活性化のより良好な効力を示した。

10

【0328】

実施例26

BDNF、TPP-11736並びに第2のシリーズの4つのDoppelmab TPP-14938、TPP-14939、TPP-14940及びTPP-14941によるカニクイザル/ラットTrkB活性化の比較; TrkB及びERK1/2リン酸化

図26A~図26B

(A)カニクイザルTrkB又は(B)ラットTrkBを安定に発現するCHO細胞を、上昇する濃度の天然のTrkBリガンドであるBDNF、TPP-11736(FabとしてのC2)又は第2のシリーズの2つのDoppelmab TPP-14940(scFvとしてのC2、20L3、VH-VL)及びTPP-14941(scFvとしてのC2、20L3、VL-VH)と共にインキュベーションした。TrkB活性化を、Y706/707でのTrkBリン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

20

【0329】

結果

ヒトTrkBについての実施例25の結果をカニクイザル及びラットのモデルにおいて再現することができた。また、ここでは、TPP-11736とは非常に対照的に、新規なDoppelmabは、完全なTrkBレセプターアゴニストであった。これらのDoppelmabによるTrkB活性化は、天然のリガンドであるBDNFと同様に有効であった。

30

【0330】

同様に、TrkB活性化の効力は、TPP-14941と比較して、Doppelmab TPP-14940で幾らか良好であった。このため、C2 scFvのVH-VL配向は、TrkB活性化のより良好な効力を示した。

【0331】

実施例27

ヒトVEGFの存在下又は非存在下における、C2、TPP-14940及びTPP-14941(第2のシリーズ)によるヒトTrkB活性化(TrkBリン酸化)の比較-相乗効果

40

図27A~図27C

ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を200ng/mLヒトVEGF-A(hVEGF)とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度のDoppelmab(A)TPP-14940、(B)TPP-14941又は(C)C2と共にインキュベーションした。TrkB活性化を、Y706/707でのTrkBリン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0332】

結果

驚くべきことに、ヒトVEGFとのプレインキュベーションにより、TPP-14941(scFvとしてのC2、20L3、VL-VH)によるTrkBリン酸化(TrkB

50

活性化)の効力が劇的に改善された。

【0333】

TrkBリン酸化(TrkB活性化)の効力に対するVEGFの影響は、TPP-14940と比較して、TPP-14941についてより大きかった。このため、両方の分子が、TrkBリン酸化の効力に対して相乗効果を示したが、DoppelmabのTrkB活性化部分の配向/幾何形状(scfv VL-VH対scfv VH-VL対Fab)は、相乗効果に対して影響を有すると考えられ、VL-VH配向を有するscfvが好ましい。

【0334】

VEGFプレインキュベーションは、C2(対照)によるTrkBリン酸化(TrkB活性化)の効力に影響を及ぼさなかった。

【0335】

実施例28

ヒトVEGFの存在下又は非存在下における、C2、TPP-14940及びTPP-14941(第2のシリーズ)によるヒトTrkB活性化(ERK1/2リン酸化)の比較-相乗効果

図28A~図28C

ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を200ng/mLヒトVEGF-A(hVEGF)とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度のDoppelmab(A)TPP-14940、(B)TPP-14941又は(C)C2と共にインキュベーションした。TrkB活性化を、TrkBの下流であるT202/Y204(ERK1)及びT185/Y187(ERK2)でのERK1/2リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とする。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0336】

結果

ここでも、驚くべきことに、ヒトVEGFとのプレインキュベーションにより、TPP-14941(scfvとしてのC2、20L3、VL-VH)によるERK1/2リン酸化(TrkB活性化)の効力が劇的に改善された。

【0337】

また、ここでは、ERK1/2リン酸化(TrkB活性化)の効力に対するVEGFの影響は、TPP-14940と比較して、TPP-14941についてより大きかった。再度、両方の分子が、TrkBリン酸化の効力に対して相乗効果を示したが、DoppelmabのTrkB活性化部分の配向/幾何形状(scfv VL-VH対scfv VH-VL対Fab)は、相乗効果に対して影響を有すると考えられ、VL-VH配向を有するscfvが好ましい。

【0338】

先に示されたように、VEGFプレインキュベーションは、TPP-11736(シリーズ1、FabとしてのC2)によるERK1/2リン酸化(TrkB活性化)の効力にも影響を及ぼさなかった。最後に、VEGFプレインキュベーションは、C2(対照)によるERK1/2リン酸化(TrkB活性化)の効力に影響を及ぼさなかった。

【0339】

実施例29

VEGF単独及びBDNFとの組み合わせによるヒトTrkB活性化(TrkB/ERKリン酸化)の比較-相乗効果についての対照実験

図29A~図29B

ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を、固定濃度の200ng/mLhVEGFを伴って又は伴わずに、上昇する濃度のヒトVEGF-A(hVEGF)単独又は上昇する濃度のBDNFと共にインキュベーションした。TrkBの活性化を、(A)Y706/707でのTrkBリン酸化又は(B)TrkBの下流であるT202/Y204(ERK1)及びT185/Y187(ERK2)それぞれでのERK1/2リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均+/-SEM

10

20

30

40

50

を表わす。

【0340】

結果

hVEGF単独では、TrkB又はERK1/2のリン酸化が誘発されなかった。

【0341】

BDNFの用量 - 応答曲線は、hVEGFとはほぼ無関係である。

【0342】

実施例30

ヒトVEGFの存在下又は非存在下における、C2、TPP-14940及びTPP-14941(第2のシリーズ)によるカニクイザルTrkB活性化(TrkBリン酸化)の比較 - 相乗効果

10

図30A~図30C

カニクイザルTrkBを安定に発現するCHO細胞を200ng/mLヒトVEGF-A(hVEGF)とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度のDoppelmaab(A)TPP-14940、(B)TPP-14941又は(C)C2と共にインキュベーションした。TrkB活性化を、Y706/707でのTrkBリン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0343】

結果

また、このモデルでも、ヒトVEGFとのプレインキュベーションにより、TPP-14941(scFvとしてのC2、20L3、VL-VH)によるTrkBリン酸化(TrkB活性化)の効力が劇的に改善された。TPP-14940(scFvとしてのC2、20L3、HL)によるTrkBリン酸化(TrkB活性化)の効力に対するVEGFの影響はより小さかった。

20

【0344】

実施例31

ヒトVEGFの存在下又は非存在下における、C2、TPP-14940及びTPP-14941(第2のシリーズ)によるカニクイザルTrkB活性化(ERK1/2リン酸化)の比較 - 相乗効果

図31A~図31C

30

カニクイザルTrkBを安定に発現するCHO細胞を200ng/mLヒトVEGF-A(hVEGF)とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度のDoppelmaab(A)TPP-14940、(B)TPP-14941又は(C)C2と共にインキュベーションした。TrkB活性化を、TrkBの下流であるT202/Y204(ERK1)及びT185/Y187(ERK2)でのERK1/2リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0345】

結果

また、このモデルでも、ヒトVEGFとのプレインキュベーションにより、TPP-14941(scFvとしてのC2、20L3、VL-VH)によるERK1/2リン酸化(TrkB活性化)の効力が劇的に改善された。TPP-14940(scFvとしてのC2、20L3、HL)によるERK1/2リン酸化(TrkB活性化)の効力に対するVEGFの影響はより小さかった。

40

【0346】

実施例32

TPP-11736(scFvとしてB20)、TPP-14938(FabとしてB20)又はTPP-14939(FabとしてB20)によるヒトVEGF-A捕捉の比較 - VEGFR2、ERK1/2及びSrcのVEGF誘発リン酸化の阻害

図32A~図32C

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のDo

50

ppelmab TPP - 11736 (s c F vとしてのB20)、TPP - 14938 (F a bとしてのB20)又はTPP - 14939 (F a bとしてのB20)とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒトVEGFと共にインキュベーションした。VEGF - A捕捉を、(A) Y1175でのVEGFレセプター2 (VEGFR2)リン酸化、(B) T202 / Y204 (ERK1)及びT185 / Y187 (ERK2)でのERK1 / 2リン酸化又は(C) Y419でのSrcリン酸化を測定することにより評価した。抗体処理を伴わない50 ng/ml ヒトVEGFを対照とした。データは、平均 + / - S E Mを表わす。以下の表6に、対応するベストフィットIC₅₀値及び絶対有効性値(底部のプラトー)をそれぞれ報告する(非線形回帰; log (アゴニスト)対応答(3つのパラメータ))。

【0347】

【表6】

表6:

| | TPP-11736 | TPP-14938 | TPP-14939 |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| IC ₅₀ (VEGFR2リン酸化) | 2.36 nM | 1.02 nM | 0.742 nM |
| 底部のプラトー (VEGFR2リン酸化、カウント) | 482 | 129 | 242 |
| IC ₅₀ (ERK1/2リン酸化) | 5.59 nM | 2.71 nM | 2.51 nM |
| 底部のプラトー (ERK1/2リン酸化、カウント) | 3688 | 1331 | 1144 |
| IC ₅₀ (Scrリン酸化) | 3.97 nM | 1.80 nM | 1.16 nM |
| 底部のプラトー (Scrリン酸化、カウント) | 6300 | 5485 | 5538 |

【0348】

結果

TPP - 14938 / 39によるVEGF捕捉の効力(IC₅₀)は、TPP - 11736より幾らか良好であった。

【0349】

TPP - 14938及びTPP - 14939によるVEGF捕捉は、TPP - 11736より有効であった(底値はより小さい)。

【0350】

全体として、B20 s c F vとB20 F a bとの間の差異はかなり小さく、図17 / 18に示された先の結果: TPP - 11736対TPP - 13788 (B20 I g G)によく対応する。結論として、B20は、F a bからs c F vへの再フォーマット化を明らかに比較的良好に許容する。

【0351】

実施例33

TPP - 11736 (B20 s c F v)、TPP - 14938 (B20 F a b)又はTPP - 14939 (B20 F a b)によるヒトVEGF - A捕捉の比較 - HRMECのVEGF誘発増殖の阻害

図33A ~ 図33C

10

20

30

40

50

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された結合分子とのプレインキュベーションの有無で、10 ng/mL ヒトVEGFと共にインキュベーションした。分子濃度をmol/Lで示す。VEGF-A捕捉を、HRMEC細胞数の自動化された画像ベースの定量化により評価した (IncuCyte)。画像を合計84時間にわたって4時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0での細胞数を1に設定した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - SEMを表わす。

【0352】

結果

B20 scFv (TPP - 11736) をB20 Fab (TPP - 14938及びTPP - 14939) に再フォーマット化することによっては、増殖アッセイにおいて、VEGF-A捕捉の効力も有効性も改善されなかった。実際、B20 Fabベースの抗体は、TPP - 11736より効力/有効性が幾らか低いと考えられた。

10

【0353】

実施例34

TPP - 14936 (Ranibizumab、scFv、HL) 又はTPP - 14937 (Ranibizumab、scFv、LH) とTPP - 14940及びTPP - 14941 (Ranibizumab Fab) とによるヒトVEGF-A捕捉の比較 - VEGFR2、ERK1/2及びSrcのVEGF誘発リン酸化の阻害

図34A ~ 図34C

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のDoppelmaab TPP - 11736 (scFvとしてのB20)、TPP - 14936 (scFvとしてのRanibizumab VH-VL)、TPP - 14937 (scFvとしてのRanibizumab、VL-VH)、TPP - 14940 (FabとしてのRanibizumab) 又はTPP - 14941 (FabとしてのRanibizumab) とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒトVEGFと共にインキュベーションした。VEGF-A捕捉を、(A) Y1175でのVEGFレセプター2 (VEGFR2) リン酸化、(B) T202/Y204 (ERK1) 及びT185/Y187 (ERK2) でのERK1/2リン酸化又は(C) Y419でのSrcリン酸化を測定することにより評価した。抗体処理を伴わない50 ng/ml ヒトVEGFを対照とした。データは、平均 + / - SEMを表わす。以下の表7に、対応するベストフィットIC₅₀値及び絶対有効性値 (底部のプラトー) をそれぞれ報告する (非線形回帰; log (アゴニスト) 対応答 (3つのパラメータ))。

20

30

【0354】

40

50

【表 7】

表 7.

| | TPP-11736 | TPP-14936 | TPP-14937 | TPP-14940 | TPP-14941 |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| IC ₅₀ (VEGFR2 リン酸化) | 2.36 nM | 1.90 nM | 4.29 nM | 0.373 nM | 0.292 nM |
| 底部のプラトー (VEGFR2 リン酸化、 カウント) | 482 | -1097 | -1407 | -567 | -763 |
| IC ₅₀ (ERK1/2 リン酸化) | 5.59 nM | 3.49 nM | 5.58 nM | 0.802 nM | 0.430 nM |
| 底部のプラトー (ERK1/2 リン酸化、 カウント) | 3688 | -340 | -926 | 438 | 1147 |
| IC ₅₀ (Scr リン酸化) | 3.97 nM | 3.40 nM | 5.83 nM | 0.276 nM | 0.393 nM |
| 底部のプラトー (Scr リン酸化、 カウント) | 6300 | 4654 | 4571 | 4771 | 4367 |

10

20

30

【 0 3 5 5 】

結果

s c F v から F a b に Ranibizumab に再フォーマット化することにより、3 つ全てのアッセイにおいて、V E G F 捕捉の効力が劇的に改善された (Ranibizumab s c F v 又は参照である分子 T P P - 1 1 7 3 6 より 1 0 倍良好な I C 5 0)。

【 0 3 5 6 】

Ranibizumab ベースの分子による V E G F 捕捉の有効性は、T P P - 1 1 7 3 6 (底値) よりもはるかに良好であった。

【 0 3 5 7 】

しかしながら、Ranibizumab は、F a b から s c F v への再フォーマット化には非常によく耐えなかった (B 2 0 とは対照的、先の実施例を参照のこと)。

40

【 0 3 5 8 】

実施例 3 5

T P P - 1 4 9 3 6 (s c F v としての Ranibizumab、V H - V L) 又は T P P - 1 4 9 3 7 (s c F v としての Ranibizumab、V L - V H) と T P P - 1 4 9 4 0 及び T P P - 1 4 9 4 1 (Ranibizumab F a b) とによるヒト V E G F - A 捕捉の比較 - H R M E C の V E G F 誘発増殖の阻害

図 3 5 A ~ 図 3 5 D

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (H R M E C) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された結合分子のプレインキュベーションの有無で、1 0 ng/mL ヒト V E G F と共にイ

50

ンキュベーションした。分子濃度をmol/Lで示す。VEGF-A捕捉を、HRMEC細胞数の自動化された画像ベースの定量化により評価した(Incucyte)。画像を合計84時間にわたって4時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0での細胞数を1に設定した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均 + / - SEMを表わす。

【0359】

結果

s c F vとしてのRanibizumab (TPP - 11736 / TPP - 14937)をRanibizumab Fab (TPP - 14940及びTPP - 14941)に再フォーマット化することにより、増殖アッセイにおいて、VEGF-A捕捉の効力が顕著に改善された。

【0360】

TPP - 14940及びTPP - 14941では、完全なVEGF阻害が、0.25nMの濃度で既に見られた。一方、完全な阻害には、それぞれ1nM TPP - 14936及び4nM TPP - 14937が必要であった。

【0361】

VEGF-A阻害の有効性は、4つ全ての分子(全て完全な阻害剤)の間で同様であった。

【0362】

実施例36

TPP - 14938又はTPP - 14939 (B20 Fab)とTPP - 14940及びTPP - 14941 (Ranibizumab Fab)とによるヒトVEGF-A捕捉の比較 - VEGFR2、ERK1/2及びSrcのVEGF誘発リン酸化の阻害

図36A ~ 図36C

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のDoppelmaab TPP - 11736 (s c F vとしてのB20)、TPP - 13938 (FabとしてのB20)又はTPP - 13939 (FabとしてのB20)、TPP - 14940 (FabとしてのRanibizumab)又はTPP - 14941 (FabとしてのRanibizumab)とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。VEGF-A捕捉を、(A)Y1175でのVEGFレセプター2(VEGFR2)リン酸化、(B)T202/Y204(ERK1)及びT185/Y187(ERK2)でのERK1/2リン酸化又は(C)Y419でのSrcリン酸化を測定することにより評価した。分子処理を伴わない50ng/mlヒトVEGFを対照とした。データは、平均 + / - SEMを表わす。以下の表8に、対応するベストフィットIC₅₀値及び絶対有効性値(底部のプラトー)をそれぞれ報告する(非線形回帰; log(アゴニスト)対応答(3つのパラメータ))。

【0363】

10

20

30

40

50

【表 8】

表8:

| | TPP-11736 | TPP-14938 | TPP-14939 | TPP-14940 | TPP-14941 |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| IC ₅₀ (VEGFR2 リン酸化) | 2.36 nM | 1.02 nM | 0.742 nM | 0.373 nM | 2.92 nM |
| 底部のプラトー (VEGFR2 リン酸化、 カウント) | 482 | 129 | 242 | -567 | -763 |
| IC ₅₀ (ERK1/2 リン酸化) | 5.59 nM | 2.71 nM | 2.51 nM | 0.802 nM | 0.430 nM |
| 底部のプラトー (ERK1/2 リン酸化、 カウント) | 3688 | 1331 | 1144 | 438 | 1147 |
| IC ₅₀ (Scr リン酸化) | 3.97 nM | 1.80 nM | 1.16 nM | 0.276 nM | 0.393 nM |
| 底部のプラトー (Scr リン酸化、 カウント) | 6300 | 5485 | 5538 | 4771 | 4367 |

10

20

【0364】

結果

Ranibizumab Fabを有するDoppelmaabは、3つのアッセイ全てにおいて、B20 Fabに基づくDoppelmaabよりVEGF捕捉の効力が明らかに良好であることを示した。

【0365】

Ranobizumab Fabを有するDoppelmaabは、3つのアッセイ全てにおいて、B20 Fabに基づくDoppelmaabよりVEGF捕捉の有効性が明らかに良好ことを示した(底値)。

【0366】

実施例37

TPP-14938又はTPP-14939(FabとしてのB20)とTPP-14940及びTPP-14941(FabとしてのRanibizumab)とによるヒトVEGF-A捕捉の比較 - HRMECのVEGF誘発増殖の阻害

図37A~図37D

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された結合分子とのプレインキュベーションの有無で、10ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。分子濃度をmol/Lで示す。VEGF-A捕捉を、HRMEC細胞数の自動化された画像ベースの定量化により評価した(IncuCyte)。画像を合計84時間にわたって4時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t=0での細胞数を1に設定した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0367】

30

40

50

結果

Ranibizumab Fabベースの分子であるTPP-14940及びTPP-14941によるVEGF誘発増殖の阻害の効力及び有効性は、B20 Fabベースの分子であるTPP-14938及びTPP-14939と比較して明らかに優れていた。

【0368】

最高濃度(16nM)であっても、TPP-14938及びTPP-14939は、VEGF誘発発芽を完全には阻害できなかった。

【0369】

対照的に、TPP-14940及びTPP-14941は、0.25nMという64倍低い濃度で既に、VEGF誘発増殖を完全に阻害した。

【0370】

実施例38

Doppelmab TPP-11736 (scFvとしてのB20)、TPP-14936 (scFvとしてのRanibizumab、VH-VL)、TPP-14937 (scFvとしてのRanibizumab、VL-VH)、TPP-14938 (FabとしてのB20)もしくはTPP-14939 (B20 Fab)、TPP-14940 (FabとしてのRanibizumab)、TPP-14941 (FabとしてのRanibizumab)又はEyleaによるヒトVEGF-A捕捉の比較 - VEGF誘発HRMEC発芽の阻害

図38

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を2.5nM Doppelmab TPP-11736 (B20 scFv)、TPP-14936 (Ranibizumab scFv、VH-VL)、TPP-14937 (Ranibizumab scFv、VL-VH)、TPP-14938 (B20 Fab)、TPP-14939 (B20 Fab)、TPP-14940 (Ranibizumab Fab)、TPP-14941 (Ranibizumab Fab)又は5nM Eyleaとのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFとのインキュベーションにより24時間誘発した。内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Zスタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均+/-SEMを表わす。n.s. p>0.05 有意差なし; 50ng/mL hVEGFと比較して、 $\$ p < 0.0001$; 50ng/mL hVEGFと比較して、 $\# p > 0.05$ 有意差なし。*
** p < 0.001; テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。

【0371】

結果

Ranibizumab FabベースのDoppelmab TPP-14940及びTPP-14941は、明らかに、このアッセイにおいて、最良のVEGF捕捉剤であった。Eyleaとは対照的に、TPP-14940及びTPP-14941は、VEGF誘発発芽を完全に阻害した。VEGFの非存在下(ベース)での内皮発芽と2.5nM TPP-14940又はTPP-14941と共にプレインキュベーションされた50ng/mL hVEGFとの間に統計的有意差は見られなかった。

【0372】

TPP-14940及びTPP-14941によるVEGF誘発EC発芽の阻害は、他のいずれのDoppelmabによる阻害より有意に良好であった。

【0373】

TPP-14940及びTPP-14941によるVEGF誘発EC発芽の阻害は、Eyleaによる阻害より有意に良好であった。

【0374】

さらに、50ng/mL hVEGFとEyleaと共にプレインキュベーションされた50ng/mL hVEGFとで刺激された内皮発芽の間には、統計的有意差は無かった。

【0375】

実施例39

10

20

30

40

50

Doppelmab TPP - 11940及びEyleaによるヒトVEGF - A捕捉の比較 - Brown NorwayラットにおけるヒトVEGF - A誘発網膜透過性亢進の阻害

図39A～図39B

TPP - 14940 (Eyleaではない)は、ラット網膜におけるヒトVEGF - A誘発透過性亢進を予防した。(A)実験手法を示す時間プロトコール。抗VEGF化合物(13又は26 pmol/眼 Eylea又はTPP - 14940)又は対照(26 pmol TPP - 11737)の硝子体内(i v t)投与の15分後、13 pmol ヒトVEGF - A/眼をi v t注射により投与した。PBS注射を対照とした。24時間後、1 mL/kg エバンスブルー(EB)溶液(0.9%生理食塩水中の45 mg/mL)を静脈内(i v)注射により30分間投与し、その後、眼を単離し、固定した。同じ時点で、血漿サンプルを収集し、全身EB曝露量が等しいことを確認した。(B)Brown Norwayラットの網膜におけるVEGF - A誘発透過性亢進の定量を、共焦点顕微鏡により網膜フラットマウントにおけるEB血管外漏出を測定することにより行った。眼を鋸状縁に沿って切断し、水晶体及び硝子体を除去し、眼杯をパラホルムアルデヒド(4%)中において、4で1時間固定し、ついで、4で一晩PBSに移した。網膜を外側セグメント(強膜及び脈絡膜)から分離し、スライドガラスに移し、4回切断して、平坦なクローバー葉様構造を達成した。組織をマウンティング媒体(DNA染色DAPIを含有するVectashield H-1200)で覆い、カバースリップを上置き、網膜フラットマウントを得た。サンプルを639 nmの波長で励起し、669 nmでのエバンスブルーの発光をLSM 700共焦点レーザー走査顕微鏡(Carl Zeiss, Jena; ゲイン800、レーザー強度2%、5スタック 60 μm)で記録し、最大強度投影を有する網膜フラットマウントの画像を得た。蛍光強度の合計の分析を30の閾値でプログラムImageJ中において画像を開いた後に行った。*** p < 0.001; * p < 0.05; n.s. p > 0.05; # p > 0.05 TPP - 11737 + PBSに対して有意差なし。チューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。n = 9 ~ 17。

【0376】

結果

対照条件下で、硝子体内VEGF - A注射により、血管透過性が約60%向上した。TPP - 14940と同じ分子フォーマット(Doppelmab)を有するため、TPP - 11737を対照抗体として使用したが、初期の*in vitro*アッセイでは、この化合物はVEGFを捕捉しなかった。

【0377】

1:1及び2:1の分子比の結合分子対VEGFにおいて、TPP - 14940は、血管透過性亢進を完全に遮断した。一方、はっきりと対照的に、Eyleaは、同じ条件下でかつ2倍の濃度でさえも、血管漏出を顕著に減少させることができなかった。

【0378】

シリーズ2 - TPP - 14938、TPP - 14939、TPP - 14940、TPP - 14941の知見の概要

TrkB活性化

TPP - 11736とは非常に対照的に、4つの新規な「Doppelmabは全て、完全なTrkBレセプターアゴニストであった。これらのDoppelmabによるTrkB活性化は、天然のリガンドであるBDNFと同様に有効であった。

【0379】

TrkB活性化の効力は、「VH-VL」配向を有するDoppelmab TPP - 14938/40対TPP - 14939及びTPP - 14941において幾らか良好であった。

【0380】

驚くべきことに、ヒトVEGFとのプレインキュベーションにより、相乗効果を示して、TPP - 14941 [C2、scFv、20L3、VL-VH]によるTrkBリン酸化(TrkB活性化)の効力が劇的に改善された。

【0381】

TPP - 14941とは対照的に、TPP - 14940 [C2、scFv、20L3、

10

20

30

40

50

VH - VL]によるTrkBリン酸化 (TrkB活性化) の効力に対するVEGFの影響は、比較的小さかった。

【0382】

VEGF捕捉

B20 scFv (TPP - 11736) をB20 Fab (TPP - 14938及びTPP - 14939) に再フォーマット化することによつては、増殖アッセイにおいて、VEGF - A捕捉の効力も有効性も改善されなかった。

【0383】

Ranibizumab scFv (TPP - 11736 / TPP - 14937) をRanibizumab Fab (TPP - 14940及びTPP - 14941) に再フォーマット化することにより、増殖アッセイにおいて、VEGF - A捕捉の効力が顕著に改善された。

10

【0384】

完全なVEGF阻害は、TPP - 14940及びTPP - 14941を使用して、0.25nMという低い濃度で既に見られた。

【0385】

Ranibizumab Fabベースの分子であるTPP - 14940及びTPP - 14941によるVEGF誘発増殖の阻害の効力及び有効性は、B20 Fabベースの分子であるTPP - 14938及びTPP - 14939と比較して優れていた。

【0386】

本発明者らは、下記実施例において結合分子におけるリンカークリッピングを観察した (データは示さず) ため、TPP - 14940に基づいて、更なる分子: TPP - 19986 (VH - VL、10L1)、TPP - 19987 (VH - VL、20L1) 及びTPP - 14941に基づいて、TPP - 19988 (VL - VH、10L1)、TPP - 19989 (VL - VH、20L1) を導き出した。これらは全て、FabとしてのRanibizumab及びscFvとしてのC2に基づいた。

20

【0387】

実施例40

BDNF、TPP - 14940 [C2、scFv、20L3、VH - VL] 又はそのリンカー変形形態であるTPP - 19986 [C2、scFv、10L1、VH - VL] もしくはTPP - 19987 [C2、scFv、20L1、VH - VL] 又はTPP - 14941 [C2、scFv、20L3、VL - VH] 及びそのリンカー変形形態であるTPP - 19988 [C2、scFv、10L1、VL - VH] もしくはTPP - 19989 [C2、scFv、20L1、VL - VH] によるヒトTrkB活性化の比較; TrkB及びERK1/2のリン酸化 - シリーズ3

30

図40A ~ 図40D

ヒトTrkBを安定に発現するヒトCHO細胞を上昇する濃度の天然のTrkBリガンドであるBDNF、TPP - 14940 [C2、scFv、20L3、VH - VL] 又はそのリンカー変形形態であるTPP - 19986 [C2、scFv、10L1、VH - VL] もしくはTPP - 19987 [C2、scFv、20L1、VH - VL] 又はTPP - 14941 [C2、scFv、20L3、V - VH] 及びそのリンカー変形形態であるTPP - 19988 [C2、scFv、10L1、VL - VH] もしくはTPP - 19989 [C2、scFv、20L1、VL - VH] と共にインキュベーションした。TrkB活性化を、(A及びB) Y706/707でのTrkBリン酸化を測定することにより又は(C及びD) T202/Y204 (ERK1) 及びT185/Y187 (ERK2) でのERK1/2リン酸化をそれぞれ測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均 + / - SEMを表わす。以下の表9及び表10に、TrkB及びERK1/2リン酸化の対応するベストフィットIC₅₀値及び絶対有効性値 (底部のプラトー) をそれぞれ報告する (非線形回帰; log (アゴニスト) 対応答 (3つのパラメータ))。

40

【0388】

50

【表 9】

表9:

| | BDNF | TPP-14940 | TPP-19986 | TPP-19987 |
|--------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| EC ₅₀ (pTrkB) | 1.22 nM | 3.21 nM | 2.00 nM | 2.16 nM |
| EC ₅₀ (pERK) | 0.507 nM | 0.475 nM | 0.406 nM | 0.381 nM |

【0389】

10

【表 10】

表10:

| | BDNF | TPP-14941 | TPP-19988 | TPP-19989 |
|--------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| EC ₅₀ (pTrkB) | 1.28 nM | 6.28 nM | 7.83 nM | 7.37 nM |
| EC ₅₀ (pERK) | 0.282 nM | 1.29 nM | 2.05 nM | 1.77 nM |

【0390】

20

結果

親分子と各リンカー変形形態との間に有意差は無かった。TrkB及びERK1/2のリン酸化の効力及び有効性は、実質的に同一であった。これは、注目に値する。リンカーが、TrkB結合部位の近くに位置していたが、結合分子の生体活性には影響を及ぼさなかったためである。

【0391】

全ての試験分子が、完全TrkBアゴニストであった。

【0392】

再度、先に示されたように、TrkB/ERKリン酸化の効力は、TPP-14941分子及びそのリンカー変形形態(VL-VH配向)と比較して、TPP-14940分子及びそのリンカー変形形態(VH-VL配向)についてより良好であった。

30

【0393】

実施例 4 1

BDNF、TPP-14940 [C2、scFv、20L3、VH-VL]又はTPP-14941 [C2、scFv、20L3、VL-VH]及びリンカー変形形態であるTPP-19988 [C2、scFv、10L1、VL-VH]もしくはTPP-19989 [C2、scFv、20L1、VL-VH]によるヒトTrkB内部移行の比較 - シリーズ 3

図 4 1 A ~ 図 4 1 B

カニクイザルTrkBを安定に発現するCHO細胞を、上昇する濃度の天然のTrkBリガンドであるBDNF又は上昇する濃度の第1のシリーズのDoppelmaab TPP-14940 [C2、scFv、20L3、VH-VL]もしくはTPP-14941 [C2、scFv、20L3、VL-VH]及びリンカー変形形態であるTPP-19988 [C2、scFv、10L1、VL-VH]もしくはTPP-19989 [C2、scFv、20L1、VL-VH]を伴う1nM BDNFと共にインキュベーションした。TrkB内部移行を細胞の透過化を伴わない表面TrkBレセプターの免疫蛍光染色、続けて、共焦点顕微鏡分析により評価した。ヒートマップの暗視野及び明視野はそれぞれ、蛍光閾値を上回る細胞の割合の高低を表わす。

40

【0394】

結果

50

B D N Fにより、T r k Bレセプター内部移行が誘発された。T P P - 1 4 9 4 0、T P P - 1 4 9 4 1、T P P - 1 9 9 8 8及びT P P - 1 9 9 8 9は、完全なT r k Bレセプターアゴニストであったが、Doppelmaabのいずれによっても、B D N F誘発レセプター内部移行を増加せず、むしろ、T r k BレセプターのB D N F誘発内部移行が減少した(注：ヒートマップフィールドは、下から上へ暗くなっている)。

【0395】

実施例42

T P P - 1 4 9 4 0並びにそのリンカー変形形態であるT P P - 1 9 9 8 6及びT P P - 1 4 9 4 1並びにそのリンカー変形形態であるT P P - 1 9 9 8 8によるヒトV E G F - A捕捉の比較 - V E G F R 2のV E G F誘発リン酸化の阻害 - シリーズ3

10

図42

ヒト網膜微小血管内皮細胞(H R M E C)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のDoppelmaab T P P - 1 4 9 4 0並びにそのリンカー変形形態であるT P P - 1 9 9 8 6及びT P P - 1 4 9 4 1並びにそのリンカー変形形態であるT P P - 1 9 9 8 8とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトV E G Fと共にインキュベーションした。V E G F - A捕捉を、Y 1 1 7 5でのV E G Fレセプター2(V E G F R 2)リン酸化を測定することにより評価した。分子処理を伴わない50ng/mlヒトV E G Fを対照とした。データは、平均+/-SEMを表わす。以下の表11に、V E G F R 2リン酸化の阻害の対応するベストフィットI C 5 0値(非線形回帰; log(アゴニスト)対応答(3つのパラメータ))を報告する。

20

【0396】

【表11】

表11:

| | TPP-14940 | TPP-19986 | TPP-19987 | TPP-14941 | TPP-19988 | TPP-19989 |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| IC ₅₀ (VEGFR2リン酸化) | 0.280 nM | 0.142 nM | 0.188 nM | 0.225 nM | 0.281 nM | 0.268 nM |

30

【0397】

結果

親分子であるT P P - 1 4 9 4 0 / T P P - 1 4 9 4 1と各リンカー変形形態との間に有意差は無かった。V E G F誘発V E G F R 2リン酸化の阻害の効力及び有効性は、実質的に同一であった。

【0398】

実施例43

Doppelmaab T P P - 1 4 9 4 0 [C 2、s c F v、2 0 L 3、V H - V L]又はそのリンカー変形形態であるT P P - 1 9 9 8 6 [C 2、s c F v、1 0 L 1、V H - V L]もしくはT P P - 1 9 9 8 7 [C 2、s c F v、2 0 L 1、V H - V L]又はT P P - 1 4 9 4 1 [C 2、s c F v、2 0 L 3、V L - V H]及びそのリンカー変形形態であるT P P - 1 9 9 8 8 [C 2、s c F v、1 0 L 1、V L - V H]もしくはT P P - 1 9 9 8 9 [C 2、s c F v、2 0 L 1、V L - V H]によるヒトV E G F - A捕捉の比較 - V E G F誘発H R M E C発芽の阻害 - シリーズ3

40

図43

ヒト網膜微小血管内皮細胞(H R M E C)のスフェロイドをコラーゲンマトリックスに包埋した。内皮の発芽を2.5nM Doppelmaab T P P - 1 1 7 3 6 (B 2 0 s c F v)、T P P - 1 4 9 4 0 [C 2、s c F v、2 0 L 3、V H - V L]又はそのリンカー変形形態であるT P P - 1 9 9 8 6 [C 2、s c F v、1 0 L 1、V H - V L]もしくはT P P - 1 9 9 8 7 [C 2、s c F v、2 0 L 1、V H - V L]又はT P P - 1 4 9 4 1 [

50

C2、scFv、20L3、VL-VH]及びそのリンカー変形形態であるTPP-19988 [C2、scFv、20L1、VL-VH]もしくはTPP-19989 [C2、scFv、20L1、VL-VH]とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFとのインキュベーションにより24時間誘発した。内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Zスタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均+/-SEMを表わす。n.s. p>0.05 有意差なし; 50ng/mL hVEGFと比較して、 \S p<0.0001; 50ng/mL hVEGFと比較して、 $\#$ p>0.05 有意差なし。*** p<0.001; テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。

【0399】

結果

親分子であるTPP-14940/TPP-14941と各リンカー変形形態との間に、有意差は観察されなかった。全ての分子が、HRMECのVEGF誘発発芽を完全に阻害した。

【0400】

シリーズ3-TPP-19986、19987、19988、19989の知見の概要
TrkB活性化

親分子(TPP-14940/14941)と各リンカー変形形態との間に、有意差は観察されなかった。

【0401】

全ての試験された結合分子は、完全なTrkBレセプターアゴニストであった。VH-VL配向及びそのリンカー変形形態は、さらにより強力であった。

【0402】

レセプター内部移行の変化は観察されなかった。これは、新規なDoppelmaabが完全なTrkBレセプターアゴニストであるBDNFと同様であったことを考慮すると、非常に驚くべきことであった。

【0403】

VEGF捕捉

親分子(TPP-14940/14941)とそれぞれのリンカー変形形態との間に、有意差は観察されなかった。

【0404】

CMC特性

リンカー10L1及び20L1リンカーの使用により、リンカークリッピングは、もはや観察されなかった(データを示さず)。

【0405】

次の段階として、結合分子のCMC及び生物物理学的特性を改善するために、最終シリーズの結合分子を設計した(シリーズ4)。ただし、本発明の結合分子の優れた生物学的機能を常に保存しようとした。

【0406】

実施例44

TrkB scFv部分におけるジスルフィド架橋(CC)の有無でのDoppelmaabによるヒトTrkB活性化の比較; TrkBリン酸化-シリーズ4

図44A~図44D

ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を抗TrkB scFv部分におけるCC架橋の有無で、上昇する濃度の示されたDoppelmaabと共にインキュベーションした。(A) TPP-22180対TPP-22204; (B) TPP-22192対TPP-22216; (C) TPP-22190対TPP-22214; (D) TPP-22191対TPP-22215。TrkB活性化を、Y706/707でのTrkBリン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均+/-SEMを表わす。以下の表12に、TrkB活性化の対応するベストフィットIC₅₀値及び

10

20

30

40

50

絶対又は相対有効性値（上部のプラトー）をそれぞれ報告する（非線形回帰； \log （アゴニスト）対応答（3つのパラメータ））。

【0407】

【表12】

表12:

| TPP | 図 | 記述 | TrkBリン酸化効力(EC_{50} , nM) | TrkBリン酸化有効性(AlphaLISAカウント) | CC架橋を有さない親クローンに対するTrkBリン酸化有効性(%) |
|-----------|---|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| TPP-22180 | A | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VH-VL_10L1) | 8.09 | 6642 | 100 |
| TPP-22204 | A | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VH-VL_10L1, CC) | 3.88 | 7613 | 115 |
| TPP-22192 | B | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1) | 12.2 | 5642 | 100 |
| TPP-22216 | B | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1, CC) | 4.33 | 8407 | 149 |
| TPP-22190 | C | (1Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1) | 9.95 | 4225 | 100 |
| TPP-22214 | C | (1Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1, CC) | 2.18 | 5102 | 121 |
| TPP-22191 | D | (6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1) | 5.49 | 4848 | 100 |
| TPP-22215 | D | (6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1, CC) | 1.12 | 5793 | 119 |

10

20

【0408】

結果

ジスルフィド架橋を主に、結合分子のCMC特性を改善するのに導入した。驚くべきことに、scFv抗TrkB部分にジスルフィド架橋を含ませることにより、TrkB活性化の効力及び有効性の両方がさらに改善された。VL-VH配向を有する結合分子において、より大きな影響が観察された。

【0409】

実施例45

TrkB scFv部分におけるジスルフィド架橋(CC)の有無でのDoppelmaabによるラットTrkB活性化の比較；TrkBリン酸化 - シリーズ4

図45A ~ 図45B

ラットTrkBを安定に発現するCHO細胞を抗TrkB scFv部分におけるCC架橋の有無で、上昇する濃度の示されたDoppelmaabと共にインキュベーションした。(A) TPP-22180対TPP-22204；(B) TPP-22192対TPP-22216。TrkB活性化を、Y706/707でのTrkBリン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均 \pm SEMを表わす。以下の表13に、TrkB活性化の対応するベストフィット IC_{50} 値及び絶対又は相対有効性値（上部のプラトー）をそれぞれ報告する（非線形回帰； \log （アゴニスト）対応答（3つのパラメータ））。

【0410】

30

40

50

【表 1 3】

表13:

| TPP | 図 | 記述 | TrkB リン酸化効力 (EC ₅₀ , nM) | TrkB リン酸化有効性 (AlphaLISA カウント) | CC 架橋を有さない親クローンに対する TrkB リン酸化有効性(%) |
|-----------|---|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| TPP-22180 | A | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VH-VL_10L1) | 4.21 | 19676 | 100 |
| TPP-22204 | A | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VH-VL_10L1, CC) | 2.01 | 21787 | 111 |
| TPP-22192 | B | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1) | 18.9 | 21213 | 100 |
| TPP-22216 | B | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1, CC) | 3.31 | 25808 | 122 |

10

【 0 4 1 1】

結果

s c F v 抗 T r k B 部品にジスルフィド架橋を含ませることにより、T r k B 活性化の効力及び有効性の両方が改善された。再度、V L - V H 配向の結合分子に対する影響は、より大きいようであった。全体として、データは、ヒト T r k B について得られたデータと良好に一致した。

20

【 0 4 1 2】

実施例 4 6

T P P - 2 2 2 0 4 / 2 2 2 1 4 媒介性 T r k B 活性化の選択性

図 4 6

(A) ヒト T r k A、(B) ヒト T r k B 又は (C) ヒト T r k C を安定に発現する C H O 細胞を上昇する濃度の C 2 抗体又は Doppelmab T P P - 2 2 2 0 4 もしくは T P P - 2 2 2 1 4 と共にインキュベーションした。T r k レセプターの活性化を、Y 7 0 6 / 7 0 7 でのレセプターリン酸化を測定することにより評価した。上昇する濃度の T r k A (N G F)、T r k B (B D N F) 及び T r k C (N T - 3) についての天然のリガンドとのインキュベーションを対照として使用した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

30

【 0 4 1 3】

結果

両方の Doppelmab とともに、T r k B に非常に特異的 / 選択的であった - それらは、T r k A 又は T r k C のいずれも活性化しなかった。

【 0 4 1 4】

実施例 4 7

B D N F 誘発 T r k B 活性化に対する T P P - 2 2 2 1 4 の影響

図 4 7 A ~ 図 4 7 B

ヒト T r k B レセプターを安定に発現する C H O 細胞を、一定濃度の 0 . 3 nM、1 nM 又は 3 nM B D N F の有無で、上昇する濃度の (A) C 2 抗体又は (B) Doppelmab T P P - 2 2 2 1 4 と共にインキュベーションした。T r k B の活性化を、Y 7 0 6 / 7 0 7 でのレセプターリン酸化を測定することにより評価した。データは、平均 + / - S E M を表わす。

40

【 0 4 1 5】

結果

C 2 とは非常に対照的に、T P P - 2 2 2 1 4 は、B D N F 誘発 T r k B 活性化を制限しなかった。

【 0 4 1 6】

50

実施例 4 8

ヒト V E G F の存在下又は非存在下における T P P - 2 2 2 1 4 によるヒト T r k B 活性化 (T r k B リン酸化) の比較

図 4 8 A ~ 図 4 8 D

ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞を、 (A) 2 0 0 ng/mL ヒト V E G F - A (h V E G F)、 (B) 5 0 ng/mL h V E G F、 (C) 1 0 ng/mL h V E G F、又は (D) 2 ng/mL h V E G F とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度の Doppel mab T P P - 2 2 2 1 4 と共にインキュベーションした。T r k B 活性化を、Y 7 0 6 / 7 0 7 での T r k B リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【 0 4 1 7 】

結果

先に示されたように、2 0 0 ng/mL ヒト V E G F とのプレインキュベーションにより、T P P - 2 2 2 1 4 による T r k B リン酸化 (T r k B 活性化) の効力が改善された。より重要なことには、この相乗効果が、5 0、1 0、さらには 2 ng/mL h V E G F でほぼ保持された。また、同様の効果が、他の種、例えば、カニクイザルでも得られた (データを示さず)。

【 0 4 1 8 】

実施例 4 9

ヒト V E G F の存在下又は非存在下における T P P - 2 2 2 1 4 によるヒト T r k B 活性化 (E R K リン酸化) の比較

図 4 9 A ~ 図 4 9 D

ヒト T r k B を安定に発現する C H O 細胞を (A) 2 0 0 ng/mL ヒト V E G F - A (h V E G F)、 (B) 5 0 ng/mL h V E G F、 (C) 1 0 ng/mL h V E G F 又は (D) 2 ng/mL h V E G F とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度の Doppel mab T P P - 2 2 2 1 4 と共にインキュベーションした。T r k B の活性化を、T r k B の下流である T 2 0 2 / Y 2 0 4 (E R K 1) 及び T 1 8 5 / Y 1 8 7 (E R K 2) での E R K 1 / 2 リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均 + / - S E M を表わす。

【 0 4 1 9 】

結果

同様に、2 0 0 ng/mL ヒト V E G F とのプレインキュベーションにより、T P P - 2 2 2 1 4 による T r k B 活性化の下流の E R K リン酸化の効力も改善された。また、このアッセイにおいて、相乗効果は、2 ng/mL h V E G F という低い濃度でほぼ保持された。同様の効果が、他の種、例えば、カニクイザルでも得られた (データを示さず)。

【 0 4 2 0 】

実施例 5 0

V E G F 結合により T r k B 活性化が増強される - 提案されたメカニズムの研究

図 5 0

T P P - 2 2 2 1 4 と h V E G F との複合体を 1 x ダルベッコ P B S 中において、記載されたモル比 (1 : 1、4 : 1 又は 2 0 : 1) でサンプル同士を混合することにより調製した。サンプルを室温で 1 時間インキュベーションし、その後、分析した。Agilent 1 2 0 0 を mini DAWN TREOS 及び Optilab REX と繋げて使用した。サンプルを、移動相としての 1 x ダルベッコ P B S 中において、0 . 6 ml/分の流量で流した。複合体又は T P P - 2 2 2 1 4 単独 1 0 0 µl を Superose 6 Increase カラム (3 0 cm x 1 0 mm) に注入し、そこで、分子を流体力学的体積による分離に供した。ついで、データを、Astra 6.1.1.17 を使用して分析した。

【 0 4 2 1 】

結果

T P P - 2 2 2 1 4 は、V E G F - A の存在下で複合体を形成する。最大の複合体は、

10

20

30

40

50

1 : 1 のモル比で形成される。これらの複合体は、DoppelmabとVEGFとの1 : 1の比を超える複合体形成を示唆している。これらのより大きな複合体は、細胞表面上のTrkBレセプターのクラスター形成をもたらす場合がある。実験データは、提案されたメカニズムを支持している。

【0422】

実施例51

上昇する濃度のBDNF又はTPP-22214及び1nM BDNFの存在下での上昇する濃度のTPP-22214によるヒトTrkB内部移行の比較

図51A~図51C

ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を(A)上昇する濃度の天然のTrkBリガンドであるBDNF、(B)上昇する濃度のTPP-22214又は(C)上昇する濃度のTPP-22214を伴う1nM BDNFと共にインキュベーションした。TrkB内部移行を、細胞の透過化を伴わない表面TrkBレセプターの免疫蛍光染色、続けて、共焦点顕微鏡分析により評価した。データは、閾値を上回る表面TrkB染色強度を有する細胞の割合を表わす；平均+/-SEM。

10

【0423】

結果

(A)BDNFとのインキュベーションにより、TrkBレセプター内部移行が誘発された。

【0424】

(B)TPP-22214は、TrkBレセプター内部移行を誘発しなかった。

20

【0425】

(C)上昇する濃度のTPP-22214により、BDNF誘発レセプター内部移行は減少し/消失した。

【0426】

実施例52

STZ誘発糖尿病ラットにおけるTPP-22214及びC2の神経保護効果

図52

アゴニスト性TrkB抗体(C2)及びDoppelmab TPP-22214のIVT注射を使用した糖尿病誘発網膜神経変性のラットモデルにおけるTrkB活性化の神経保護機能。動物をSTZで処置して、高血糖を誘発した。網膜機能を処置の前後に、網膜電図(ERG)により評価した。糖尿病誘発により、STZ処置後3週間以内に暗示時間の遅延がもたらされた。この時点で、動物に、アイソタイプ対照抗体(抗TNF)もしくはC2(それぞれ19µg/5µL)又は等モル量のTPP-22214(25µg/5µL)を硝子体内投与した。桿体駆動b波暗示時間は、分子の硝子体内適用の直前及び2週間後に遅延することが示された；平均+/-SEM；ⁿ・^s・ $p > 0.05$ ；有意差なし(n.s.)、**** $p < 0.0001$ ；テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。

30

【0427】

結果

投与の2週間後、抗TNF抗体処置では、抗TNF処置前の時点と比較して、糖尿病誘発桿体駆動b波暗示時間は短縮しなかった。実際、暗示遅延時間は、抗TNF抗体適用前の時点と比較して、有意に延長さえした($t = 2$ 週間で17.1ms対 $t = 0$ 週間で11.2ms；**** $p < 0.0001$)。これは、STZ誘発網膜損傷が $t = 0$ 週で完全には確立されなかったこと及び抗TNF処置が暗示時間遅延の更なる増加を止めることができなかったことを示す。

40

【0428】

投与の2週間後、C2抗体処置により、暗示時間遅延の更なる増加が防止された。一方、C2抗体処置では、C2処置前の時点と比較して、糖尿病誘発桿体駆動b波暗示時間は有意に短縮しなかった($t = 2$ 週間で10.3ms対 $t = 0$ 週間で12.8ms、ⁿ・^s・ $p > 0.05$ ；有意差なし)。

50

【 0 4 2 9 】

投与の2週間後、TPP-22214抗体処置により、TPP-22214処置前の時点と比較して、暗示時間遅延の更なる増加が防止され、糖尿病誘発桿体駆動b波暗示時間は40%超まで有意に短縮さえした(t=2週間で8.3ms対t=0週間で14.2ms、**** p<0.0001)。

【 0 4 3 0 】

実施例53

ジスルフィド架橋(CC)の有無でのDoppelmaab及び親分子であるTPP-14940/TPP-14941によるヒトVEGF-A捕捉の比較-VEGFR2のVEGF誘発リン酸化の阻害

10

図53A~図53B

VEGF-A捕捉を、Y1175でのVEGFレセプター2(VEGFR2)リン酸化を測定することにより評価した。分子処理を伴わない50ng/mlヒトVEGFを対照とした。データは、平均+/-SEMを表わす。以下の表14に、対応するベストフィットIC50値を報告する(非線形回帰;log(アゴニスト)対応答(3つのパラメータ))。

【 0 4 3 1 】

【表14】

表14:

| TPP | 図 | 記述 | VEGF誘発VEGFR2リン酸化の阻害(IC50, nM) |
|-----------|---|----------------------------------|-------------------------------|
| TPP-14941 | A | (TrkB-C2-VL-VH, 20L3) | 0.225 |
| TPP-22180 | A | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VH-VL_10L1) | 0.210 |
| TPP-22204 | A | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VH-VL_10L1, CC) | 0.199 |
| TPP-22192 | A | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1) | 0.264 |
| TPP-22216 | A | (1Q6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1, CC) | 0.331 |
| TPP-14940 | B | TrkB-C2-VH-VL, 20L3) | 0.165 |
| TPP-14941 | B | (TrkB-C2-VL-VH, 20L3) | 0.173 |
| TPP-22190 | B | (1Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1) | 0.235 |
| TPP-22214 | B | (1Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1, CC) | 0.242 |
| TPP-22191 | B | (6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1) | 0.233 |
| TPP-22215 | B | (6Q70G_TrkB-C2-VL-VH_10L1, CC) | 0.195 |

20

30

【 0 4 3 2 】

結果

親分子であるTPP-14940/TPP-14941とジスルフィド架橋の有無での各Doppelmaab変形形態との間に、有意差は無かった。VEGF誘発VEGFR2リン酸化の阻害の効力及び有効性は、実質的に同一であった。

40

【 0 4 3 3 】

実施例54

TPP-22214又はEyleaによるヒトVEGF-A捕捉の比較-Y1175でのVEGFR2及びERK1/2のVEGF誘発リン酸化(両方ともEC増殖に関連する)の阻害
図54A~図54B

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のTPP-22214又はEyleaとのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。VEGF-A捕捉を、(A)Y1175でのVEG

50

Fレセプター2 (VEGFR2) リン酸化又は (B) T202/Y204 (ERK1) 及び T185/Y187 (ERK2) での ERK1/2 リン酸化を測定することにより評価した。分子処理を伴わない 50 ng/ml ヒト VEGF を対照とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。以下の表 15 に、対応するベストフィット値を報告する (非線形回帰 (log (アゴニスト) 対応答 (3つのパラメータ))。Eylea と TPP-22214 との間で有意に異なるベストフィット値 (P < 0.05) を太字で示す。P 値も、表 15 に報告する。

【0434】

【表15】

表15:

| VEGF 誘発 VEGFR2 リン酸化(Y1175)の阻害 | 図 | Eylea | TPP-22214 | P 値 |
|---|----------|---------------|---------------|-------------------|
| 上部のプラトー (AlphaLISA カウント) | A | 17523 | 18104 | 0.4629 |
| IC ₅₀ (nM) | A | 0.339 | 0.186 | - |
| LogIC₅₀ | A | -9.470 | -9.731 | 0.0245 |
| 底部のプラトー (AlphaLISA カウント) | A | 4031 | -761.9 | <0.0001 |
| | | | | |
| VEGF 誘発 ERK1/2 リン酸化(T202/Y204 (ERK1) 及び T185/Y187(ERK2))の阻害 | 図 | Eylea | TPP-22214 | P 値 |
| 上部のプラトー (AlphaLISA カウント) | B | 108769 | 111446 | 0.7349 |
| IC ₅₀ (nM) | B | 1.95 | 0.415 | - |
| LogIC₅₀ | B | -8.709 | -9.382 | 0.0087 |
| 底部のプラトー (AlphaLISA カウント) | B | 21745 | -7737 | 0.0024 |

【0435】

結果

Eylea と比較して、TPP-22214 は、Y1175 での VEGFR2 及び ERK1/2 の VEGF 誘発リン酸化を完全に阻害した。また、TPP-22214 の VEGF 捕捉における改善された有効性も、底部のプラトーの値の大きな有意差に見ることができる (表 15 を参照のこと)。最後に、TPP-22214 は、Eylea より VEGF 捕捉において有意により強力であった。

【0436】

実施例 55

TPP-22204、TPP-22214 又は TPP-22216 と Eylea とによる ヒト VEGF-A 捕捉の比較 - HRMEC の VEGF 誘発増殖の阻害

図 55A ~ 図 55E

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の示された結合分子: (A) TPP-22204、(B) TPP-22214、(C) TPP-22216 又は (D) Eylea とのプレインキュベーションの有無で、10 ng/mL ヒト VEGF と共にインキュベーションした。VEGF-A 捕捉を、HRMEC 細胞数の自動化された画像ベースの定量化により評価した (IncuCyte)。画像を合計 84 時間にわたって 4 時間毎に記録した。相対細胞数を示す。t = 0 での細胞数を 1 に設定した。非刺激細胞を対照 (ベース) とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。(E) Eylea 又は TPP-22214 の濃度に対する増殖曲線下面積とベース曲線下面積との差のプロット。以下の表 16 に、対応するベストフィット値を報告する (非線形回帰 (log (アゴニスト) 対応答 (3つのパラメータ))。Eylea と TPP-22214 との間で有意に異なるベストフィット値 (P < 0.05) を太字で示す。P 値も、表 16 に報告する。

【0437】

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表16:

| VEGF 誘発 HRMEC 増殖デルタの阻害 (曲線下面積対ベース曲線下面積) | 図 | Eylea | TPP-22214 | P 値 |
|--|---|--------|-----------|---------|
| 上部のプラトー(任意の単位) | E | 128.9 | 128.3 | 0.9406 |
| IC ₅₀ (pM) | E | 171 | 88.7 | - |
| LogIC ₅₀ | E | -9.767 | -10.05 | 0.0093 |
| 底部のプラトー(任意の単位) | E | 13.3 | -14.2 | <0.0001 |

10

【 0 4 3 8】

結果

DoppelmabによるVEGF誘発増殖の阻害の効力及び有効性は、Eyleaより明らかに優れていた(TPP-22214とEyleaとの間のLogIC₅₀及び底部のプラトーの数値における大きな有意差)。

【 0 4 3 9】

最高濃度(16 nm)でさえ、Eyleaは、VEGF誘発発芽を完全には阻害することができなかった。対照的に、全てのDoppelmabは、0.25 nMという64倍低い濃度で既に、VEGF誘発増殖を完全に阻害する。

20

【 0 4 4 0】

実施例 5 6

TPP-22214又はEyleaによるヒトVEGF-A捕捉の比較-Y1214でのVEGFR2及びp38-MAPKのVEGF誘発リン酸化の阻害

図 5 6 A ~ 図 5 6 B

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のTPP-22214又はEyleaとのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。VEGF-A捕捉を、(A)Y1214でのVEGFR2(VEGFR2)リン酸化又は(B)T180/Y182でのp38-MAPKリン酸化を測定することにより評価した。分子処理を伴わない50 ng/mlヒトVEGFを対照とした。データは、平均+/-SEMを表わす。以下の表17に、対応するベストフィットIC₅₀値(非線形回帰; (log(アゴニスト)対応答(3つのパラメータ))を報告する。EyleaとTPP-22214との間で有意に異なるベストフィット値(P<0.05)を太字で示す。P値も、表17に報告する。

30

【 0 4 4 1】

40

50

【表 17】

表17:

| | | | | |
|-------------------------------------|----------|-------------|---------------|-------------------|
| VEGF 誘発 VEGFR2 リン酸化(Y1214)の阻害 | 図 | Eylea | TPP-22214 | P 値 |
| 上部のプラトー(AlphaLISA カウント) | A | 7150 | 7275 | 0.7759 |
| IC ₅₀ (nM) | A | 0.437 | 0.278 | - |
| LogIC ₅₀ | A | -9.360 | -9.555 | 0.1991 |
| 底部のプラトー(AlphaLISA カウント) | A | 1429 | -245.0 | <0.0001 |
| VEGF 誘発 p38-MAPK リン酸化(T180/Y182)の阻害 | 図 | Eylea | TPP-22214 | P 値 |
| 上部のプラトー(AlphaLISA カウント) | B | 23071 | 25363 | 0.1608 |
| IC ₅₀ (nM) | B | 0.748 | 0.472 | - |
| LogIC ₅₀ | B | -9.126 | -9.326 | 0.4202 |
| 底部のプラトー(AlphaLISA カウント) | B | 8894 | -1489 | <0.0001 |

10

【0442】

結果

Eyleaとは非常に対照的に、TPP-22214は、Y1214でのVEGFR2及びp38-MAPKのVEGF誘発リン酸化を完全に阻害した。TPP-22214のより有効なVEGF捕捉は、表17における底部のプラトーの値の大きな有意差に見ることができる。さらに、TPP-22214によるVEGF捕捉の効力がEyleaの効力より良好であるという傾向が観察された。

20

【0443】

実施例57

TPP-22204、TPP-22214、TPP-22215又はTPP-22216とEyleaとによるヒトVEGF-A捕捉の比較 - VEGF誘発HRMEC発芽の阻害

図57A ~ 図57B

ヒト網膜微小血管内皮細胞(HRMEC)のスフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋した。内皮の発芽を2.5nM TPP-22204、TPP-22214、TPP-22215もしくはTPP-22216又は5nM Eyleaとのプレインキュベーションの有無で、50ng/mL ヒトVEGFとのインキュベーションにより24時間誘発した。(A)内皮の発芽を共焦点顕微鏡により評価し、Zスタックの最大投影から得られたスフェロイド外周を示した。非刺激細胞を対照(ベース)とした。データは、平均+/-SEMを表わす。n.s. p>0.05 有意差なし、**** p<0.0001。(B)ベース条件下又は2.5nM TPP-22214もしくは5nM Eyleaとのプレインキュベーションの有無での50ng/mL ヒトVEGFにより刺激後の24時間の発芽後のスフェロイドからの代表的な最大投影画像を示す。バー=100µm。

30

【0444】

結果

Y1214 VEGFR2リン酸化アッセイと同様に、Doppelmabは、VEGF誘発HRMEC発芽の阻害において、常に有効であった。さらに、Doppelmabは、VEGF誘発内皮細胞発芽を完全に阻害することが可能であった。注目すべきことに、EyleaをDoppelmabと比較して2倍の分子濃度で使用したが、依然として、細胞発芽を完全には阻害することができなかった。

40

【0445】

実施例58

TPP-22214又はEyleaによるヒトVEGF-A捕捉の比較 - Y951でのVEGFR2及びSrcのVEGF誘発リン酸化の阻害

図58A ~ 図58B

50

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度の TPP-22214 又は Eylea とのプレインキュベーションの有無で、50 ng/mL ヒト VEGF と共にインキュベーションした。VEGF-A 捕捉を、(A) Y951 での VEGF レセプター 2 (VEGFR2) リン酸化又は (B) Y419 での Src リン酸化を測定することにより評価した。抗体処理を伴わない 50 ng/ml ヒト VEGF を対照とした。データは、平均 + / - SEM を表わす。以下の表 18 に、対応するベストフィット値を報告する (非線形回帰; (log (アゴニスト) 対応答 (3 つのパラメータ))。Eylea と TPP-22214 との間で有意に異なるベストフィット値 (P < 0.05) を太字で示す。P 値も、表 18 に報告する。

【0446】

【表18】

表18:

| VEGF 誘発 VEGFR2 リン酸化(Y951)の阻害 | 図 | Eylea | TPP-22214 | P 値 |
|------------------------------|---|-------------|---------------|-------------------|
| 上部のプラトー (AlphaLISA カウント) | A | 20491 | 20757 | 0.8567 |
| IC50 (nM) | A | 0.540 | 0.340 | - |
| LogIC50 | A | -9.268 | -9.469 | 0.2856 |
| 底部のプラトー (AlphaLISA カウント) | A | 5133 | -743.9 | <0.0001 |
| VEGF 誘発 Src リン酸化(Y419)の阻害 | 図 | Eylea | TPP-22214 | P 値 |
| 上部のプラトー (AlphaLISA カウント) | B | 3425 | 3405 | 0.8832 |
| IC50 (nM) | B | 0.933 | 0.426 | - |
| LogIC50 | B | -9.370 | -9.030 | 0.2219 |
| 底部のプラトー (AlphaLISA カウント) | B | 2207 | 1629 | <0.0001 |

【0447】

結果

Eylea とは非常に対照的に、TPP-22214 は、Y951 での VEGFR2 及び Y419 での Src の VEGF 誘発リン酸化を完全に阻害した。TPP-22214 のより有効な VEGF-捕捉は、底部のプラトーの値の大きな有意差に見ることができる (表 18)。

【0448】

実施例 59

Doppelstab TPP-22214 及び Eylea によるヒト VEGF-A 捕捉の比較 - Brown Norway ラットにおけるヒト VEGF-A 誘発網膜透過性亢進の阻害

図 59A ~ 図 59B

TPP-22214 により、ラット網膜におけるヒト VEGF-A 誘発透過性亢進が防止された。(A) 実験手法を示す時間プロトコール。抗 VEGF 化合物 (13 又は 26 pmol/眼 Eylea 又は TPP-14940) 又は対照 (26 pmol TPP-11737) の硝子体内 (i.v.t) 投与の 15 分後、13 pmol/眼 ヒト VEGF-A を i.v.t 注射により投与した。PBS 注射を対照とした。24 時間後、1 mL/kg エバンスブルー (EB) 溶液 (0.9% 生理食塩水中の 45 mg/mL) を静脈内 (i.v) 注射により 30 分間投与し、その後、眼を単離し、固定した。同じ時点で、血漿サンプルを収集し、全身 EB 曝露量が等しいことを確認した。(B) Brown Norway ラットの網膜における VEGF-A 誘発透過性亢進の定量を、共焦点顕微鏡により網膜フラットマウントにおける EB 血管外漏出を測定することにより行った。眼を鋸状縁に沿って切断し、水晶体及び硝子体を除去し、眼杯をパラホルムアルデヒド (4%) 中において、4 で 1 時間固定し、ついで、4 で一晩 PBS に移した。網膜を外側セグメント (強膜及び脈絡膜) から分離し、スライドガラスに移し、4 回切断して、平坦なクローバー葉様構造を達成した。組織をマウンティング媒

10

20

30

40

50

体 (DNA 染色 DAPI を含有する Vectashield H-1200) で覆い、カバースリップを上
に置き、網膜フラットマウントを得た。サンプルを 639 nm の波長で励起し、669 nm
でのエバンスブルーの発光を LSM 700 共焦点レーザー走査顕微鏡 (Carl Zeiss, Jena ;
ゲイン 800、レーザー強度 2%、5 スタック 60 μ m) で記録し、最大強度投影を有
する網膜フラットマウントの画像を得た。蛍光強度の合計の分析を 30 の閾値でプログラ
ム ImageJ において画像を開いた後に行った。*** $p < 0.001$; * $p < 0.05$;
n.s. $p > 0.05$ 。テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析。n =
9 ~ 17。67 : 1 のモル比の Eylea と共に インキュベーション。VEGF を比較のため
に示す。

【0449】

10

結果

対象条件下において、硝子体内 VEGF - A 注射により、血管透過性が約 60% 向上し
た。注: TPP - 11737 を対照分子として使用した。TPP - 22214 と同じ分子
フォーマット (Doppelmaab) を有したが、初期の *in vitro* アッセイにおいて、V
EGF を捕捉しなかったためである (上記を参照のこと)。

【0450】

結合分子対 VEGF の 1 : 1 の分子比で、TPP - 22214 は血管透過性亢進を完全
に遮断した。一方、はっきりと対照的に、Eylea は、同じ条件下でかつ 2 倍の濃度でさえ
も、血管漏出を顕著に減少させることができなかった。67 : 1 の非常に高い分子比での
み、Eylea により、ヒト VEGF 誘発血管漏出を阻害することが可能であった。

20

【0451】

実施例 60

TPP - 22214 による VEGF 捕捉に対する TrkB 結合の影響 - TrkB 細胞外ド
メインの存在下又は非存在下での TPP - 22214 によるヒト VEGF - A 捕捉の比較
図 60A ~ 図 60B

(A) TrkB 細胞外ドメイン (TrkB - ECD) の機能的特徴。ヒト TrkB を安
定に発現する CHO 細胞を上昇する濃度の天然のリガンドである BDNF 又は上昇する濃
度の TrkB - ECD を伴う 10 nM BDNF と共に インキュベーションした。TrkB
活性化を、Y706 / 707 での TrkB リン酸化を測定することにより評価した。最低
化合物濃度を溶媒単独とする。データは、平均 + / - SEM を表わす。

30

【0452】

(B) TPP - 22214 の TrkB - ECD 結合が VEGF 誘発 VEGFR2 リン酸
化の阻害に及ぼす影響。ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を飢餓状態にし、つい
で、50 ng/mL ヒト VEGF、上昇する濃度の TPP - 22214 を伴う 50 ng/mL ヒ
ト VEGF 又は上昇する濃度の TPP - 22214 及び 100 nM TrkB - ECD を伴
う 50 ng/mL ヒト VEGF と共に インキュベーションした。50 ng/mL VEGF の有無
での上昇する濃度の TrkB - ECD との HRMEC インキュベーション及び非刺激細胞
(ベース) を対照とした。VEGF - A の捕捉を、Y1175 での VEGFR2
(VEGFR2) リン酸化を測定することにより評価した。データは、平均 + / - SEM
を表わす。

40

【0453】

結果

図 (A) : BDNF を上昇する濃度の TrkB - ECD と共に プレインキュベ
ーションすると、TrkB レセプターの活性化が劇的に低下した。これは、BDNF に結合し、こ
れを捕捉することが可能であることを示した。これは、機能的 TrkB - ECD から期待
されたことである。

【0454】

図 (B) : TPP - 22214 による VEGF 捕捉は、TrkB - ECD の有無とは無関
係であった。両曲線は、ほぼ同一であった。これは、TPP - 22214 の TrkB 結合
自体が Doppelmaab の VEGF 捕捉を制限しなかったことを示した。これは、Doppelmaab

50

が T r k B レセプターを同時に活性化し、V E G F を捕捉することができることを示唆している。

【 0 4 5 5 】

実施例 6 1

C M C 特性を改善するための操作の取り組み

シリーズ 3 ~ シリーズ 4

シリーズ 3 及びシリーズ 4 からの分子の生物物理学的特性を評価した。分子の製造中、プロテイン A がモノマーの割合により測定された後の品質を、分析用サイズ排除クロマトグラフィーを使用して試験した。さらに、各分子の熱安定性及び凝集開始を 1 0 m M ヒスチジン p H 6 . 0 中で評価した。熱安定性を、Sypro-orange 色素を使用して温度によるタンパク質のアンフォールディングを測定する熱シフトアッセイを使用して測定した。各 T_m を温度にわたる蛍光シグナルの一次導関数のピーク最大値として計算した。凝集開始を、動的光散乱を使用して測定し、流体力学的半径を温度の関数として測定した。最後に、種々の Doppelmab の保存安定性を、4 0 又は 5 のいずれかで、2 週間後の凝集を測定することにより試験した。凝集を、分析用サイズ排除クロマトグラフィーを使用して測定した。

10

【 0 4 5 6 】

分子モデリングを使用して、Ranibizumab の F v 部分の p I を潜在的に上昇させることができ、したがって、その立体配座安定性に影響を及ぼすことなく、その溶解度を潜在的に改善することができる単一の点突然変異を特定した。この計算設計演習は、3 つのフレームワーク突然変異、すなわち、V H E 1 Q、V H E 6 Q 及び V L D 7 0 G を示唆する。ここで、V H 及び V L はそれぞれ、Ranibizumab F v における重鎖及び軽鎖の可変部分を指す。重鎖における突然変異である V H E 1 Q 及び V H E 6 Q は、これらの位置でのヒト生殖系列残基に対応する。軽鎖における突然変異である V L D 7 0 G は、Ranibizumab F v の負に帯電したパッチに曝露された溶媒を破壊すると予想される。

20

【 0 4 5 7 】

操作の取り組みにより、Doppelmab の全体的な生物物理学的特性が向上し、分子全体についての改善された C M C 特性に変換された。プロテイン A 後のモノマーの割合の向上が、試験されたほとんどの分子について見られた。これにより、分子の全体的な製造可能性が改善される。T_m 1 及び T_{a g g} に見られる改良により、操作が分子の立体配座及びコロイド安定性を改善したことが示される。これにより、4 0 及び 5 の両方において、より良好な安定性プロファイルがさらにもたらされる。

30

【 0 4 5 8 】

40

50

【表 19】

表19:

| | | TPP-19988 | TPP-22173 | TPP-22204 | TPP-22192 | TPP-22216 | TPP-22190 | TPP-22214 |
|----------------------|-----------------------|---------------|------------------|--|-------------------------------------|--|----------------------------------|---|
| | | TrkB-C2-VL-VH | TrkB-C2-VL-VH-CC | 1Q6Q70G- _TrkB-C2-VH- VL_10L1- CC | 1Q6Q70G- _TrkB-C2-VL- VH_10L1 | 1Q6Q70G- _TrkB-C2-VL- VH_10L1- CC | 1Q70G- TrkB-C2-VL- VH_10L1 | 1Q70G- TrkB-C2-VL- VH_10L1- CC |
| プロテイン A 後の品質 | % モノマー | 70.9 | 91.49 | 87.5 | 74.6 | 87.2 | 78.7 | 87.3 |
| 熱シフトアッセイ | T _m 1 (°C) | 60 | 62.7 | 60.2 | 60.1 | 63.0 | 59.8 | 61.9 |
| | T _m 2 (°C) | 66.7 | 69.7 | 70.8 | 71.4 | 70.1 | 68.3 | 70.8 |
| 凝集開始温度 | T _{agg} (°C) | 54 | 61 | 58.0 | 53.0 | 62.0 | 53.0 | 60.0 |
| 50 mg/mL での 2 週間の安定性 | 40°Cでの Δ% モノマー | 9.46 | 0.32 | 0.1 | 6.2 | 0.1 | 1.6 | 0.1 |
| | 5°Cでの Δ% モノマー | 5.08 | 0.12 | 0.0 | 0.6 | 0.1 | 0.8 | 0.1 |

10

20

【0459】

実施例 6 2

T P P - 2 2 2 1 4 の硝子体半減期の測定

ニュージーランド白色メスのウサギに、T P P - 2 2 2 1 4 又はBevacizumabの両側硝子体内投与を受けさせた。硝子体サンプルを種々の時点で収集し、T P P - 2 2 2 1 4 又はBevacizumabについての濃度をELISAにより測定した。動物に、硝子体内投与前及び硝子体内投与後一定期間ごとに眼の検査を受けさせた。

30

【0460】

【表 20】

表20:

| ターゲッティング | TrkB & VEGF | VEGF | | | |
|------------|-------------|-------------|--|---|--|
| 分子 | TPP-22214 | Bevacizumab | Bevacizumab | Ranibizumab | Aflibercept |
| フォーマット | Doppelmab | IgG | IgG | Fab | 融合タンパク質 |
| 分子量 (kDa) | 202 | 149 | 149 | 48 | 115 |
| 硝子体半減期 (日) | 6.7 | 4.3 | 4.3 | 2.9 | 3.9 |
| 刊行物 | 実験的に決定 | 実験的に決定 | Bakri, S., Ophthalmology 2007, 114 (5): 855-859 | Bakri, S., Ophthalmology 2007, 114 (12): 2179-82 | Park, S., IOVS, 2016, 57 (6), 2613 |

40

【0461】

表 20 に、T P P - 2 2 2 1 4 及びBevacizumabの実験的に決定された硝子体半減期の結果を示し、社内で実験的に決定された値を、Bevacizumab、Ranibizumab及びAflibe

50

receptの公知の文献値と比較する。Bevacizumabの報告された半減期は、適用された方法の正確性及びデータセットの比較可能性を確認する、社内/実験的に導出された値と同一である。TPP-22214は、ウサギにおいて、例えば、Bevacizumabと比較して約50%高いin vivo半減期を有することが示された(6.7日対4.3日)。

【0462】

【表21】

表21:

| 眼のVEGF(房水、滲出AMD患者) | | | | | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|-----|---------------------------------|-----|---|------|--|-----|
| 刊行物 | Hsu, M., Sci Rep 2016, 6:34631 | | Sato T, Sci Rep 2018; 8:1098 | | Hata M, IOVS 2017, 58 (1): 292- 298 | | Cabral T, Int J Retin Vitr 2017, 3:6 | |
| VEGF 濃度 | pg/mL | pM | pg/mL | pM | pg/mL | pM | pg/mL | pM |
| | | 546 | 28 | 228 | 12 | 90.0 | 4.7 | 180 |

10

【0463】

表21に、滲出加齢黄斑変性症(wAMD)患者における眼のVEGF濃度の文献値を報告する。

【0464】

【表22】

表22:

| TPP-22214の服用間隔 (Bevacizumabのヒト $t_{1/2}$ に基づいて計算) | |
|--|------|
| 種 | ヒト |
| 眼の体積(mL) | 4.5 |
| 0.05 mLでのターゲット用量(mg) | 2 |
| トラフ濃度(pM) | 400 |
| トラフ濃度を上回る $t_{1/2}$ の数字 | 12.4 |
| 文献からのBevacizumabのヒト $t_{1/2}$ (日) | 9.7 |
| トラフ濃度を上回る日数 | 121 |
| 服用間隔(月) | 3.95 |

30

【0465】

表21に示された値に基づいて、Bevacizumabのヒト硝子体内半減期($t_{1/2}$)(9.7日; Hutton-Smith, L., Mol. Pharmaceutics, 2016, 13, 2941-2950)を使用することによってのみ、TPP-22214のヒト投与頻度の保存的推定を計算した(表21)。2 mg/眼の用量では、4か月の投与間隔が妥当である。

40

【0466】

実施例63

BDNF、TPP-6830並びに2つのDoppelmaB TPP-23457及びTPP-23459によるヒトTrkB活性化の比較

図61A~図61B

ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を上昇する濃度の天然のTrkBリガンドであるBDNF、TPP-6830(更なるモノクローナルTrkB抗体)又は2つのDoppelmaB TPP-23457(scfvとしてのTPP-6380、10L1、VH-VL; FabとしてのRanibizumab)及びTPP-23459(scfvとしてのTPP6

50

380、10L1、VL-VH; FabとしてのRanibizumab)と共にインキュベーションした。

【0467】

ここで、新規なDoppelmaab分子は、C2 TrkBバインダーに基づくDoppelmaabで観察された効果が異なるTrkBバインダーでも再現することができるかどうかを評価するために、異なるTrkBバインダー(TPP-6830)に基づいていた。

【0468】

結果

再度、TPP-6830(元のTrkB抗体は、部分的TrkBレセプターアゴニストである)とは非常に対照的に、2つの新規なDoppelmaab TPP-23457及びTPP-23459 Doppelmaabは、ここでは、完全なTrkBレセプターアゴニスト活性を示した。これらのDoppelmaabによるTrkB活性化は、天然のリガンドであるBDNFと少なくとも同じ効果があった。

【0469】

これは、結合分子の立体形成が特定のTrkBバインダーとは無関係に、観察された有効性の向上を担う場合があるという理論をさらに支持している。

【0470】

実施例64

ヒトVEGFの存在下又は非存在下でのTPP-6830(TrkBモノクローナル抗体)並びに2つのDoppelmaab TPP-23457及びTPP-23459によるヒトTrkB活性化(TrkBリン酸化)の比較

図62A~図62C

ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を200ng/mLヒトVEGF-A(hVEGF)とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度のDoppelmaab(A)TPP-23457、(B)TPP-23459又は(C)TPP-6830と共にインキュベーションした。TrkB活性化を、Y706/707でのTrkBリン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0471】

結果

再度、ヒトVEGFとのプレインキュベーションにより、TPP-23457(scFvとしてのTPP-6830、10L1、VH-VL; FabとしてのRanibizumab)及びTPP-23459(scFvとしてのTPP-6380、10L1、VL-VH; FabとしてのRanibizumab)によるTrkBリン酸化(TrkB活性化)の効力が、劇的に改善された。

【0472】

VEGFプレインキュベーションは、TPP-6830(対照)によるTrkBリン酸化(TrkB活性化)の効力に影響を及ぼさなかった。

【0473】

これは、観察された効力の向上が特定のTrkBバインダーとは無関係であるという理論をさらに支持している。

【0474】

実施例65

ヒトVEGFの存在下又は非存在下でのTPP-6830(TrkBモノクローナル抗体)並びに2つのDoppelmaab TPP-23457及びTPP-23459によるヒトTrkB活性化(ERKリン酸化)の比較

図63A~図63C

ヒトTrkBを安定に発現するCHO細胞を200ng/mLヒトVEGF-A(hVEGF)とのプレインキュベーションの有無で、上昇する濃度のDoppelmaab(A)TPP-23457、(B)TPP-23459又は(C)TPP-6830と共にインキュベ

10

20

30

40

50

ーションした。Trk B活性化を、Trk Bの下流であるT202/Y204 (ERK1)及びT185/Y187 (ERK2)でのERK1/2リン酸化を測定することにより評価した。最低化合物濃度を溶媒単独とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0475】

結果

ここでも、ヒトVEGFとのプレインキュベーションにより、TPP-23457 (scFvとしてのTPP-6830、10L1、VH-VL; FabとしてのRanibizumab)及びTPP-23459 (scFvとしてのTPP-6380、10L1、VL-VH; FabとしてのRanibizumab)によるERK1/2リン酸化 (Trk B活性化)の効力が、劇的に改善された。

10

【0476】

先に示されたように、VEGFプレインキュベーションは、TPP-6830 (対照)によるERK1/2リン酸化 (Trk B活性化)の効力に影響を及ぼさなかった。これは、観察された効力の向上が特定のTrk Bバインダーとは無関係であるという理論をさらに支持している。

【0477】

実施例66

BDNF誘発Trk B活性化 (Trk Bリン酸化)に対するTPP-23457の影響
図64A~図64B

ヒトTrk Bレセプターを安定に発現するCHO細胞を一定濃度の0.3nM、1nM又は3nM BDNFの有無で、上昇する濃度の(A)C2抗体又は(B)DoppelmaB TPP-23457と共にインキュベーションした。Trk Bの活性化を、Y706/707でのレセプターリン酸化を測定することにより評価した。データは、平均+/-SEMを表わす。

20

【0478】

結果

C2とは非常に対照的に、TPP-23457は、BDNF誘導Trk B活性化を制限しなかった。

【0479】

実施例67

BDNF誘発Trk B活性化 (Erkリン酸化)に対するTPP-23457の影響
図65A~図65B

ヒトTrk Bレセプターを安定に発現するCHO細胞を一定濃度の0.3nM、1nM又は3nM BDNFの有無で、上昇する濃度の(A)C2抗体又は(B)DoppelmaB TPP-23457と共にインキュベーションした。Trk Bの活性化を、Trk Bの下流であるT202/Y204 (ERK1)及びT185/Y187 (ERK2)でのERK1/2リン酸化を測定することにより評価した。データは、平均+/-SEMを表わす。

30

【0480】

結果

C2とは非常に対照的に、TPP-23457は、Trk Bの下流であるBDNF誘発Erkリン酸化を制限しなかった。

40

【0481】

実施例68

Y1175でのVEGFR2及びERK1/2のVEGF誘発リン酸化 (両方ともEC増殖に関連する)のTPP-22214、TPP-23457又はTPP-23459の阻害によるヒトVEGF-A捕捉の比較
図66A~図66B

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC)を飢餓状態にし、ついで、上昇する濃度のTPP-22214、TPP-23457又はTPP-23459とのプレインキュベーションの有無で、50ng/mLヒトVEGFと共にインキュベーションした。VEGF-A捕

50

捉を、(A) Y1175でのVEGFレセプター2 (VEGFR2)リン酸化又は(B) T202/Y204 (ERK1)及びT185/Y187 (ERK2)でのERK1/2リン酸化を測定することにより評価した。分子処理を伴わない50 ng/ml ヒトVEGFを対照とした。データは、平均+/-SEMを表わす。

【0482】

結果

Doppelmaab TPP - 23457及びTPP - 23459のVEGF捕捉は、TPP - 22215と実質的に同一であった。

【0483】

予想どおり、種々のTrkB scFvバインダー (TPP - 6830及びC2ではない) に基づくDoppelmaabも、FabのVEGF捕捉機能に影響を及ぼさなかった。

10

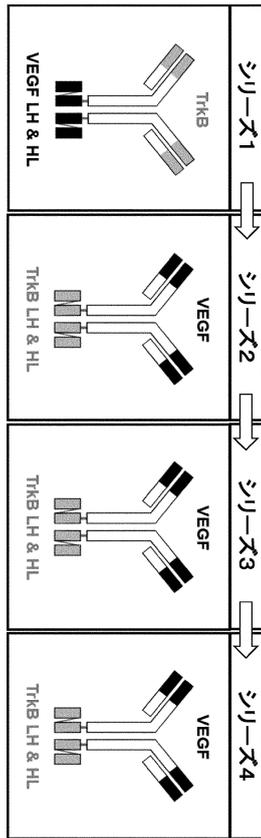
20

30

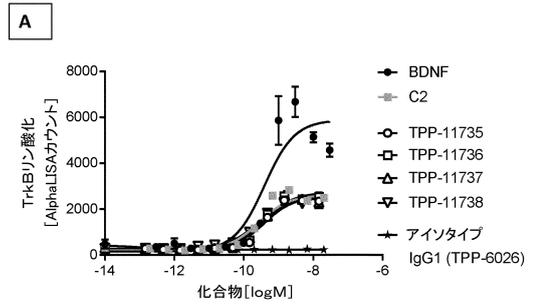
40

50

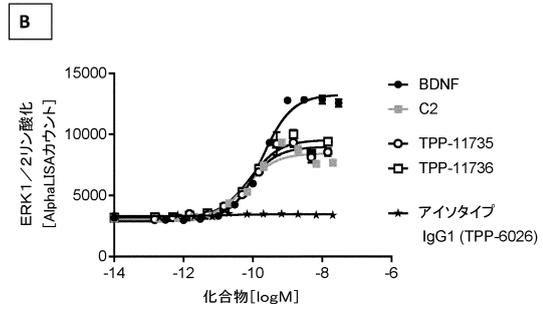
【図面】
【図 1】



【図 2 A - B】

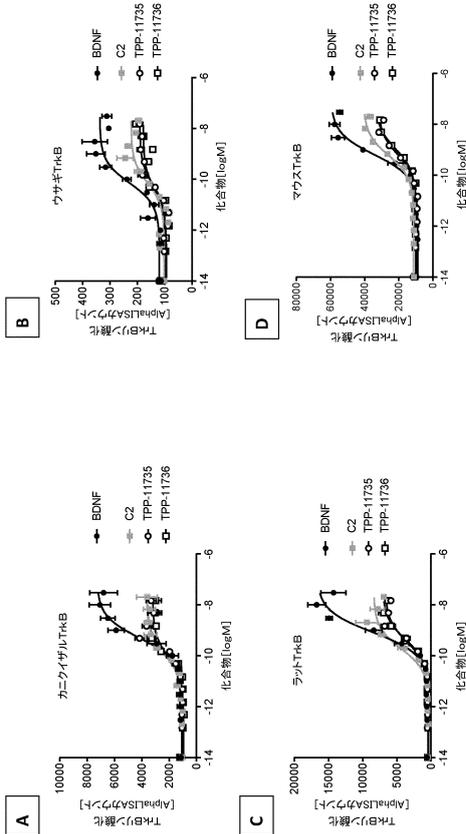


10

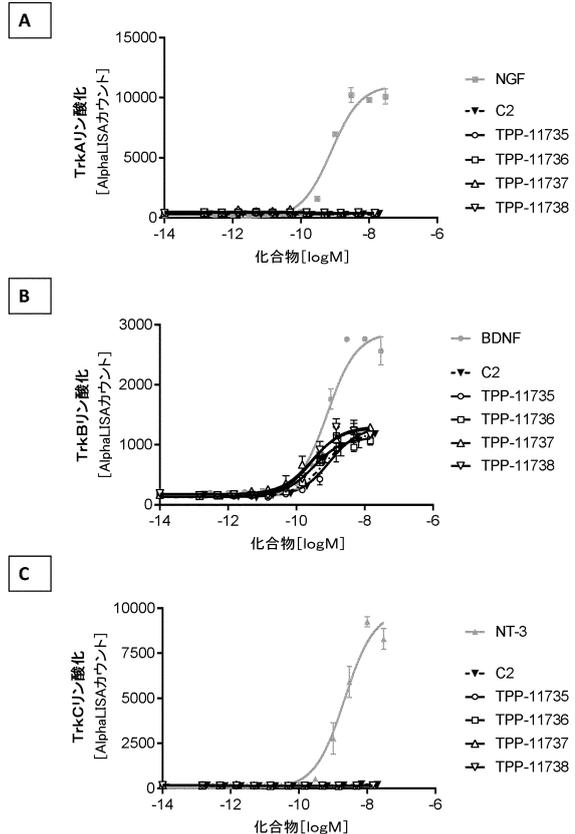


20

【図 3 A - D】



【図 4 A - C】

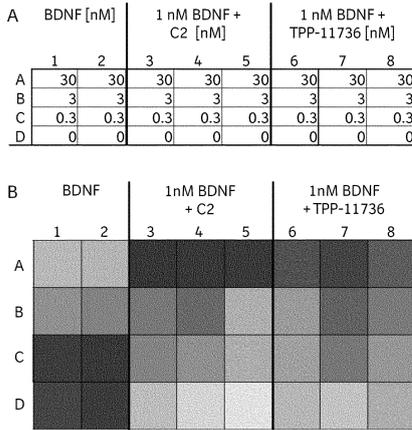


30

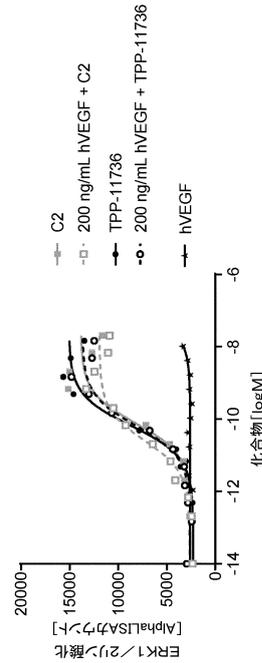
40

50

【 5 A - B 】



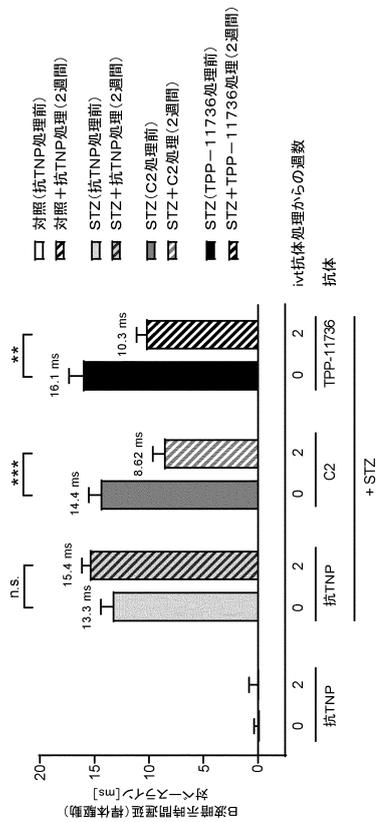
【 6 】



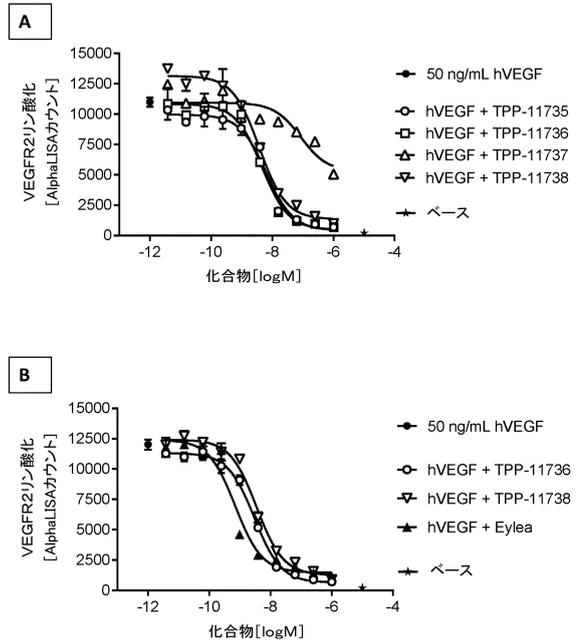
10

20

【 7 】



【 8 A - B 】

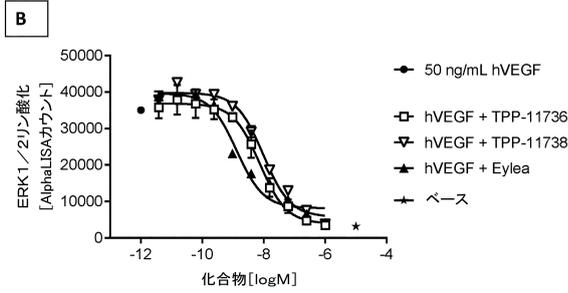
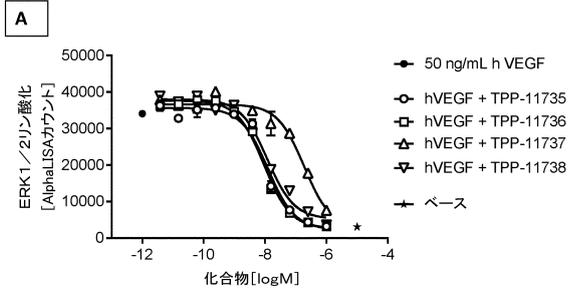


30

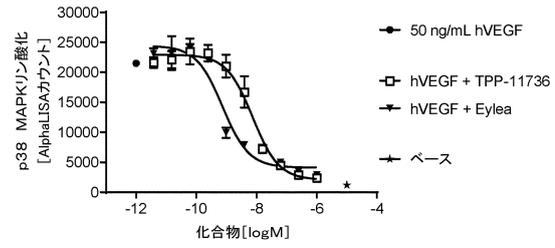
40

50

【 図 9 A - B 】

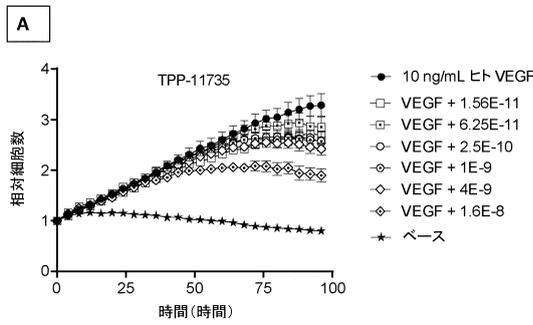


【 図 10 】

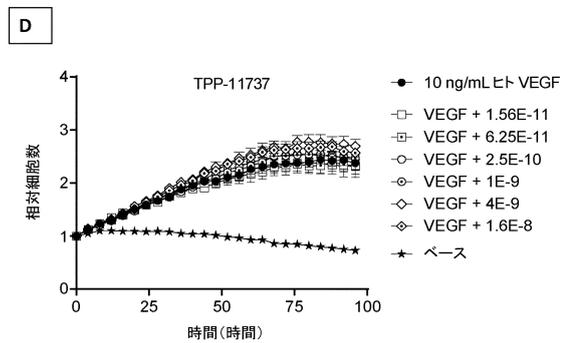
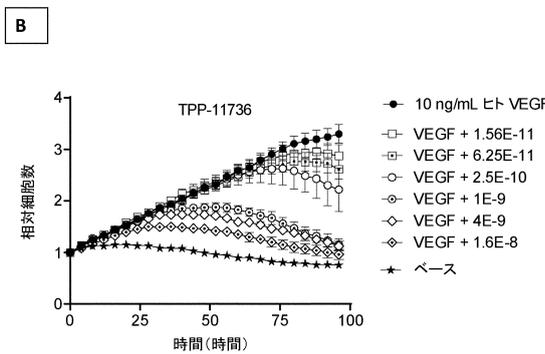
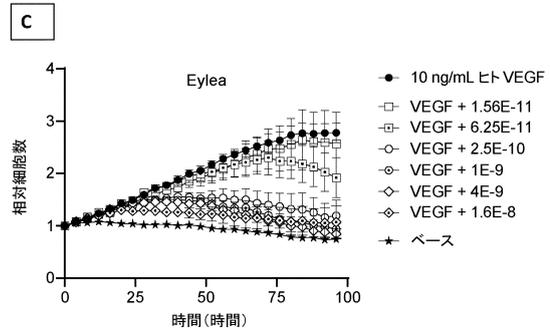


10

【 図 11 A - B 】



【 図 11 C - D 】



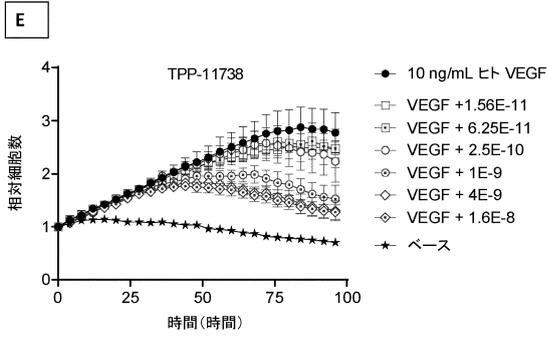
20

30

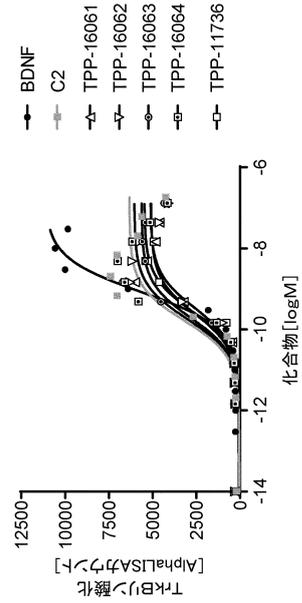
40

50

【図 1 1 E】

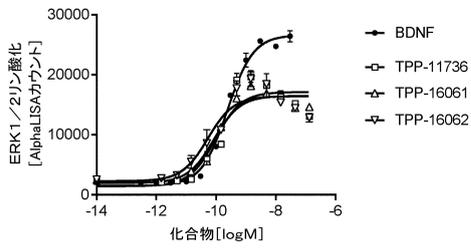


【図 1 2】



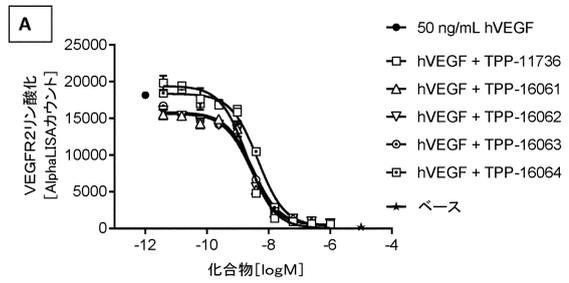
10

【図 1 3】

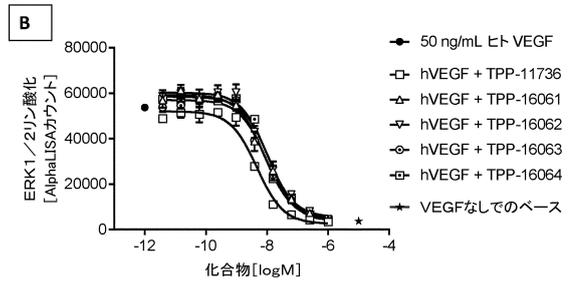


20

【図 1 4 A - B】



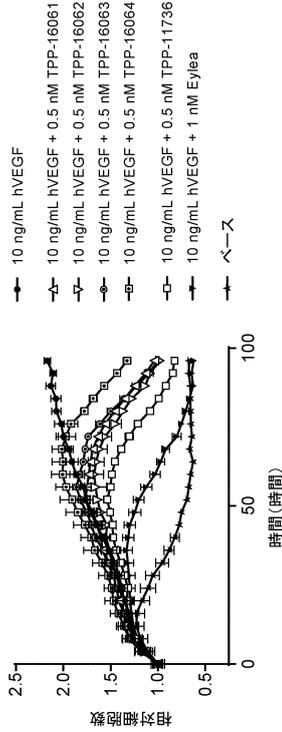
30



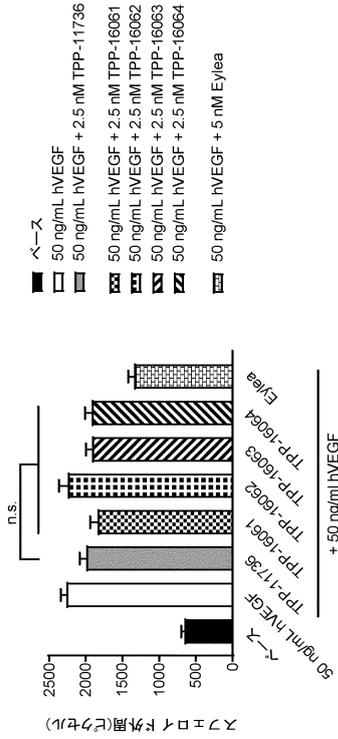
40

50

【 図 15 】



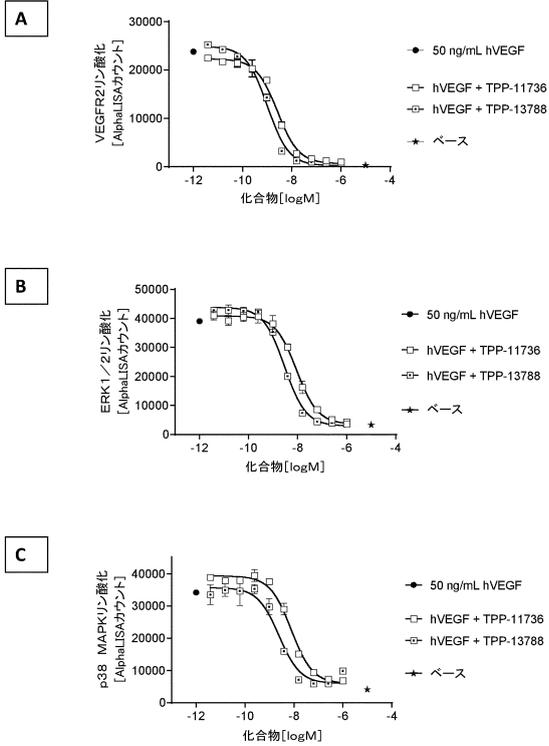
【 図 16 】



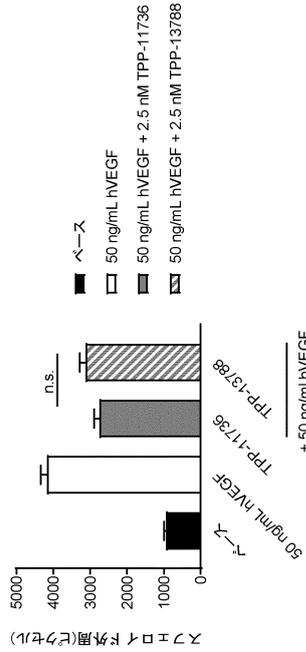
10

20

【 図 17 A - C 】



【 図 18 】

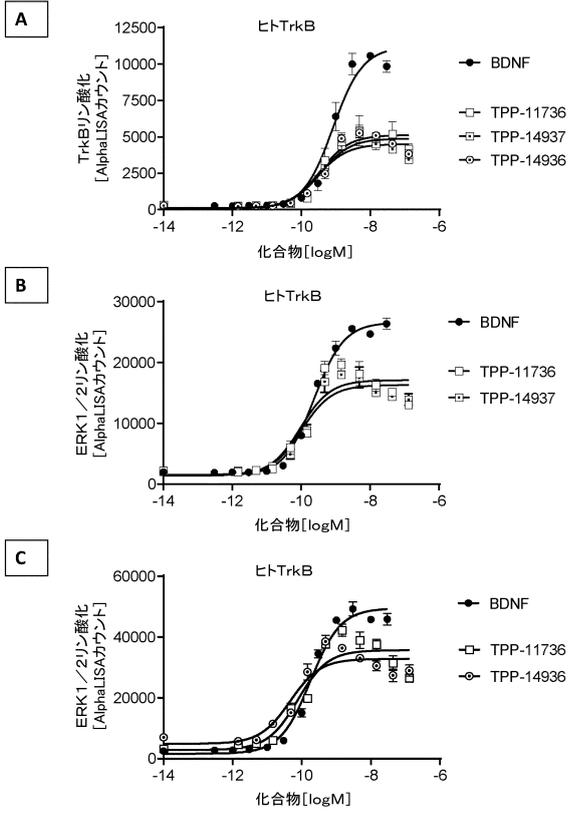


30

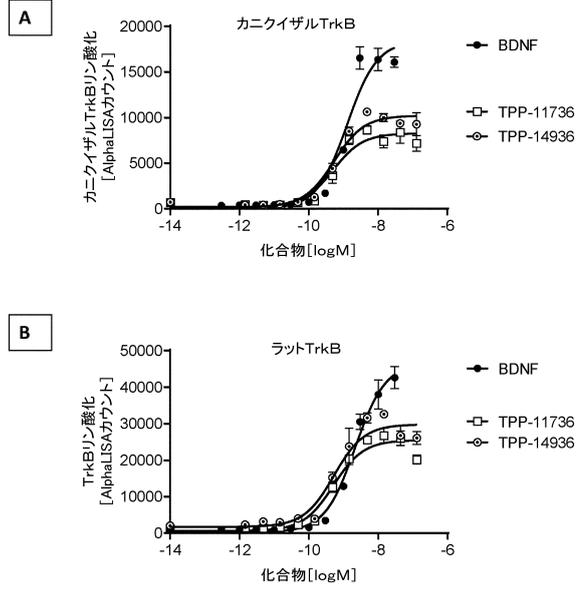
40

50

【 19 A - C 】



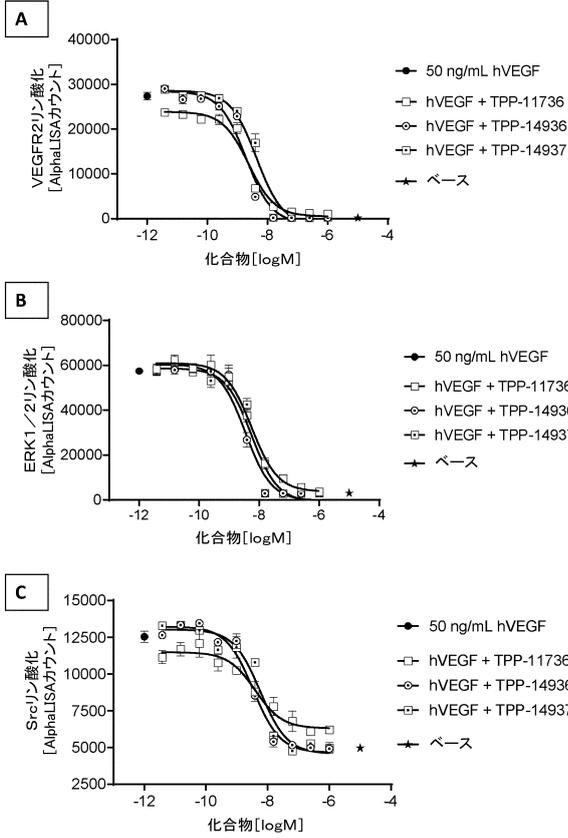
【 20 A - B 】



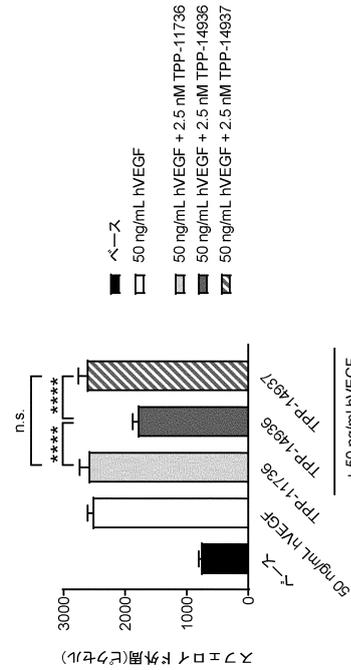
10

20

【 21 A - C 】



【 22 】

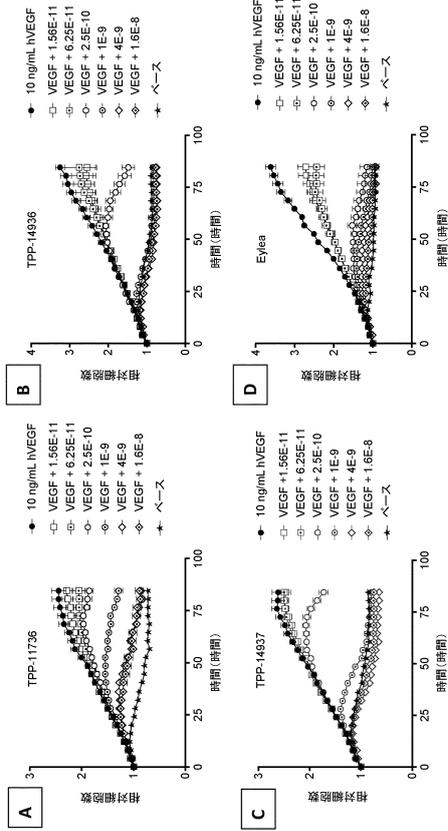


30

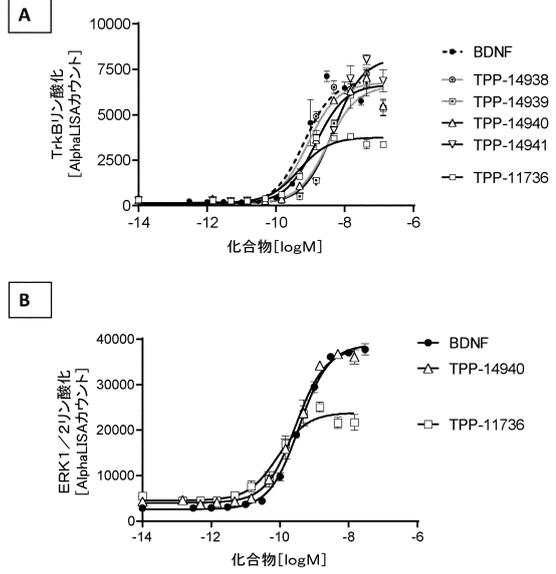
40

50

【図 2 3 A - D】



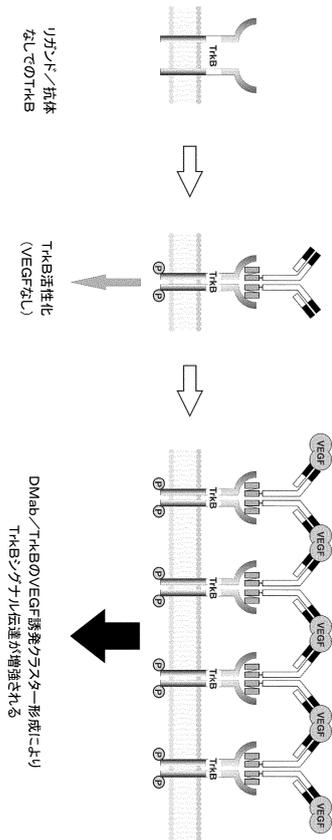
【図 2 4 A - B】



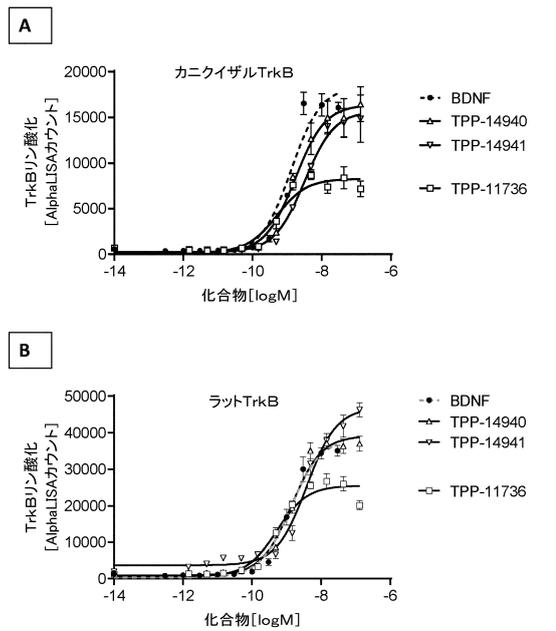
10

20

【図 2 5】



【図 2 6 A - B】

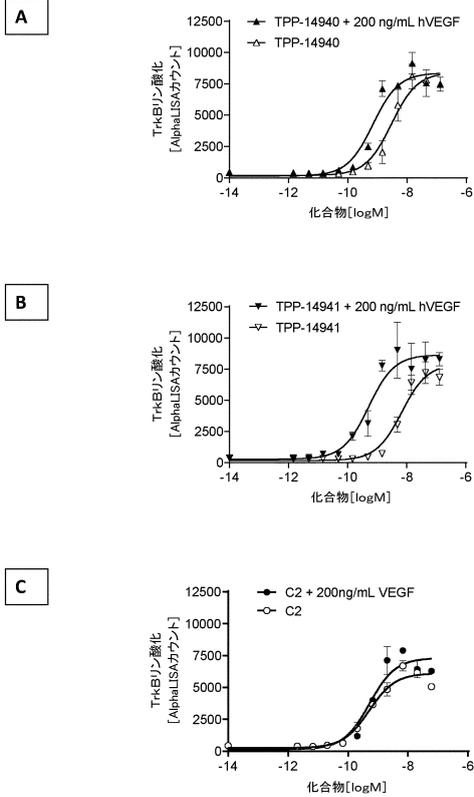


30

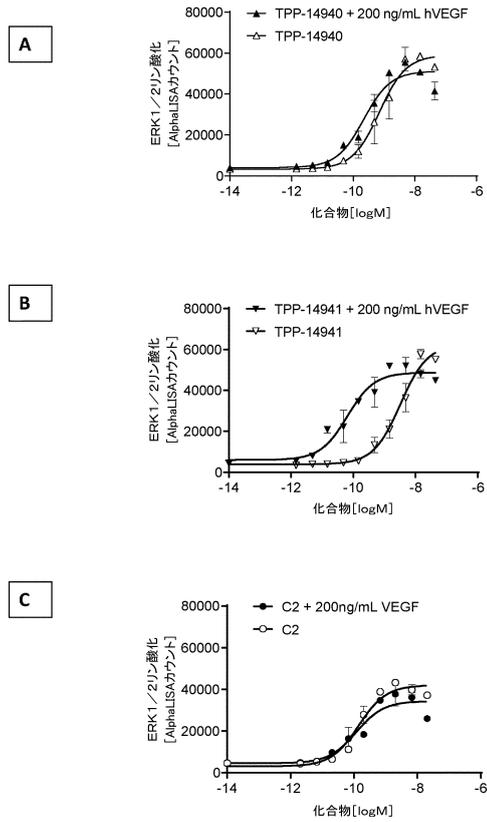
40

50

【図 27 A - C】



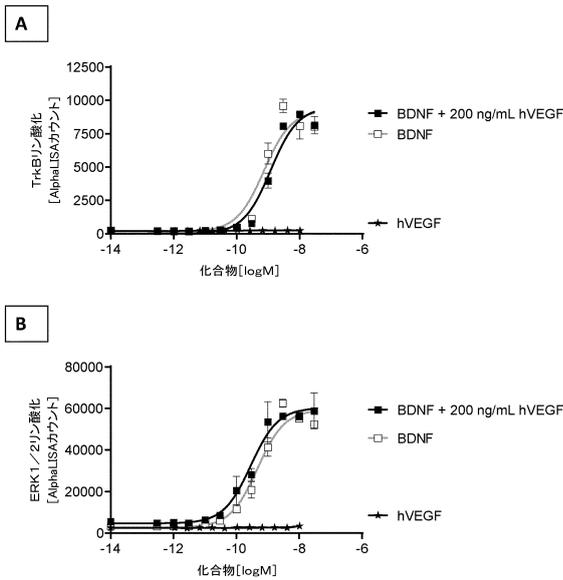
【図 28 A - C】



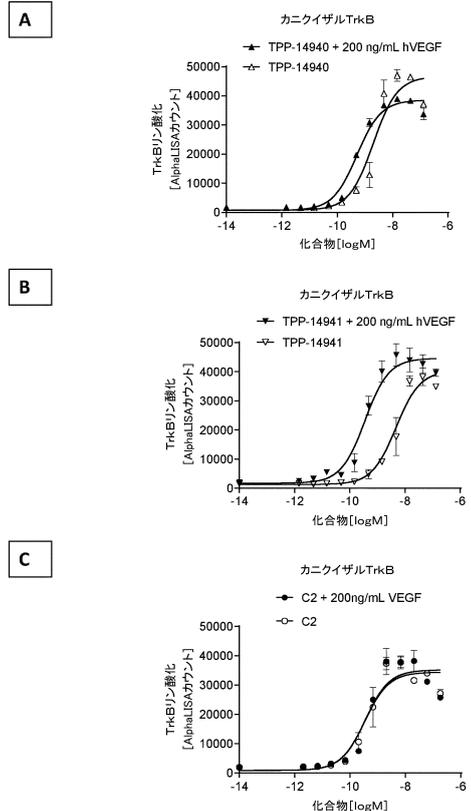
10

20

【図 29 A - B】



【図 30 A - C】

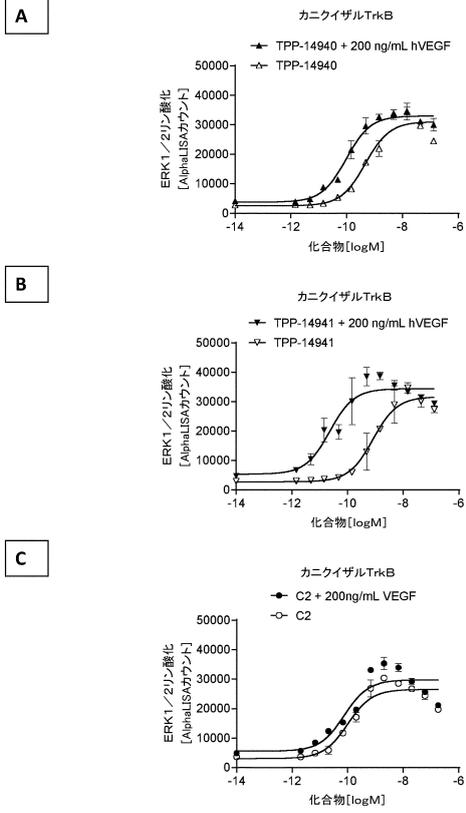


30

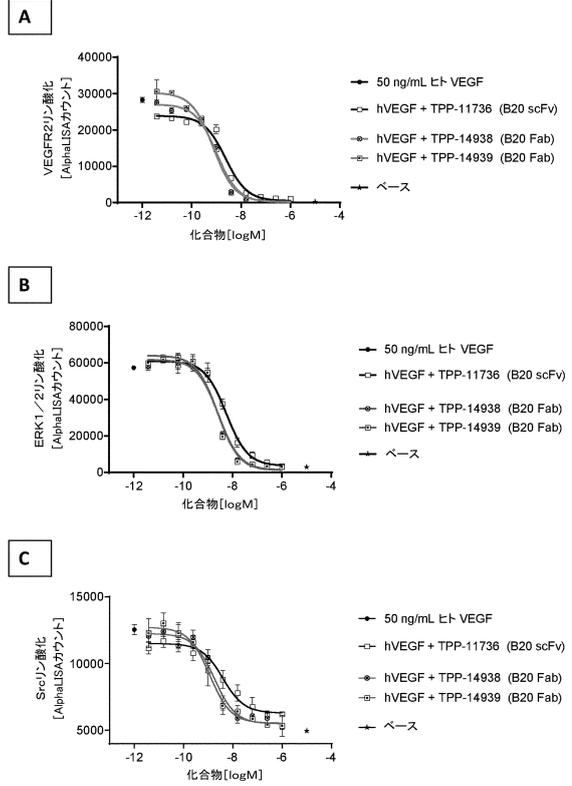
40

50

【 3 1 A - C 】



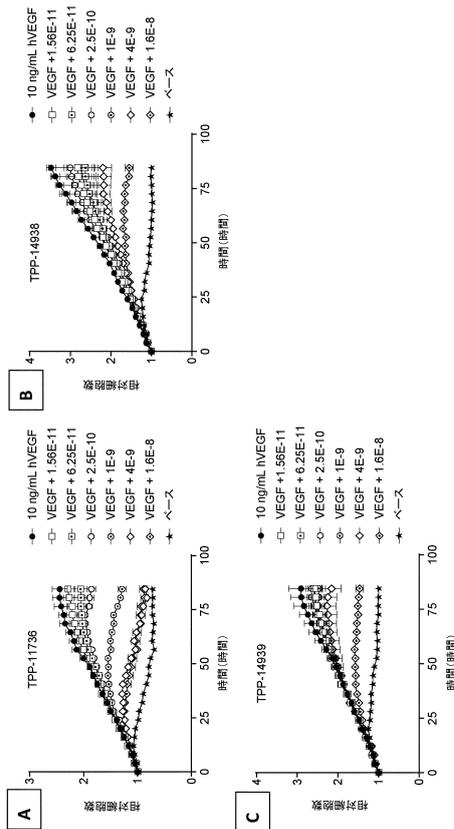
【 3 2 A - C 】



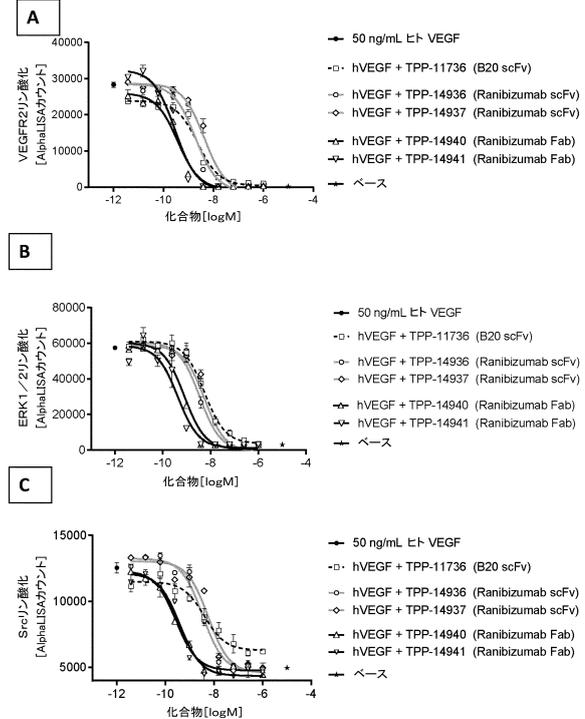
10

20

【 3 3 A - C 】



【 3 4 A - C 】

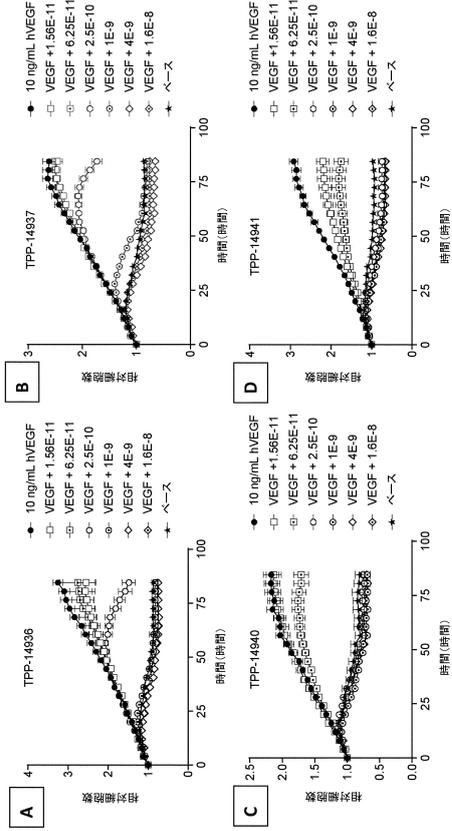


30

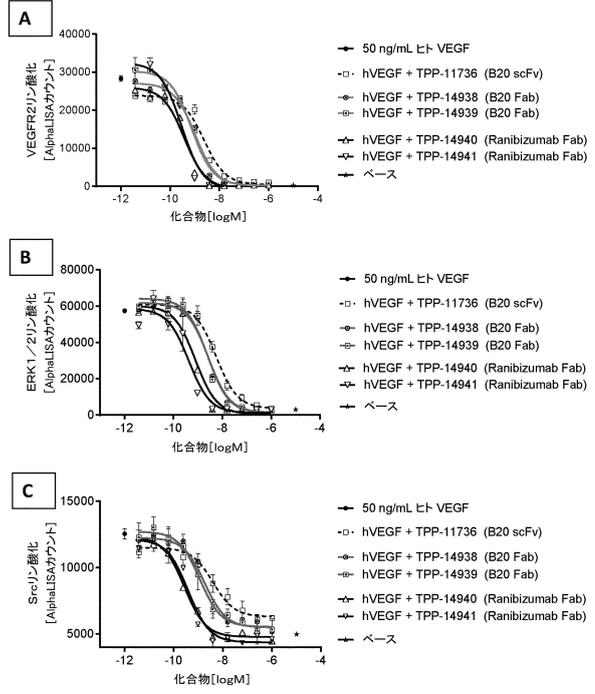
40

50

【 3 5 A - D 】



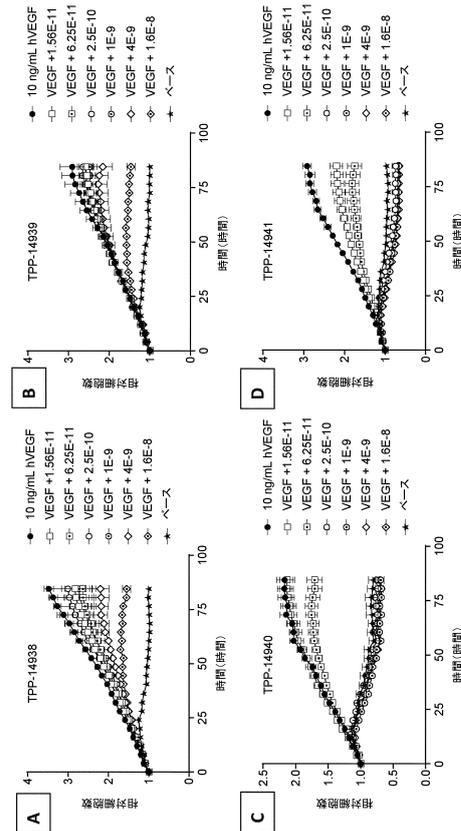
【 3 6 A - C 】



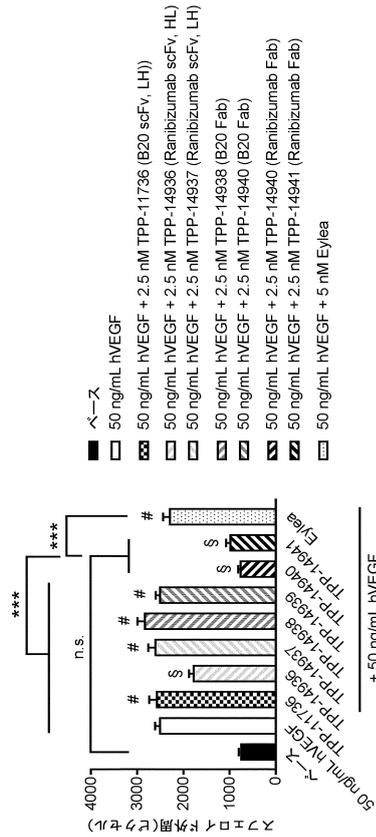
10

20

【 3 7 A - D 】



【 3 8 】

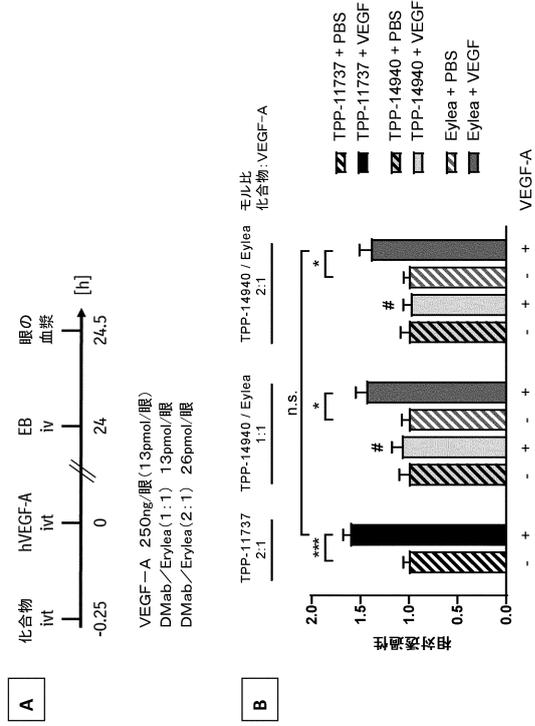


30

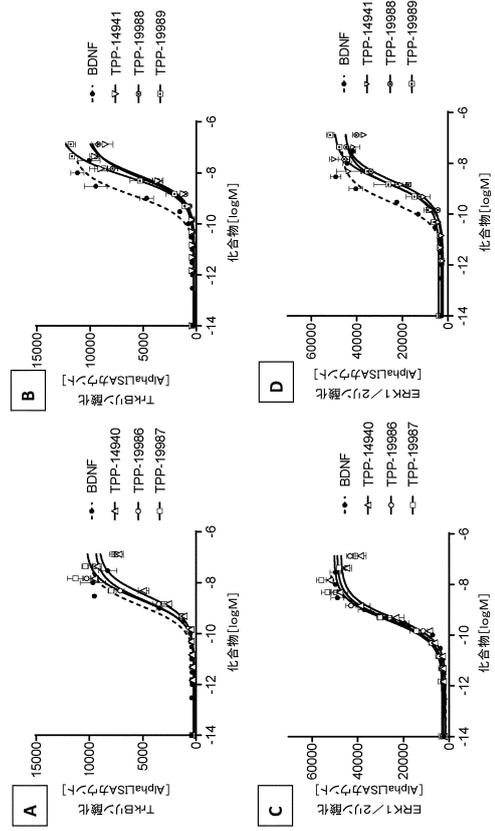
40

50

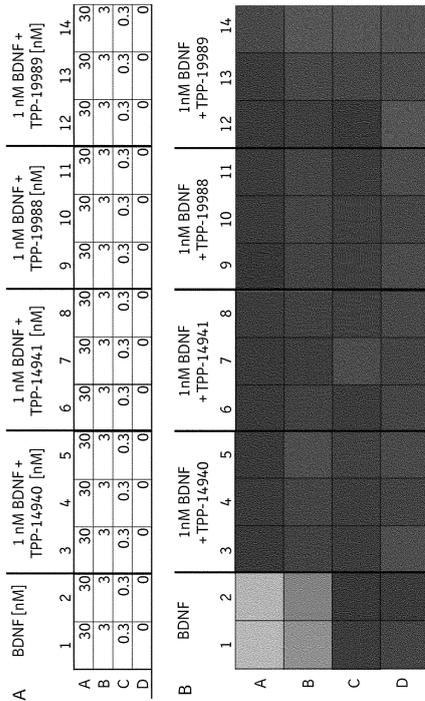
【 39 A - B 】



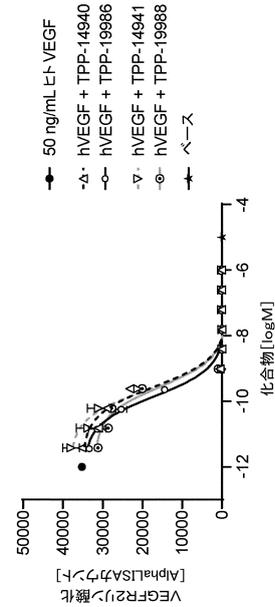
【 40 A - D 】



【 41 A - B 】



【 42 】



10

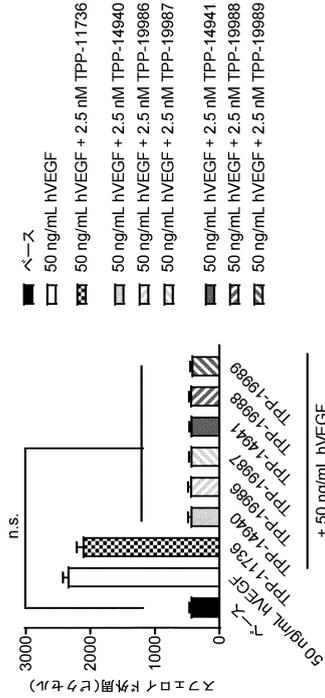
20

30

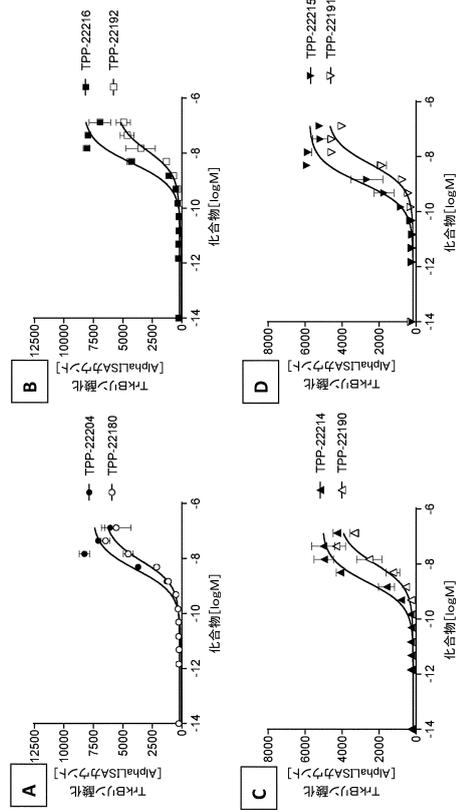
40

50

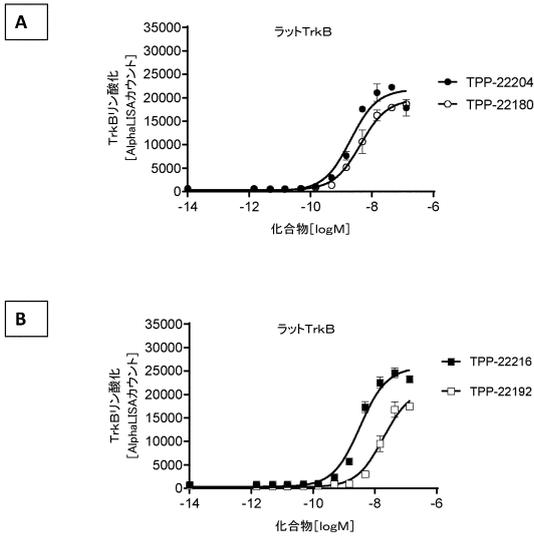
【 4 3 】



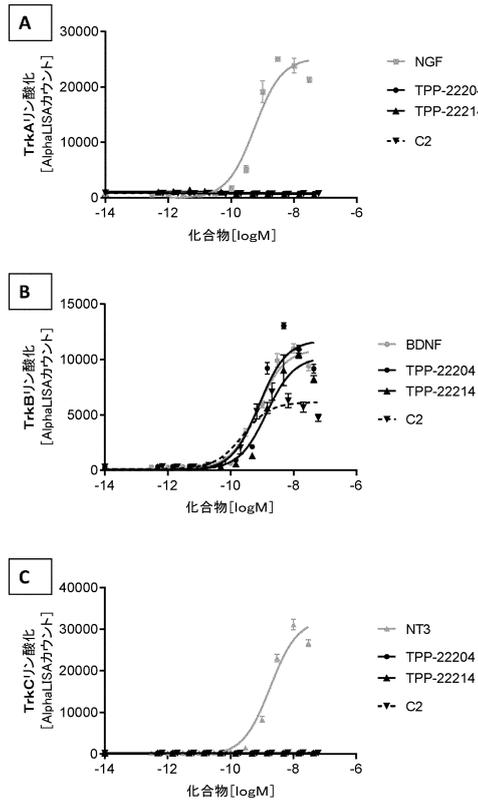
【 4 4 A - D 】



【 4 5 A - B 】



【 4 6 A - C 】



10

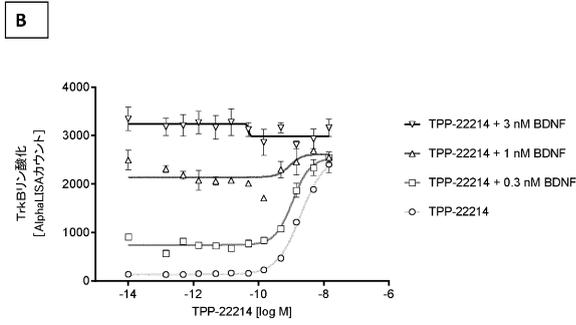
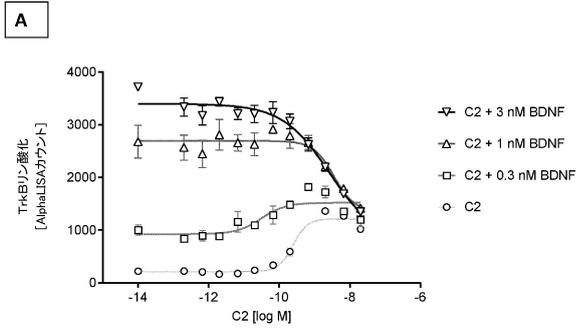
20

30

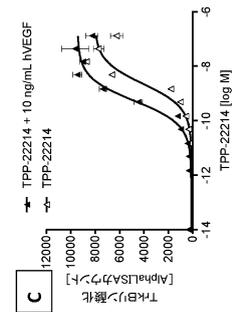
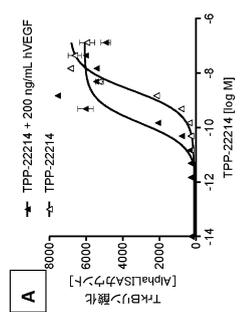
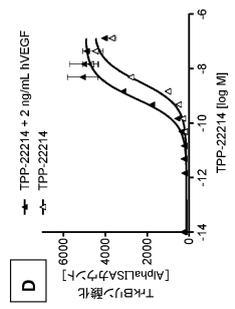
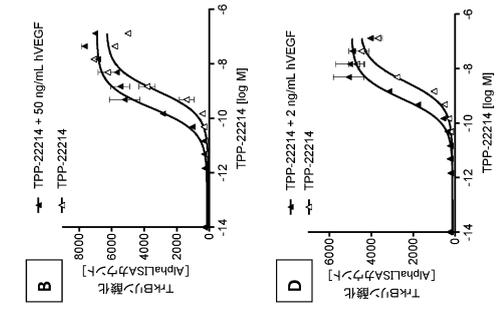
40

50

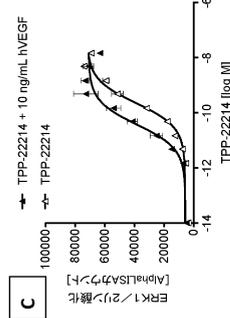
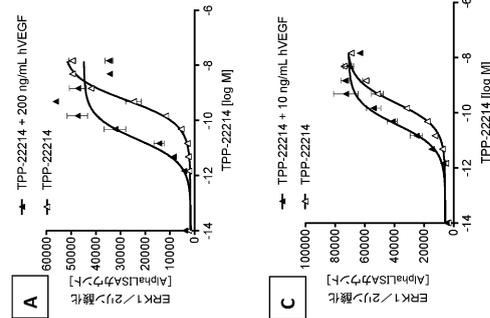
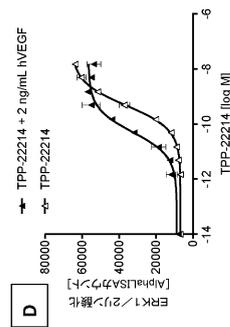
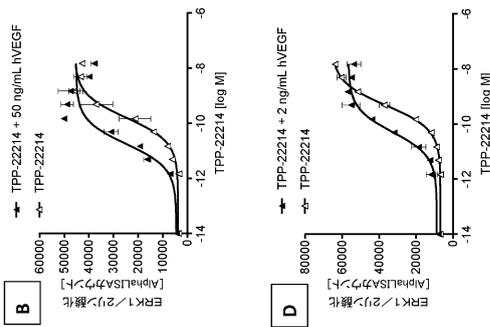
【図 47 A - B】



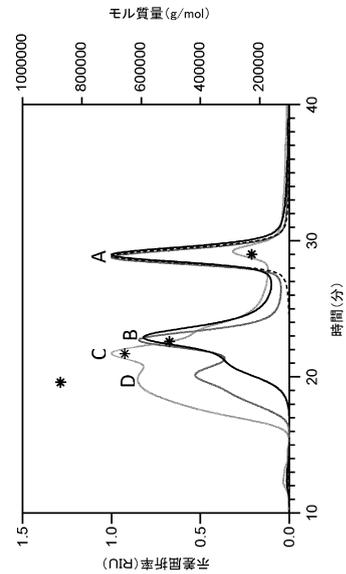
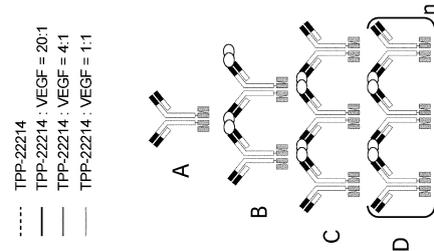
【図 48 A - D】



【図 49 A - D】



【図 50】



10

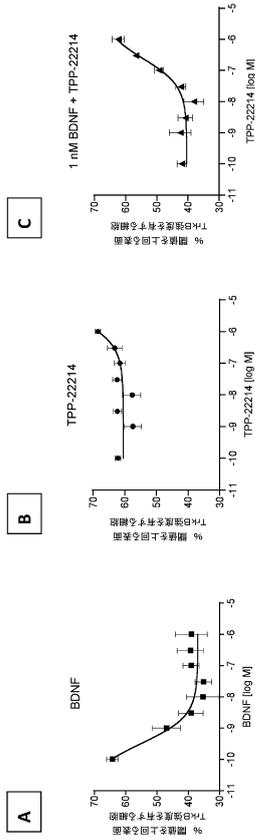
20

30

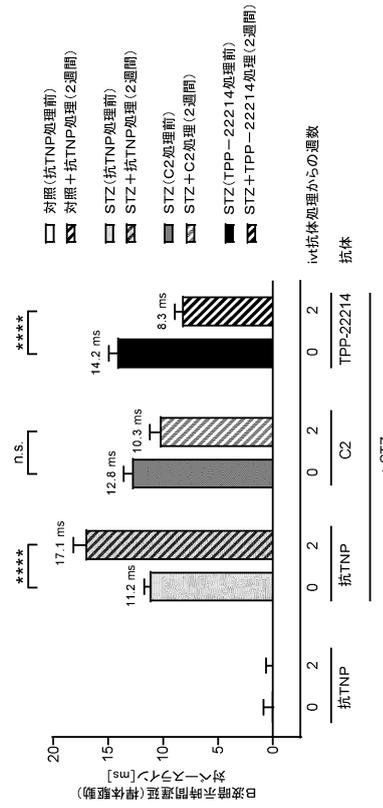
40

50

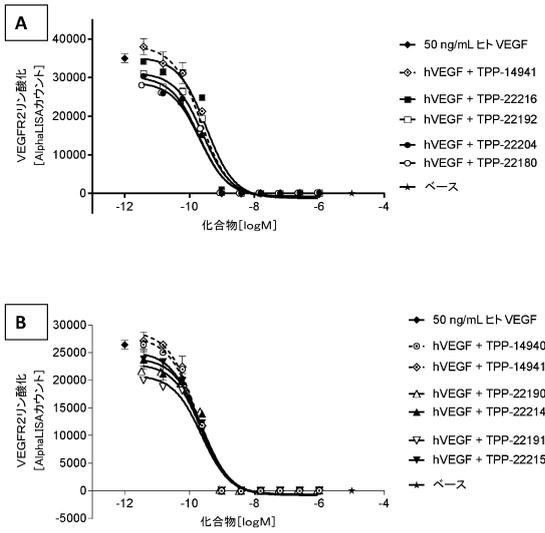
【図 5 1 A - C】



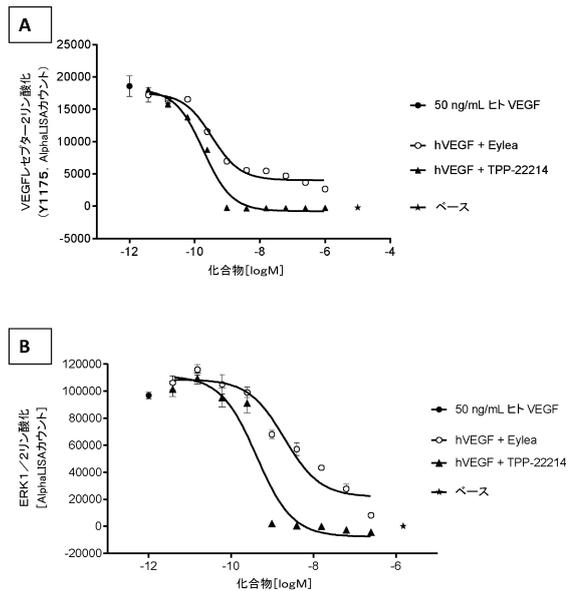
【図 5 2】



【図 5 3 A - B】



【図 5 4 A - B】



10

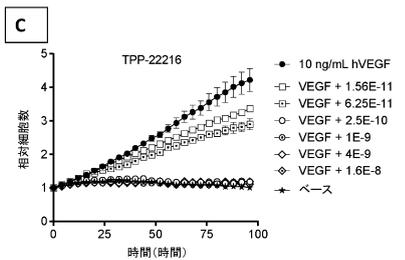
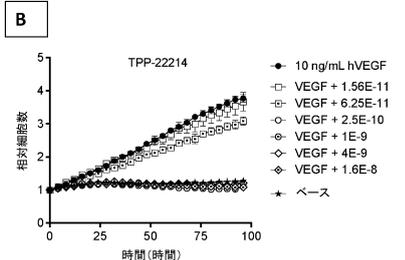
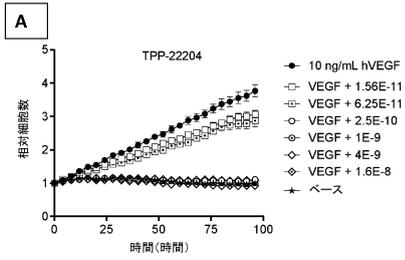
20

30

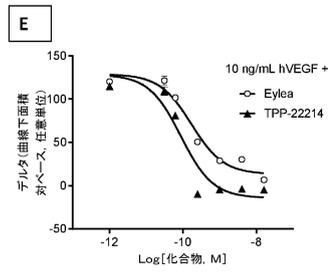
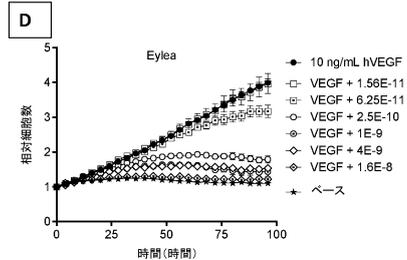
40

50

【 5 5 A - C 】



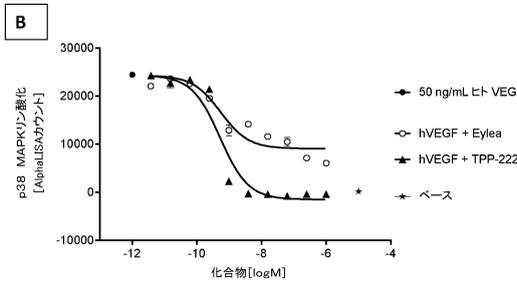
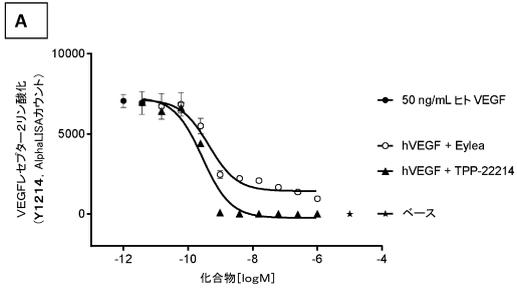
【 5 5 D - E 】



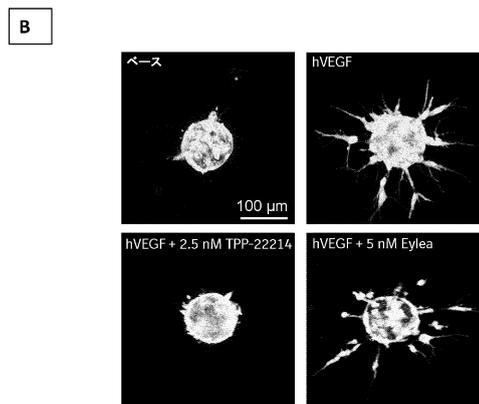
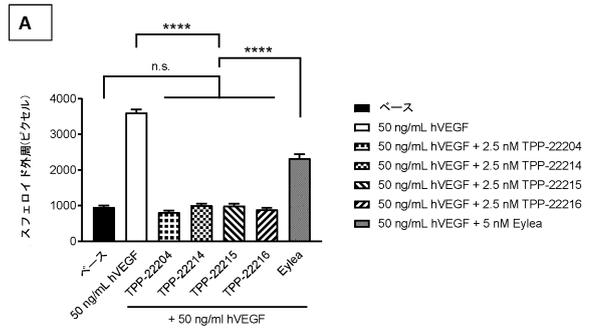
10

20

【 5 6 A - B 】



【 5 7 A - B 】

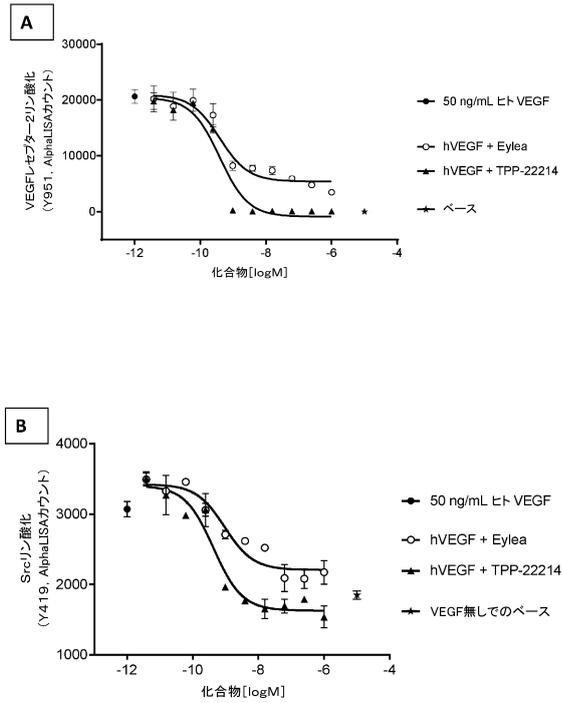


30

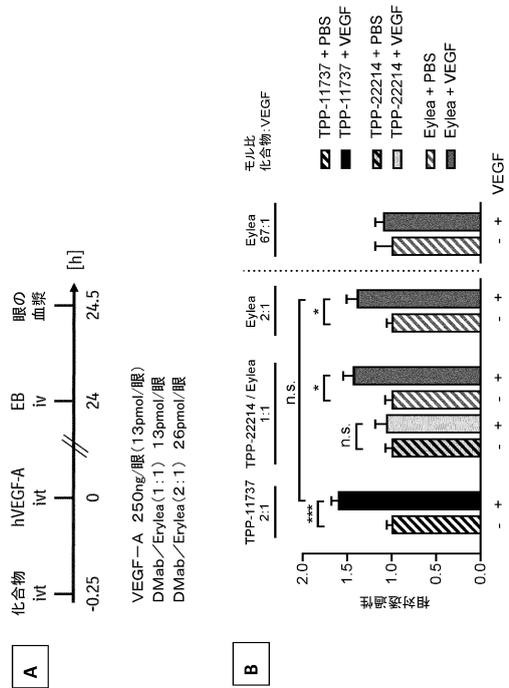
40

50

【 58 A - B 】



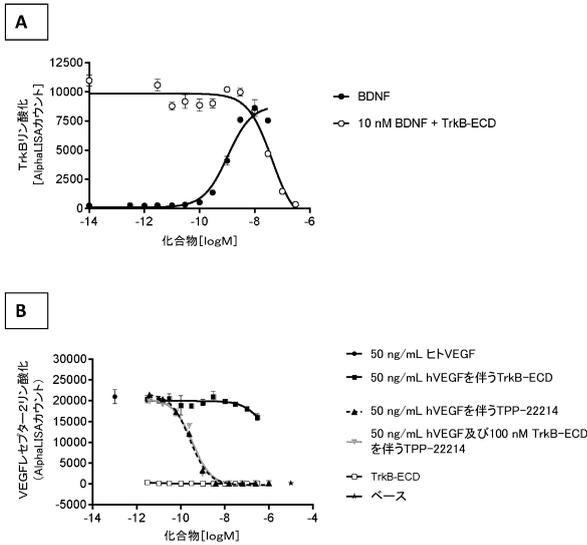
【 59 A - B 】



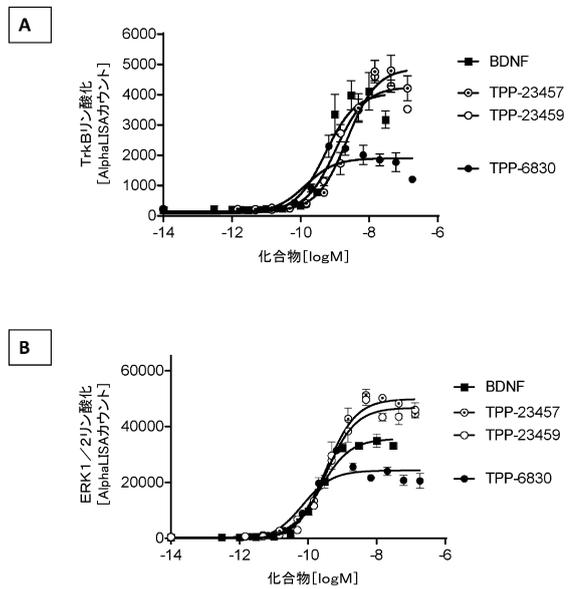
10

20

【 60 A - B 】



【 61 A - B 】

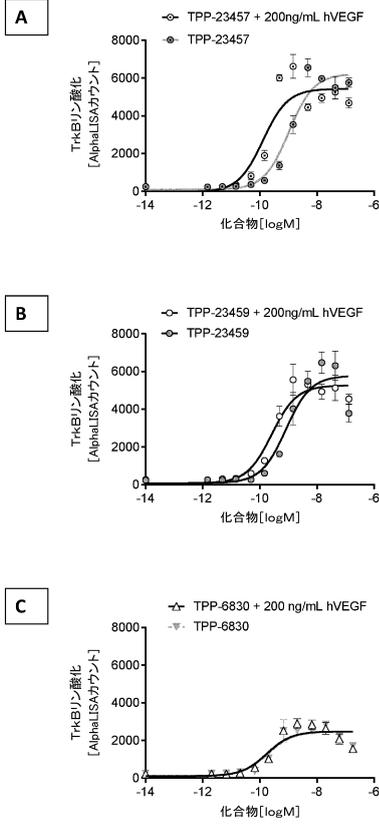


30

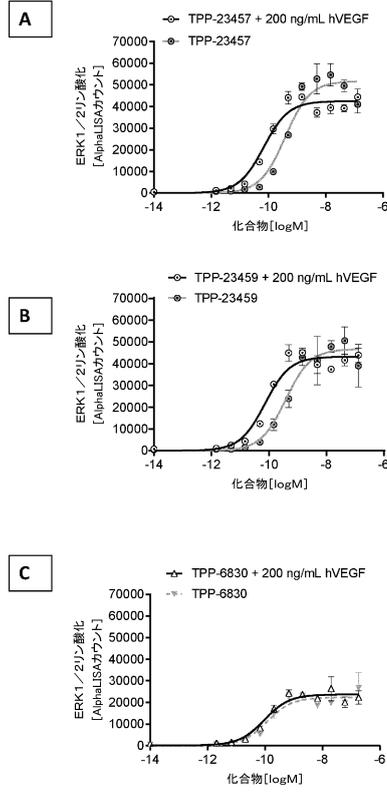
40

50

【図 6 2 A - C】



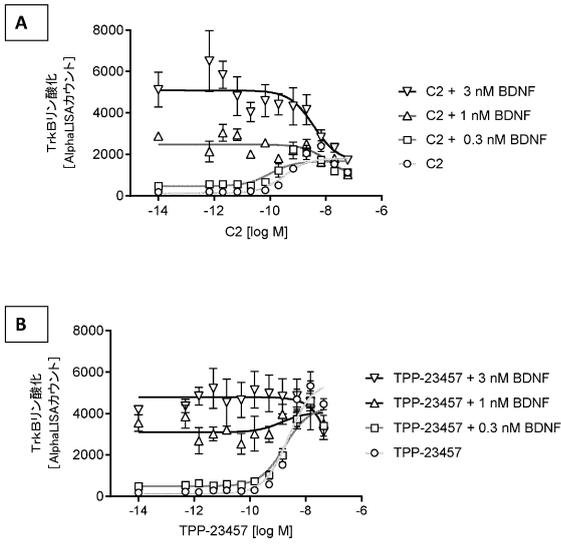
【図 6 3 A - C】



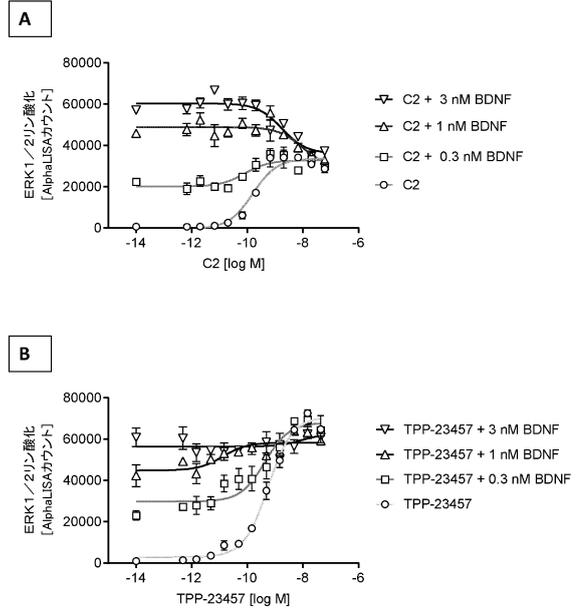
10

20

【図 6 4 A - B】



【図 6 5 A - B】



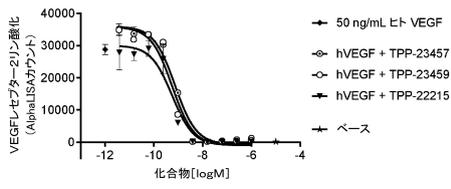
30

40

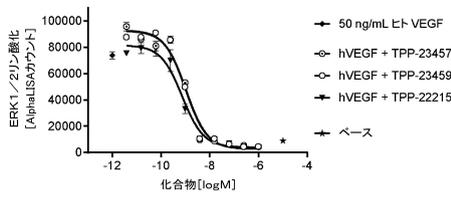
50

【 6 6 A - B】

A



B



10

【配列表】

[0007633397000001.app](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

| | | | | |
|---------|-----------------|---------|-------|-------|
| A 6 1 P | 25/18 (2006.01) | A 6 1 P | 25/18 | |
| A 6 1 P | 25/24 (2006.01) | A 6 1 P | 25/24 | |
| A 6 1 P | 25/28 (2006.01) | A 6 1 P | 25/28 | |
| A 6 1 P | 27/02 (2006.01) | A 6 1 P | 27/02 | |
| A 6 1 P | 27/06 (2006.01) | A 6 1 P | 27/06 | |
| C 0 7 K | 16/22 (2006.01) | C 0 7 K | 16/22 | |
| C 0 7 K | 16/28 (2006.01) | C 0 7 K | 16/28 | |
| C 0 7 K | 16/40 (2006.01) | C 0 7 K | 16/40 | |
| C 1 2 N | 1/15 (2006.01) | C 1 2 N | 1/15 | |
| C 1 2 N | 1/19 (2006.01) | C 1 2 N | 1/19 | |
| C 1 2 N | 1/21 (2006.01) | C 1 2 N | 1/21 | |
| C 1 2 N | 5/10 (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 | |
| C 1 2 N | 7/01 (2006.01) | C 1 2 N | 7/01 | |
| C 1 2 N | 15/13 (2006.01) | C 1 2 N | 15/13 | Z N A |
| C 1 2 N | 15/63 (2006.01) | C 1 2 N | 15/63 | Z |
| C 1 2 N | 15/86 (2006.01) | C 1 2 N | 15/86 | Z |
| C 1 2 P | 21/08 (2006.01) | C 1 2 P | 21/08 | |

(72)発明者 バッケル, レムコ・アレクサンダー

ドイツ国、5 5 2 1 6 インゲルハイム・アム・ライン、ピンガー・シュトラッセ 1 7 3、ベーリンガー・インゲルハイム・インターナショナル・ゲーエムベーハー、コーポレート・パテント

(72)発明者 フックス, オルガー

ドイツ国、5 5 2 1 6 インゲルハイム・アム・ライン、ピンガー・シュトラッセ 1 7 3、ベーリンガー・インゲルハイム・インターナショナル・ゲーエムベーハー、コーポレート・パテント

(72)発明者 ハン, フェイ

アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 9 0 0、ピー・オー・ボックス 3 6 8、ベーリンガー・インゲルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション

(72)発明者 クマール, サンディープ

アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 9 0 0、ピー・オー・ボックス 3 6 8、ベーリンガー・インゲルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション

(72)発明者 ロウ, サラ

アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 9 0 0、ピー・オー・ボックス 3 6 8、ベーリンガー・インゲルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション

(72)発明者 シェアー, ジャスティン・エム

アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8、リッジフィールド、リッジベリー・ロード 9 0 0、ピー・オー・ボックス 3 6 8、ベーリンガー・インゲルハイム・ユーエスエイ・コーポレーション

(72)発明者 トーマス, レオ

ドイツ国、5 5 2 1 6 インゲルハイム・アム・ライン、ピンガー・シュトラッセ 1 7 3、ベーリンガー・インゲルハイム・インターナショナル・ゲーエムベーハー、コーポレート・パテント

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献

- 特表2 0 2 0 - 5 2 2 2 7 0 (J P , A)
 特表2 0 2 0 - 5 1 3 8 0 6 (J P , A)
 特表2 0 2 0 - 5 1 4 3 7 6 (J P , A)
 特表2 0 1 8 - 5 3 1 0 0 5 (J P , A)
 特表2 0 1 9 - 5 3 1 7 6 2 (J P , A)
 特開2 0 1 4 - 1 9 3 8 6 4 (J P , A)
 国際公開第2 0 2 0 / 1 8 7 2 0 2 (W O , A 1)

国際公開第2010/086828(WO, A2)

国際公開第2012/061558(WO, A2)

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018年, Vol.504, p.19-24

MABS, 2017年, Vol.9, No.2, p.182-212

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 16/00 - 46

C12N 15/00 - 90

C12N 5/10

C12N 1/00 - 38

C12P 21/00 - 08

A61K 39/395

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq