

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-502501
(P2023-502501A)

(43)公表日 令和5年1月24日(2023.1.24)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	4 C 0 7 6
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A 4 C 0 8 4
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全45頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-529850(P2022-529850)	(71)出願人	508228061
(86)(22)出願日	令和2年11月20日(2020.11.20)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
(85)翻訳文提出日	令和4年7月14日(2022.7.14)		ィ オブ カリフォルニア
(86)国際出願番号	PCT/US2020/061519		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
(87)国際公開番号	WO2021/108255		4 6 0 7 - 5 2 0 0 , オークランド, フ
(87)国際公開日	令和3年6月3日(2021.6.3)		ランクリン ストリート 1 1 1 1 , 5階
(31)優先権主張番号	62/939,756	(74)代理人	100079108
(32)優先日	令和1年11月25日(2019.11.25)		弁理士 稲葉 良幸
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100109346
			弁理士 大貫 敏史
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100117189
			弁理士 江口 昭彦
		(74)代理人	100134120
			弁理士 内藤 和彦
		(72)発明者	フェラーラ, ナボレオン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 眼内血管新生のための長時間作用型 V E G F 阻害剤

(57)【要約】

必要としている対象において V E G F に関連する眼の障害を治療するための組成物および方法であって、 F c - I g G に作動可能に連結された V E G F 結合部分を含む治療有効量の抗 V E G F 剤を対象に硝子体内投与することを含み、 V E G F 結合部分が、 V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 2 である少なくとも 1 つの V E G F 結合ドメインを含む。

【選択図】 図 5 D

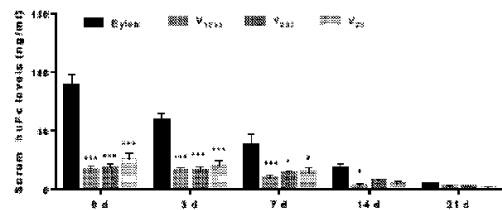


FIGURE 5D

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

必要としている対象において V E G F に関連する眼の障害を治療する方法であって、第 1 の治療有効量の抗 V E G F 剤を前記対象に硝子体内投与することと、前記先の投与から 1 0 ~ 3 0 週間以内に第 2 の治療有効量の前記抗 V E G F 剤を前記対象に硝子体内投与することと、を含み、前記抗 V E G F 剤が、F c - I g G に作動可能に連結された V E G F 結合部分を含み、前記 V E G F 結合部分が、V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 2 である少なくとも 1 つの V E G F 結合ドメインを含む、方法。

【請求項 2】

前記第 2 の治療有効量の前記抗 V E G F 剤が、前記先の投与から 1 6 ~ 2 4 週間以内に硝子体内投与される、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記治療有効量の前記抗 V E G F 剤の後続投与が、前記先の投与から 1 0 ~ 3 0 週間以内に、少なくとも 1 年間、硝子体内投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗 V E G F 剤が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合能力を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗 V E G F 剤が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合 V E G F 刺激内皮細胞増殖阻害能力を有する、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記抗 V E G F 剤が、アフリベルセプトよりも優れた V E G F 刺激有糸分裂誘発阻害能力を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 V E G F 結合部分が、本質的に V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 1、2、および 3 (V₁₋₂₋₃) からなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 V E G F 結合部分が、本質的に V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 2 および 3 (V₂₋₃) からなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 V E G F 結合部分が、本質的に V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 1、2、3 および 3 (V₁₋₂₋₃₋₃) からなる、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 10】

前記 V E G F 結合部分が、本質的に V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 2、3 および 3 (V₂₋₃₋₃) からなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記治療有効量の前記抗 V E G F 剤が、約 1 ~ 1 0 m g である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記治療有効量の前記抗 V E G F 剤が、約 3 ~ 6 m g である、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 13】

前記 V E G F に関連する眼の障害が、新生血管加齢性黄斑変性症、近視に続発する脈絡膜新生血管、増殖性糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、網膜静脈閉塞症などの網膜血管閉塞、眼の腫瘍、フォンヒッペル・リンドウ症候群、未熟児網膜症、およびポリープ状脈絡膜血管症を含む群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

必要としている対象において眼内新生血管を促進する方法であって、第 1 の治療有効量の抗 V E G F 剤を前記対象に硝子体内投与することと、先の投与から 1 0 ~ 3 0 週間以内に第 2 の治療有効量の前記抗 V E G F 剤を前記対象に硝子体内投与することと、を含み、前記抗 V E G F 剤が、F c - I g G に作動可能に連結された V E G F 結合部分を含み、前 50

記 V E G F 結合部分が、V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 2 である少なくとも 1 つの V E G F 結合ドメインを含む、方法。

【請求項 15】

必要としている対象において V E G F に関連する眼の障害を治療する際に使用するための薬学的組成物であって、前記抗 V E G F 剤が、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に定義される通りである、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2019年11月25日に提出された米国仮出願第62/939,756号の優先権の利益を主張し、この出願は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。2020年11月19日に作成された上記の A S C I I コピーの名称は 24978-0595_S L . t x t であり、サイズは 54,480 バイトである。

【0003】

本発明は、眼内血管新生のための新規の長時間作用型 V E G F 阻害剤に関する。

【背景技術】

【0004】

血管は、組織および臓器に栄養素を運び、異化産物を除去するため、新生血管供給または血管新生の発達は、重要な恒常性維持の役割を果たす¹。しかしながら、血管の制御不能な成長は、腫瘍および眼内血管障害を含む多数の疾患プロセスを促進するか、または容易にする可能性がある¹。多数の血管新生因子が最初に同定され、特徴付ける²が、多くの実験室で行われた作業は、V E G F を正常および病理学的血管新生、ならびに血管透過性³⁻⁴の主要な調節因子として確立している。代替的なエクソンスプライシングは、V E G F₁₂₁、V E G F₁₆₅およびV E G F₁₈₉を含む、ヘパリンに対する親和性が異なる複数のアイソフォームの生成をもたらす。V E G F₁₂₁は、有意なヘパリン結合を欠いている。V E G F₁₆₅は、単一のエクソン7コードされたヘパリン結合ドメインを有するが、V E G F₁₈₉は、エクソン6およびエクソン7⁵⁻⁶によってコードされる2つのヘパリン結合ドメインを有する。多くの実験的証拠は、血管新生に必要な生化学的勾配の確立におけるヘパリン結合V E G F アイソフォームの重要な役割を記録している⁷⁻⁹。V E G F は、P1GF、V E G F - B、V E G F - C、およびV E G F - Dも含む遺伝子ファミリーのメンバーである。3つの関連する受容体チロシンキナーゼ(RTK)がV E G F リガンド：V E G F R 1¹⁰、V E G F R 2¹¹およびV E G F R 3¹²に結合することが報告されている。V E G F は、V E G F R 1 およびV E G F R 2 の両方に結合し、P1GFおよびV E G F - B は、V E G F R 1 と選択的に相互作用する。V E G F R 3 は、リンパ脈管新生¹³⁻¹⁴に参与しているV E G F - C およびV E G F - D に結合する。このRTKクラスの各メンバーは、細胞外部分¹⁵つの免疫グロブリン(Ig)様ドメインを有する。V E G F R - 2 がV E G F¹⁴の主要なシグナル伝達受容体であるが、V E G F R 1 はV E G F R 2¹⁵よりも実質的に高い新和性でV E G F と結合すると考えられている。

【0005】

V E G F 阻害剤は、複数の腫瘍の標準的な治療法となり、重度の視力低下および法的盲の主な原因である、新生血管型の加齢性黄斑変性症(AMD)、増殖性糖尿病性網膜症、および網膜静脈閉塞症などの眼内新生血管障害の治療に転換をもたらした¹⁶⁻³⁻¹⁷。現在、ベバシズマブ、ラニズマブ、およびアフリベルセプト³の3つの抗V E G F 薬が、眼科的適応症に米国で広く使用されている。ベバシズマブは、V E G F¹⁸を標的とす

10

20

30

40

50

る全長 I g G 抗体である。ベバシズマブは眼科的適応症用に開発されていないが、その低コストにより適応外で広く使用されている。ラニズマブは、親和性成熟抗 V E G F F a b である¹⁹。アフリベルセプトは、I g G - F c 融合タンパク質²⁰であり、V E G F、P I G F、および V E G F - B²¹に結合する V E G F R 1 および V E G F R 2 からの要素を有する。重要なことに、ラニズマブまたはベバシズマブで 5 年間治療した後、新生血管 A M D 患者の約半数は良好な視力、すなわち視力 20 / 40 以上を示し、抗 V E G F 剤が利用可能になる前にはできなかったであろう転帰である²²。しかしながら、実際の臨床設定では、多くの患者は臨床試験よりも少ない抗 V E G F 注射を受けており、これが満足のいく視覚的転帰と相関しないとの仮説が立てられている²³。したがって、眼内に注射した場合に持続時間がより長い薬剤を開発し、結果として注射の頻度を減らす必要があり、この目的のために多くのアプローチが試みられてきた^{24 25}。アフリベルセプト (E Y L E A) は、2 m g の用量を 8 週間ごとに投与することにより、毎月のラニズマブ (0 . 5 m g) の有効性に匹敵する可能性があることを示す臨床試験に基づいて承認された。しかしながら、アフリベルセプトに切り替えることによって硝子体内注射の回数が減ると予測されているにもかかわらず、最近の研究ではそうではないことが示唆されている²⁶。したがって、半減期が改善された硝子体内抗 V E G F 剤に対する未だ満たされていない医学的必要性が依然として残っている。

【 0 0 0 6 】

1996 年、V E G F R 1 中の V E G F 結合エレメントを同定することを目的とした構造機能研究の過程で、I g 様ドメイン (D) 2 の欠失は、他の D の欠失ではなく、V E G F または P I G F 結合を停止することを見出した²⁷。V E G F R 3 の D 2 を V E G F R 1 D 2 で置き換えることにより、V E G F R 3 に V E G F R 1 のリガンド特異性が付与された¹²⁷。その後の研究は、X 線結晶学によって D 2 と V E G F (または P I G F) との間の相互作用を実証した^{28 - 30}。しかしながら、D 3 は最適な V E G F 結合にとって重要であった^{27 28}。最初の研究は、F c - I g G に融合した V E G F R 1 の最初の 3 つの I g 様 D (F l t - 1 - 3 - I g G) を含む、構築物の設計につながった²⁷。F l t - 1 - 3 - I g G は、生理学および病理学的血管新生のインビトロおよびいくつかのインビボモデルで V E G F を中和する強力な能力を示した^{31 - 34 35 36}。しかしながら、D 3 には塩基性残基のクラスターが存在するため、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (H S P G) に結合し、各組織に隔離されるため、全身投与後のこの分子の半減期は、比較的短いものであった。

【 0 0 0 7 】

2002 年、H o l a s h ら²¹は、V E G F R 1 D 2 (結合要素) および V E G F R 2 D 3 から構成される I g G 融合構築物を説明したが、これは V E G F R 1 D 3 よりもはるかに低いヘパリン親和性を有する。この分子は、今日ではアフリベルセプト、ジブアフリベルセプトまたは E Y L E A として知られており、F l t - (1 - 3 - I g G) よりも有意に全身半減期が長いことが報告されている²¹。これらの P K 特性は、V E G F に対する高い結合親和性と、P I G F と V E G F - B とを結合する能力と組み合わせると、アフリベルセプトが他の V E G F 阻害剤よりもより効果的な抗腫瘍剤であると予測されるに至った^{21 37}。しかしながら、アフリベルセプトは結腸直腸がんの二次治療のみで F D A の承認を得ており、一方ベバシズマブおよび抗 V E G F R 2 抗体ラムシルマブは、複数のがんタイプ^{31 7}においていくつかの F D A 承認を受けており、上記の特徴が治療上の利点を提供しなかったことが示唆されている。明らかに、アフリベルセプトは、眼の血管障害の硝子体内治療として、その主要な臨床的影響を有している。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、V E G F の活性を阻害し、同時に強力なヘパリン結合特性を有し、それにより優れた薬物動態を提供する、すなわち、硝子体内投与後の治療薬の半減期がより長い抗 V E G F 剤を投与することを含む、血管新生を阻害するための、および加齢性黄斑変性症、増殖性糖尿病性網膜症、網膜静脈閉塞症、近視に続発する脈絡膜新生血管、未熟児網膜

症、糖尿病性黄斑浮腫、ポリープ状脈絡膜血管症を含むが、これらに限定されない眼の疾患などの V E G F に関連する状態を治療するための組成物および方法を提供する。

【 0 0 0 9 】

実施形態では、本発明は、必要としている対象において V E G F に関連する眼の障害を治療するための組成物および方法を提供し、本方法は、第 1 の治療有効量の抗 V E G F 剤を対象に硝子体内投与することと、先の投与から 1 0 ~ 3 0 週間以内に第 2 の治療有効量の抗 V E G F 剤を対象に硝子体内投与することと、を含む。実施形態では、抗 V E G F 剤は、F c - I g G に作動可能に連結された V E G F 結合部分を含み、この V E G F 結合部分は、V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 2 である少なくとも 1 つの V E G F 結合ドメインを含む。

10

【 0 0 1 0 】

実施形態では、第 2 の治療有効量の抗 V E G F 剤は、先の投与から 1 6 ~ 2 4 週間以内に硝子体内投与される。実施形態では、本方法は、前の投与から 1 0 ~ 3 0 週間以内に少なくとも 1 年間、硝子体内投与される治療有効量の抗 V E G F 剤の後続投与を含む。

【 0 0 1 1 】

実施形態では、治療有効量の抗 V E G F 剤は、約 1 ~ 1 0 m g である。実施形態では、治療有効量の抗 V E G F 剤は、約 3 ~ 6 m g である。実施形態では、第 1、第 2、および後続の治療有効量は同一である。実施形態では、第 1、第 2、および後続の治療有効量は、異なる。

【 0 0 1 2 】

実施形態では、本発明は、抗 V E G F 剤を提供し、この抗 V E G F 剤は、V E G F 結合特性を有するドメインおよびヘパリンプロテオグリカンに結合するドメインを融合させる F c - I g G 構築物である。実施形態では、本発明は、抗 V E G F 剤を提供し、この抗 V E G F 剤は、ヘパリンに結合する能力を有し、V E G F 結合特性を有する 1 つ以上のドメインを含有する F c - I g G 構築物である。実施形態では、本発明は、抗 V E G F 剤を提供し、この抗 V E G F 剤は、V E G F およびヘパリンへの結合について改善された効力を有する融合タンパク質である。実施形態では、本発明は、抗 V E G F 剤を提供し、この抗 V E G F 剤は、内毒素レベルが非常に低い融合タンパク質である。

20

【 0 0 1 3 】

実施形態では、本発明は、抗 V E G F 剤を提供し、この抗 V E G F 剤は、V E G F 受容体の要素を含む I g G キメラタンパク質である。実施形態では、本発明は、I g G キメラタンパク質を提供し、この I g G キメラタンパク質は、V E G F チロシンキナーゼ受容体の細胞外部分に 7 つの免疫グロブリン (I g) 様ドメインのうち 1 つ以上の断片を含む。実施形態では、本発明は、I g G キメラタンパク質を提供し、この I g G キメラタンパク質は、F c - I g G と融合した V E G F R - 1 の 1 つ以上の細胞外ドメイン断片を含む。実施形態では、本発明は、少なくとも 1 つの V E G F 結合ドメイン V E G F R - 1 ドメイン 2 および少なくとも 1 つの追加の V E G F R - 1 ドメイン 1 または 3 を含み、ドメイン 4 を含まない I g G キメラタンパク質を提供する。実施形態では、本発明は、I g G キメラタンパク質を提供し、この I g G キメラタンパク質は、F c - I g G と融合した V E G F R - 2 の 1 つ以上の細胞外ドメイン断片を含む。実施形態では、本発明は、I g G キメラタンパク質を提供し、この I g G キメラタンパク質は、F c - I g G と融合した V E G F R - 1 および V E G F R - 2 の 1 つ以上の細胞外ドメイン断片を含む。

30

40

【 0 0 1 4 】

実施形態では、本発明は、F c - I g G に作動可能に連結された V E G F 結合部分を含む抗 V E G F 剤を提供し、この V E G F 結合部分は、V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 2 である少なくとも 1 つの V E G F 結合ドメインを含み、この抗 V E G F 剤は、アフリベルセプトよりも優れた V E G F 刺激有糸分裂誘発阻害能力を有する。実施形態では、本発明は、抗 V E G F 剤が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合能力を有することを提供する。実施形態では、本発明は、抗 V E G F 剤が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合 V E G F 刺激内皮細胞増殖阻害能力を有することを提供する。実施形態では、本発

50

明は、薬剤が、アフリベルセプトと比較して、インビボで増加した半減期を有することを提供する。

【0015】

実施形態では、本発明は、VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン1、2、および3(V₁₋₂₋₃)からなることを提供する。

【0016】

実施形態では、本発明は、VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン2および3(V₂₋₃)からなることを提供する。

【0017】

実施形態では、本発明は、VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン1、2、3、および3(V₁₋₂₋₃₋₃)からなることを提供する。

10

【0018】

実施形態では、本発明は、VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン2、3、および3(V₂₋₃₋₃)からなることを提供する。

【0019】

実施形態では、本発明は、治療有効量の、特許請求の範囲に定義される抗VEGF剤および薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。実施形態では、本発明は、必要としている対象においてVEGFに関連する障害を治療する方法を提供し、本方法は、治療有効量の、定義される抗VEGF剤を対象に投与することを含む。抗VEGF剤は、眼などの罹患組織または臓器に直接注射することができる。

20

【0020】

実施形態では、本発明は、眼の疾患を治療するための方法を提供し、抗VEGF剤は、VEGFと比較して2:1のモル比に対応する投薬量で眼に局所的に投与される。実施形態では、本発明は、眼の疾患を治療するための方法を提供し、抗VEGF剤は、硝子体内注射によって投与される。

【0021】

実施形態では、本発明は、眼の疾患を治療するための方法を提供し、抗VEGF剤は、10~30週間に1回、硝子体内投与される。実施形態では、抗VEGF剤は、16~24週間に1回、硝子体内投与される。実施形態では、治療は少なくとも1年間継続される。

30

【0022】

一実施形態によれば、本発明は、治療有効量の抗VEGF剤を眼に局所的に投与することを含む、眼の疾患を治療するための方法を提供し、治療は、潜在型(occult)、古典的最小型(minimally classic)、および古典的優性型(predominantly classic)の滲出型黄斑変性症の治療に有効であり、薬剤は融合タンパク質である。

【0023】

実施形態では、本発明は、抗VEGF治療から恩恵を受ける新生血管加齢性黄斑変性症、近視に続発する脈絡膜新生血管、増殖性糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、網膜静脈閉塞症などの網膜血管閉塞、眼の腫瘍、フォンヒッペル・リンドウ症候群、未熟児網膜症、ポリープ状脈絡膜血管症、または非腫瘍性障害を含む多種多様なVEGFに関連する疾患を治療するために使用することができる。

40

【0024】

別の態様によれば、本発明は、眼などへの局所投与のための薬学的に許容される担体制剤中に抗VEGF剤を含む医薬製剤を提供する。

【0025】

実施形態では、本発明は、新規構築物を開示し、この構築物は、VEGFの活性を強く中和すると同時に、強力なヘパリン結合特性を有する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

50

【図1】VEGFR1の免疫グロブリン(Ig)様ドメイン(D)の編成および本研究で設計されたFc融合構築物の編成を示す。赤い標識は、ヘパリン結合ドメインを示す。D2は、リガンド特異性²⁷に關与する、VEGFおよびPLGFに不可欠な結合エレメントである。D3は、結合親和性および安定性^{27 28 30}において重要な役割を果たす。VEGFR1のD3は、VEGFR2のD3ではないが、主要なヘパリン結合部位である。V23およびアフリベルセプト(EYLEA)はD3のみで異なり、これはアフリベルセプトのVEGFR2とは異なる。D4もヘパリン結合部位であり、受容体二量体化およびホモタイプ相互作用³⁰に關与している。各構築物が単純化のためにモノマーとして示されるが、組換えタンパク質が二量体であるのは、Fcによって強制的に二量体化されるためである。

10

【図2A-B】精製された組換えタンパク質の特徴付けを示す。図2Aは、精製された組換え融合タンパク質およびEYLEAの銀染色SDS/PAGE(4~20%のTris)を示す。各タンパク質200ngを還元条件下で電気泳動に供した。染色を、SilverQuest銀染色キット(Invitrogen)によって行った。図2Bは、V23、V233、V1233およびEYLEA(各々の25μg)の分析サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を示す。Y軸はミリ吸光度単位で吸光度の強度(A280)を表し、X軸は分単位で溶出時間を表す。

【図3】阻害剤のIC₅₀値を示す。ウシ脈絡内皮細胞をアプローチに記載されているように維持した。アッセイのために、細胞を低密度でプレートした。阻害剤は、図に示されるように、様々な濃度で細胞に添加された。VEGFを最終濃度10ng/mlで添加する。細胞密度を5日後に評価する。IC₅₀値を、GraphPad Prism5(GraphPad Prismソフトウェア, CA)を使用して計算した。示されるデータは、高度に精製されたタンパク質で得られた2つの独立した実験に基づいており、多数の以前のアッセイと一致する。

20

【図4】ウシの硝子体への結合を示す。

【図5A-D】成人マウスのレーザー誘導脈絡膜新生血管(CNV)に対する対照IgG、EYLEA、またはVEGFR1 Fc融合タンパク質の効果を示す。図5Aは、各タンパク質が、レーザー治療の1日前に、2.5μgの用量でマウスの硝子体内に注射された。EYLEAも25μgで試験された。アスタリスクは、適切なIgG対照群と比較した有意差(スチューデントのt検定)を示す(**p<0.01、*p<0.05)。データは、1群当たり少なくとも5匹のマウスを用いた3つの独立した実験に基づいている。EYLEAの有効性は、同じモデルで発表された文献に沿っていることに留意されたい。図5Bは、傷害前の注射時間がCNV領域に及ぼす影響を示す。2.5μgの用量のEYLEAは、-1日目に注射した場合にのみ有意に減少した。対照的に、同じ用量のV1233は、注射の7日前または14日前に注射された場合でも、CNV面積を有意に減少させた。左のパネルは、代表的なCD31免疫蛍光画像を示す。アスタリスクは、適切なIgG対照群と比較した有意差(スチューデントのt検定)を示す(**p<0.01、*p<0.05)。n=5。2つの独立した実験において、同様の結果を得た。図5Cは、等モル用量(EYLEAおよびV23の4.8μg、V233の6.3μgおよびV1233の7.2μg)で試験したV23、V233およびV1233を示し、EYLEAと比較してより優れた有効性を示す。すべての薬剤を、レーザー治療の14日前に投与した。7日後、目を採取し、データを分析した。アスタリスクは、適切なIgG対照群と比較した有意差(スチューデントのt検定)を示す(**p<0.01、*p<0.05)。図5Dは、硝子体内注射後の異なる時点でのマウスにおけるEYLEA、V23、V233またはV1233の血清レベルを示す。各分子を等モル量で両眼に注射した。EYLEAおよびV23を2.4mg、V233を3.15mg、V1233を3.6mgとした。1日、3日、7日、14日および21日後に、尾静脈から末梢血を採取した。ヒトFcレベルをELISAによって測定した。示される値は、平均±SEMである。*、p<0.05、**、p<0.01、***、p<0.001。n=8/点。

30

40

【図6A-C】OIRモデルにおける新生血管形成を阻害するV1233の硝子体内注射

50

を示す。図6Aは、アフリベルセプト、V1233、および対照(IgG)を使用して、C57BL/6jマウスにおいてP7で硝子体内注射を行ったことを示す。3.25 μgの用量の対照IgGに対して、12.5 μg、2.5 μg、または1.25 μgの用量の0.5 plのアフリベルセプト(E)の体積を僚眼に注射した。同腹仔には、V1233(3.8 μgまたは1.65 pg)および対照を注射した。IgG対照、アフリベルセプト2.5 μgおよびV1233 3.8 μgの濃度は等モルであった(図10の凡例も参照)。次いで、動物をP7からP12まで75%の酸素に曝露し、続いて室内空気に戻した。P17において、動物を灌流固定し、眼を除去し、解剖し、BSL-FITCで染色し、平らに取り付けた。図6Bは、Xiao et al. (ref. 116)によって説明されているように、自動化されたソフトウェアを使用して血管拡張および新生血管形成を分析したことを示している。血管新生領域は黄色、新生血管の房は赤色で示す。図6Cは、新生血管形成の定量化は、V1233(3.8および1.65 pg)または高用量アフリベルセプト(12.5 μg)での対照と比較して、新生血管形成における有意な低減($p < 0.05$ ウェルチ矯正によるt-試験)を示すが、2.5または1.25 μgでのアフリベルセプトでの低減ではない。

10

【図7】VEGF165またはVEGF121によって刺激されたBCEC増殖に対する融合タンパク質の阻害効果を示す。結果は、対照に対するVEGF刺激増殖の抑制の%として表される。細胞数は、相対蛍光単位(RFU)530/590(励起/放出)、3連の平均によって決定した。

【図8】HUVEC増殖に対する組換えVEGF受容体Fc融合タンパク質の阻害効果を示す。3日間、VEGF165(10 ng/ml)とともに、V123、V1233、V233、V23またはEYLEA(10~2000 ng/ml)を添加し、細胞生存率を決定した。結果は、対照に対するVEGF刺激増殖の抑制の%として表される。細胞数は、相対蛍光単位(RFU)530/590(励起/放出)、3連の平均によって決定した。統計解析を、GraphPad Prismソフトウェアにおいて2元配置分散分析によって行った。統計学的有意性 * $p < 0.001$ 、** $p < 0.0001$ は、VEGF単独と比較することによって計算した。

20

【図9】VEGF/VEGFR2複合体(3V2A)の結晶構造を、VEGF/VEGFR1複合体(5T89)の結晶構造に重ね合わせたことを示す。潜在的にVEGFと相互作用することができ、VEGFR1とVEGFR2との間で異なるVEGFR1残基を標識する。黄色および青色のグレースケール：VEGFグリーングレースケール：VEGFR1 D2。白色：VEGFR1 D3。分析は、VEGFR2 D3と比較して、VEGFとVEGFR1 D3との間のより広範な相互作用を指摘する。

30

【図10】ウシ内皮細胞増殖に対するV1233の効果を示す。ウシ脈絡膜微小血管内皮細胞(BCEC、VEC Technologies)を、10%ウシ仔牛血清を補充した低グルコースDMEM中の96ウェルプレートに播種し、10 ng/mlのhVEGF165(R&D system)の存在下で、V1233(バッチ1およびバッチ2)およびEYLEA(Regeneron Pharmaceuticals)の連続希釈液とともにインキュベートした。5または6日後、細胞をAlamar Blueと4時間インキュベートした。蛍光を、530 nmの励起波長および590 nmの発光波長で測定した。

40

【図11】Promega VEGFにおけるVEGF誘導VEGFR2活性化の阻害を示す。Promega VEGFバイオアッセイ(GA2001, Promega)を使用して、KDR/NFAT-RE HEK293細胞においてVEGF165によって誘導される刺激を阻害するV1233の能力を測定し、20 ng/mlのhVEGF165の存在下でV1233(バッチ1およびバッチ2)、EYLEAおよびヒトIgG1(BE0297, BioXcell)の連続希釈液とともにインキュベートした。6時間のインキュベーション後、Bio-Glo80試薬を添加し、SpectraMax M5マイクロプレートリーダーを使用して発光を定量化した。GraphPad Prismソフトウェアを使用して、データを4PLx(登録商標)曲線に適合させた。

50

【図12】VEGFR1がCHO細胞培養培地中で濃度を構築することに対するヘパリンの効果を示す。プール細胞(V123、V1233、V233、およびV23)を、100 μg/mlのヘパリン(#H3149, Sigma)の有無にかかわらずCD Forti CHO培地に分割し、加湿雰囲気および125 rpmで37 °Cで、5% CO2とともに96時間インキュベートする。培地を収集し、VEGFR1 ECDの発現をELISAにより評価した。

【図13】CHO発現V1233がマウスCNVモデルにおいて完全に活性であることを示す。6~8週目の雄のC57/BL6マウスを使用した(n=6)。レーザー誘導後、約5 μgのCHO細胞由来および293細胞由来のV1233を各眼に硝子体内(1 μl)で注射した。10日後、脈絡膜-強膜複合体を採取し、固定した。新生血管領域をCD31免疫蛍光全マウント染色によって示した。図は各群における3つの代表的な新生血管領域を示している。

【図14】構築物V1-2-3のヒトIgG1-Fc断片およびVEGFR-1ドメイン全体のアミノ酸配列および核酸配列を示す。それぞれ、配列番号1および配列番号2を有する。VEGFR-1のIgG様ドメインについてのアミノ酸配列および核酸配列は、記載の通り、図内に提供する。V1のアミノ酸配列は、配列番号15であり、構築物V2のアミノ酸配列は、配列番号16であり、構築物V3のアミノ酸配列は、配列番号17である。

【図15】構築物V2-3のヒトIgG1-Fc断片およびVEGFR-1ドメイン全体のアミノ酸配列および核酸配列を示す。それぞれ、配列番号3および配列番号4を有する。VEGFR-1のIgG様ドメインについてのアミノ酸配列および核酸配列は、記載の通り、図内に提供する。V2のアミノ酸配列は、配列番号16であり、V3のアミノ酸配列は、配列番号17である。

【図16】構築物V1-2-3-3のヒトIgG1-Fc断片およびVEGFR-1ドメイン全体のアミノ酸配列および核酸配列を示す。それぞれ、配列番号5および配列番号6である。VEGFR-1のIgG様ドメインについてのアミノ酸配列および核酸配列は、記載の通り、図内に提供する。V1のアミノ酸配列は、配列番号15であり、V2のアミノ酸配列は、配列番号16であり、V3のアミノ酸配列は、配列番号17である。

【図17】構築物V2-3-3のヒトIgG1-Fc断片およびVEGFR-1ドメイン全体のアミノ酸配列および核酸配列を示す。それぞれ、配列番号7および配列番号8を有する。VEGFR-1のIgG様ドメインについてのアミノ酸配列および核酸配列は、記載の通り、図内に提供する。V2のアミノ酸配列は、配列番号16であり、V3のアミノ酸配列は、配列番号17である。

【図18】構築物V1-2-3-3-4のヒトIgG1-Fc断片およびVEGFR-1ドメイン全体のアミノ酸配列および核酸配列を示す。それぞれ、配列番号9および配列番号10を有する。VEGFR-1のIgG様ドメインについてのアミノ酸配列および核酸配列は、記載の通り、図内に提供する。V1のアミノ酸配列は、配列番号15であり、V2のアミノ酸配列は、配列番号16であり、V3のアミノ酸配列は、配列番号17であり、V4のアミノ酸配列は、配列番号18である。

【図19】構築物V2-3-4のヒトIgG1-Fc断片およびVEGFR-1ドメイン全体のアミノ酸配列および核酸配列を示す。それぞれ、配列番号11および配列番号12を有する。構築物V2のアミノ酸配列は、配列番号16であり、V3のアミノ酸配列は、配列番号17であり、V4のアミノ酸配列は、配列番号18である。

【図20】構築物V2-4のヒトIgG1-Fc断片およびVEGFR-1ドメイン全体のアミノ酸配列および核酸配列を示す。それぞれ、配列番号13および配列番号14を有する。V2のアミノ酸配列は、配列番号16であり、V4のアミノ酸配列は、配列番号18である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本出願で言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、各個々の刊行物、特許

10

20

30

40

50

、または特許出願が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

【0028】

特に定義しない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語、ならびに任意の頭字語は、本発明の分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の任意の方法および材料が本発明の実施に使用され得るが、例示的な方法、装置、および材料が本明細書に記載される。

【0029】

本発明の実施は、特に明記しない限り、分子生物学（組換え技法を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来技法を使用し、これらは当業者の技量の範囲内である。そのような技法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Sambrook et al., 1989)、Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984)、Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987)、Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates)、PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994)、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003)、および Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22th ed., (Pharmaceutical Press and Philadelphia College of Pharmacy at University of the Sciences 2012)などの文献で完全に説明されている。

【0030】

本明細書で使用される場合、「備える (comprise)」、「備える (comprising)」、「含む (include)」、「含む (including)」、「有する (has)」、「有する (having)」、「含有する (contain)」、「含有する (containing)」、「特徴とする (characterized by)」、またはそれらの任意の他の変形は、別途明示的に示される任意の制限を条件とする、列挙される構成成分の非排他的な包括を包含することを意図する。例えば、要素（例えば、構成成分、特徴、またはステップ）のリストを「含む」、融合タンパク質、薬学的組成物、および/または方法は、必ずしもそれらの要素（または構成成分もしくはステップ）のみに限定されないが、明示的に列記されていない、または融合タンパク質、薬学的組成物および/もしくは方法に固有ではない他の要素（または構成成分もしくはステップ）を含み得る。

【0031】

本明細書で使用する場合、「～からなる (consists of)」および「～からなる (consisting of)」という移行句は、指定されていない任意の要素、ステップ、または構成成分を除外する。例えば、特許請求の範囲で使用される「～からなる (consists of)」または「～からなる (consisting of)」は、通常関連する不純物（つまり、所定の構成成分内の不純物）を除いて、特許請求の範囲に具体的に列挙される構成成分、材料、またはステップに特許請求の範囲を限定する。「～からなる (consists of)」または「～からなる (consisting of)」という語句が、プリアンブルの直後ではなく、特許請求の範囲の本文の節に出現する場合、「～からなる (consists of)」または「～からなる (consisting of)」という句は、その節に記載される要素（または構成成分もしくはステップ）のみを限定し、他の要素（または構成成分）は、全体として特許請求の範囲から

除外されない。

【0032】

本明細書で使用される場合、「本質的に～からなる (consists essentially of)」および「本質的に～からなる (consisting essentially of)」という移行句は、文字通りに開示されるものに加えて、材料、ステップ、特徴、構成成分、または要素を含む、融合タンパク質、薬学的組成物、および/または方法を定義するために使用されるが、但し、これらの追加の材料、ステップ、特徴、構成成分、または要素が、特許請求された発明の基本的かつ新規の特性(複数可)に本質的に影響を与えないものとする。「本質的に～からなる」という用語は、「備える」と「～からなる」との間の妥協点を占める。

10

【0033】

本発明またはその好ましい実施形態の要素を導入するとき、冠詞「a」、「an」、「the」、および「said」は、要素のうちの1つ以上が存在することを意味すると意図される。「含むこと (comprising)」、「含むこと (including)」、および「有する」という用語は、包括的であることを意図し、列挙される要素以外の追加の要素が存在する可能性があることを意味する。

【0034】

2つ以上の項目の列挙において「および/または」という用語が使用される場合、列挙された項目のいずれか1つを単独で使用しても、または列挙された項目のいずれか1つ以上と組み合わせて使用してもよいことを意味する。例えば、「Aおよび/またはB」という表現は、AおよびBの一方または両方、すなわち、Aのみ、Bのみ、またはAとBとの組み合わせを意味することが意図される。「A、Bおよび/またはC」という表現は、Aのみ、Bのみ、Cのみ、AとBとの組み合わせ、AとCとの組み合わせ、BとCとの組み合わせ、またはAとBとCとの組み合わせを意味することが意図される。

20

【0035】

本明細書に記載の本発明の態様および実施形態は、態様および実施形態「からなる」および/または「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0036】

範囲形式での説明は、便宜上かつ簡潔さのためにすぎず、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の説明は、考えられるすべての部分範囲とその範囲内の個々の数値が具体的に開示されるとみなされるべきである。例えば、1～6などの範囲の説明は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数字、例えば、1、2、3、4、5、および6が具体的に開示されるとみなされるべきである。このことは、範囲の幅に関係なく適用される。また、本明細書では、値または範囲は、「約」、「約」1つの特定の値から、および/または「約」別の特定の値まで、として表され得る。そのような値または範囲が表される場合、開示される他の実施形態は、1つの特定の値から、および/または他の特定の値まで、列挙された特定の値を含む。同様に、値が近似値として表現される場合、先行詞の「約」を使用することによって、特定の値は別の実施形態を形成することが理解されよう。本明細書で開示される値がいくつかあり、各値が、本明細書では、値自体に加えて、「約」その特定の値としても開示されることがさらに理解されよう。実施形態では、「約」は、例えば、列挙された値の10%以内、列挙された値の5%以内、または列挙された値の2%以内を意味するために使用され得る。

30

40

【0037】

本明細書で使用される場合、「患者」または「対象」は、治療されるヒトまたは動物の対象を意味する。

【0038】

本明細書で使用される場合、「薬学的組成物」という用語は、薬学的に許容される組成物を指し、組成物は、薬学的に活性な薬剤を含み、いくつかの実施形態では、薬学的に許容される担体をさらに含む。いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、薬学的に活

50

性な薬剤と担体との組み合わせであってもよい。

【0039】

「組み合わせ」という用語は、1つの投薬単位形態における固定された組み合わせ、または組み合わせ投与のためのパーツキットのいずれかを指し、1つ以上の活性化合物と組み合わせパートナー（例えば、「療法剤」または「補助薬剤」とも称される、以下で説明される別の薬物）とが同時に独立して、または時間間隔内に別々に投与され得る。いくつかの状況では、組み合わせパートナーは協同的効果、例えば、相乗効果を示す。本明細書で利用される場合、「併用投与」または「組み合わせ投与」などの用語は、選択された組み合わせパートナーを、それを必要としている単一の対象（例えば、患者）に投与することが包含されることを意味し、薬剤が必ずしも同じ投与経路または同じ時間で投与されるわけではない治療レジメンが含まれることを意図する。本明細書で使用される場合、「医薬の組み合わせ」という用語は、2つ以上の活性成分の混合または組み合わせによって得られ、活性成分の組み合わせが固定されているものも固定されていないものも含まれる生成物を意味する。「固定された組み合わせ」という用語は、活性成分、例えば、化合物および組み合わせパートナーの両方が単一の実体または用量の形態で同時に患者に投与されることを意味する。「固定されていない組み合わせ」という用語は、活性成分、例えば、化合物および組み合わせパートナーの両方が、特定の時間的制約を設けることなく別々の実体として同時に（*simultaneously*）、同時に（*concurrently*）、または連続して患者に投与されることを意味し、ここで、そのような投与によって、2つの化合物が療法上有効な濃度で患者の体内で提供される。後者は、カクテル療法、例えば、3つ以上の活性成分の投与にも適用される。

10

20

【0040】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という用語は、動物、より具体的にはヒトおよび/または非ヒト哺乳動物での使用に安全である他の製剤に加えて、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されていること、または米国薬局方、一般に認められている他の薬局方に列挙されていることを意味する。

【0041】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、脱メチレン化合物とともに投与される、賦形剤、希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、および/またはビヒクルを指す。そのような担体は、水および油などの無菌液体であってよく、油には、石油、動物、植物、または合成に由来する油、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油など、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒が含まれる。ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度を調整するための薬剤もまた、担体であり得る。担体と組み合わせる組成物を作成する方法は、当業者に既知である。いくつかの実施形態において、「薬学的に許容される担体」という用語は、医薬投与に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、等張剤、および吸収遅延剤などを含むことを意図する。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。例えば、*Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003)* を参照されたい。従来の媒体または薬剤が活性化合物と適合しない場合を除き、本組成物におけるそのような使用が企図される。

30

40

【0042】

本明細書で使用される場合、「治療的有効量」は、疾患および病態に関連する症状を治療もしくは改善するか、または何らかの様式で低減するのに十分である薬学的に活性な化合物の量を指す。方法に関して使用される場合、その方法は、疾患または状態に関連する症状を治療もしくは改善する、または何らかの様式で低減するのに十分有効である。例えば、疾患に関して有効量は、その発病を阻止もしくは予防するか、あるいは疾患病状が始

50

まっている場合は、その疾患の進行を緩和、改善、安定化、回復、もしくは遅延させるか、またはその疾患の病理学的結果を低減させるのに十分である量である。いずれの場合も、有効量は単回投与で与えても、または分割投与で与えてもよい。

【0043】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」、または「治療すること」という用語は、患者における疾患に関連する症状を少なくとも改善することを包含し、その場合、改善は、広い意味で使用され、例えば、治療されている疾患または状態に関連する症状などのパラメータの低度が少なくとも低減することを指す。したがって、「治療」には、疾患、障害、または病的状態、または少なくともそれらに関連する症状が、完全に阻害される（例えば、発生が予防される）かまたは停止され（stopped）（例えば、停止（terminated））、患者がそれ以上その状態、または少なくともその状態を特徴付ける症状に罹患することがないようにする状況が含まれる。

10

【0044】

本明細書で使用される場合、特に指定しない限り、「予防する」、「予防すること」、および「予防」という用語は、疾患もしくは障害、またはそれらの1つ以上の症状の発病、再発、または蔓延の予防を指す。ある特定の実施形態において、これらの用語は、症状の発病前に、特に本明細書に提供される疾患または障害のリスクのある対象への、1つ以上の他の追加の活性剤を伴うかまたは伴わない、本明細書に提供される化合物または剤形による治療またはそれらの投与を指す。これらの用語は、特定の疾患の症状の阻害または低減を包含する。ある特定の実施形態において、疾患の家族歴を有する対象は、予防レジメンの潜在的な候補である。ある特定の実施形態において、再発する症状の病歴を有する対象もまた、予防の潜在的な候補である。この点に関して、「予防」という用語は、「予防的治療」という用語と互換的に使用され得る。

20

【0045】

本明細書で使用される場合、特に指定しない限り、化合物の「予防的有効量」は、疾患もしくは障害を予防するか、またはその再発を予防するのに十分な量である。予防的有効量の化合物は、単独で、または1つ以上の他の薬剤と組み合わせて、疾患の予防において予防的利益を提供する療法剤の量を意味する。「予防的有効量」という用語は、全体的な予防を改善するか、または別の予防剤の予防有効性を増強させる量を包含し得る。

【0046】

本明細書で使用される場合、「治療薬」、「抗VEGF剤」、「融合タンパク質」、「キメラタンパク質」、または「組換えタンパク質」という用語は、第2のポリペプチドに作動可能に連結された第1のポリペプチドを含み、「治療薬」、「抗VEGF剤」、「融合タンパク質」、「キメラタンパク質」、または「組換えタンパク質」は、VEGFの活性を阻害する。キメラタンパク質は、第1または第2のポリペプチドに作動可能に連結された第3、第4、もしくは第5、または他のポリペプチドを任意選択的に含み得る。キメラタンパク質は、2つ以上の異なるポリペプチドを含み得る。キメラタンパク質は、同じポリペプチドの複数のコピーを含み得る。キメラタンパク質はまた、ポリペプチドのうちの1つ以上に1つ以上の変異を含み得る。キメラタンパク質を作製する方法は、当技術分野で周知である。いくつかの実施形態では、「治療薬」、「融合タンパク質」、「キメラタンパク質」、または「組換えタンパク質」という用語は、Ig様ドメインのうちの1つ以上、またはFc-IgGを有するVEGFR-1および/もしくはVEGFR-2のドメイン断片を作動可能に連結するペプチドまたはタンパク質を含むがこれらに限定されない、発現または合成される任意の構築物を指す。

30

40

【0047】

「Ig様ドメイン」という用語は、VEGFR-1およびVEGFR-2のIg様ドメイン1~7を指す。「Ig様ドメイン断片」という用語は、全長ドメインの一部、一般的にはヘパリンおよび/またはそのVEGF結合もしくは可変領域を含む。ドメイン断片の例には、全長ドメインの少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、最も好ましくは99%のセグメントを含み、100%の配列同一性およびその変

50

化を含むアミノ酸配列が含まれる。本開示により包含されるように、融合タンパク質のアミノ酸配列における変化が企図されるが、但し、アミノ酸配列の変化が少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、および最も好ましくは99%を維持するものとする。75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、および99%の配列同一性など、中間のある特定の割合が含まれる。特に、保存的アミノ酸置換が企図される。保存的置換は、側鎖に関連しているアミノ酸のファミリー内で起こる置換である。遺伝的にコードされたアミノ酸は、一般に、以下のファミリーに分類される。(1)酸性アミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸であり、(2)塩基性アミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジンであり、(3)非極性アミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンであり、(4)非荷電極性アミノ酸は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシンである。親水性アミノ酸には、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、セリン、およびスレオニンが含まれる。疎水性アミノ酸には、アラニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、およびバリンが含まれる。アミノ酸の他のファミリーには、(i)脂肪族ヒドロキシファミリーであるセリンおよびスレオニン、(ii)アミド含有ファミリーであるアスパラギンおよびグルタミン、(iii)脂肪族ファミリーであるアラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、ならびに(iv)芳香族ファミリーであるフェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンが含まれる。例えば、ロイシンをイソロイシンまたはバリンで、アスパラギン酸をグルタミン酸で、スレオニンをセリンで単独置換する、またはアミノ酸を構造的に関連するアミノ酸で類似置換することは、特に置換がフレームワーク部位内のアミノ酸を伴わない場合、得られる分子の結合または特性に大きな影響を及ぼさないと予想することは妥当である。アミノ酸変化が機能的な融合タンパク質をもたらすかどうかは、融合タンパク質誘導体の比活性をアッセイすることによって容易に決定することができる。融合タンパク質の断片または類似体は、当業者により容易に調製され得る。断片または類似体の好ましいアミノおよびカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界の近くに存在する。

10

20

30

【0048】

本明細書で使用される場合、「単離された」または「精製された」融合タンパク質は、融合タンパク質が存在する主要な種(すなわち、モルベースで、組成物中の任意の他の種々の種よりも豊富である)であり、好ましくは実質的に精製された画分が、融合タンパク質が存在するすべての高分子種の少なくとも約50%(モルベースで)を含む組成物であることを意味する。一般的に、精製された組成物は、組成物中に存在するすべての高分子種の約80%超、より好ましくは約85%、90%、95%、および99%超を構成する。最も好ましくは、融合タンパク質は、本質的に均一になるまで精製され(汚染物質種は従来の検出方法では組成物において検出することができない)、組成物は本質的に単一の高分子種からなる。

【0049】

一態様では、本発明は、治療薬を含む組成物を開示し、この治療薬は、VEGFR-1またはVEGFR-2の1つ以上のヘパリン結合ドメイン、および1つ以上のVEGF結合ドメインを含み、それにより、VEGFのその同族受容体への結合を阻害する。実施形態では、抗VEGF剤は、Fc-IgGに作動可能に連結されたVEGF結合部分を含み、このVEGF結合部分は、VEGFR-1のIgG様ドメイン2である少なくとも1つのVEGF結合ドメインを含む。

40

【0050】

実施形態では、本発明は、必要としている対象においてVEGFに関連する眼の障害を治療するための組成物および方法を提供し、本方法は、第1の治療有効量の抗VEGF剤を対象に硝子体内投与することと、先の投与から8週間超以内、または10~30週間以

50

内に第2の治療有効量の抗VEGF剤を対象に硝子体内投与することと、を含む。実施形態では、第2の治療有効量の抗VEGF剤は、先の投与から16~24週間以内に硝子体内投与される。実施形態では、本方法は、前の投与から10~30週間以内に少なくとも1年間、硝子体内投与される治療有効量の抗VEGF剤の後続投与を含む。本発明は、投与レジメンを必要としている任意の特定の個々の対象に対して必要とされ得るかかる投与レジメンを提供し、第2の投与および後続の投与は、アフリベルセプトよりも高いヘパリン結合効率のために等モル量のアフリベルセプトに対して必要とされるよりも頻度が低い。本発明は、眼内投与後、個体における抗VEGF剤の血漿レベルが、等モル量のアフリベルセプトの眼内投与後の個体におけるアフリベルセプトの血漿レベルよりも低いことをさらに提供し、これは、有害な神経発達効果などの望ましくない全身的效果を回避する。

10

【0051】

実施形態では、治療有効量の抗VEGF剤は、約1~10mgである。実施形態では、治療有効量の抗VEGF剤は、約3~6mgである。実施形態では、第1、第2、および後続の治療有効量は同一である。実施形態では、第1、第2、および後続の治療有効量は、異なる。本発明は、任意の特定の抗VEGF剤に対して、それを必要としている任意の特定の個々の対象に必要とされ得る治療有効量のそのような用量を提供する。

【0052】

実施形態では、本発明は、Fc-IgGに作動可能に連結されたVEGF結合部分を含む抗VEGF剤を提供し、このVEGF結合部分は、VEGFR-1のIgG様ドメイン2である少なくとも1つのVEGF結合ドメインを含み、この抗VEGF剤は、アフリベルセプトよりも優れたVEGF刺激有糸分裂誘発阻害能力を有する。実施形態では、本発明は、抗VEGF剤が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合能力を有することを提供する。実施形態では、本発明は、抗VEGF剤が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合VEGF刺激内皮細胞増殖阻害能力を有することを提供する。実施形態では、本発明は、薬剤が、アフリベルセプトと比較して、インビボで増加した半減期を有することを提供する。

20

【0053】

VEGFR VEGF結合ドメインは、当技術分野で周知である。VEGFR-1のIgG様ドメインV₁、V₂、V₃、およびV₄の例示的なアミノ酸配列および核酸配列はそれぞれ、図14~20内に提供され、図14~20は、記載されるように、ヒトIgG1-Fc断片およびVEGFR-1ドメイン全体を提示する。VEGFR-1の個々のヒトIgG様ドメインV₁、V₂、V₃、およびV₄のアミノ酸配列もまた、それぞれ配列番号15~18に個別に提供される。V₁のアミノ酸配列は、配列番号15(配列番号1内にある、図14の黄色のグレースケールのアミノ酸配列)である。V₂のアミノ酸配列は、配列番号16(配列番号1内にある、図14の青色のグレースケールのアミノ酸配列)である。V₃のアミノ酸配列は、配列番号17(配列番号1内にある、図14の灰色のグレースケールのアミノ酸配列)である。V₄のアミノ酸配列は、配列番号18(配列番号9内にある、図18の緑色のグレースケールのアミノ酸配列)である。

30

【0054】

実施形態では、本発明は、VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン1、2、および3(V₁-2-3)からなることを提供する。実施形態では、抗VEGF剤は、配列番号1で定義されるアミノ酸配列を含む。

40

【0055】

実施形態では、本発明は、VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン2および3(V₂-3)からなることを提供する。実施形態では、抗VEGF剤は、配列番号3で定義されるアミノ酸配列を含む。

【0056】

実施形態では、本発明は、VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン1、2、3、および3(V₁-2-3-3)からなることを提供する。実施形態では、抗VEGF剤は、配列番号5で定義されるアミノ酸配列を含む。

50

【0057】

実施形態では、本発明は、VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン2、3、および3(V₂₋₃₋₃)からなることを提供する。実施形態では、抗VEGF剤は、配列番号7で定義されるアミノ酸配列を含む。

【0058】

実施形態では、本発明は、必要としている対象においてVEGFに関連する眼の障害を治療する際に使用するための薬学的組成物を提供し、抗VEGF剤は、本明細書で定義される通りである。実施形態では、本発明は、治療有効量の、特許請求の範囲に定義される抗VEGF剤および薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。実施形態では、本発明は、必要としている対象においてVEGFに関連する障害を治療する方法を提供し、本方法は、定義される治療有効量の抗VEGF剤を対象に投与することを含む。抗VEGF剤は、眼などの罹患組織または臓器に直接注射することができる。

10

【0059】

実施形態では、本発明は、眼の疾患を治療するための方法を提供し、抗VEGF剤は、16週間に2回以上、硝子体内投与される。実施形態では、抗VEGF剤は、16~24週間に2回以上、硝子体内投与される。実施形態では、治療は少なくとも1年間継続される。実施形態では、治療有効量の抗VEGF剤は、約1~10mgである。実施形態では、治療有効量の抗VEGF剤は、約3~6mgである。

【0060】

実施形態では、本発明は、抗VEGF治療から恩恵を受ける、新生血管加齢性黄斑変性症、近視に続発する脈絡膜新生血管、増殖性糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、網膜静脈閉塞症などの網膜血管閉塞、眼の腫瘍、フォンヒッペル・リンダウ症候群、未熟児網膜症、ポリープ状脈絡膜血管症、または非腫瘍性障害を含む多種多様なVEGFに関連する疾患を治療するために使用することができる。

20

【0061】

いくつかの実施形態では、治療薬は、治療薬、および追加の賦形剤、担体、アジュバント、溶剤、または希釈剤を含む投与可能な剤形である。

【0062】

いくつかの実施形態では、本発明は、対象を治療する、および/または予防的に治療するのに好適な薬学的組成物を開示し、この抗VEGF剤は、その意図する目的を達成するのに有効な量で含まれる。

30

【0063】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される治療薬または組成物は、注射によって投与される。ある特定の実施形態では、組成物または治療薬は、罹患臓器または組織に直接注射される。いくつかの実施形態では、治療薬は、例えば、罹患臓器または組織へのパッチもしくは直接適用によって、またはイオン導入によって局所投与することができる。治療薬は、例えば、米国特許第5,672,659号および同第5,595,760号に記載されるものなどの徐放性組成物で提供されてもよい。即時または徐放性組成物の使用は、治療される状態の性質に依存する。状態が急性または過急性(over-acute)の障害からなる場合、即時放出型による治療は、徐放性組成物よりも好ましい。代替的に、ある特定の予防的または長期的治療については、徐放性組成物が適切であり得る。

40

【0064】

抗VEGF剤はまた、眼内インプラントなどであるがこれに限定されないインプラントを使用して送達されてもよい。そのようなインプラントは、生分解性および/または生体適合性のインプラントであり得るか、または非生分解性のインプラントであり得る。インプラントは、活性剤に透過性または不透過性であり得る。治療薬を送達するための特定のインプラントは、罹患組織または臓器、ならびに治療される状態の性質の両方に依存する。そのようなインプラントの使用は、当技術分野で周知である。

【0065】

本発明に記載の抗VEGF剤は、特定の組織への正確な送達を提供し、また放出制御療

50

法を提供するために、ナノ粒子または他の薬物製剤に製剤化され得る。

【0066】

この出願に記載されている抗VEGF剤は、精製された組換えタンパク質としてだけでなく、遺伝子療法アプローチによっても送達することができる。組換えアデノ随伴ベクター(rAAV)または他の好適なベクターを使用して、網膜下または硝子体内送達によってVEGF阻害剤を送達することができる^{43, 44}。

【0067】

関連する態様では、本発明は、対象におけるVEGFに関連するまたは新生血管の障害を治療するための方法を提供し、本方法は、対象に、(a)有効量の、ヘパリンに結合し、望ましくない新生血管の発達を減少または予防することができる融合タンパク質を投与することを伴う。融合タンパク質は、VEGFに特異的な抗体または抗体断片、VEGF受容体に特異的な抗体、チロシンキナーゼシグナル伝達を阻害、制御、および/または調節する化合物、VEGFポリペプチド、核酸レベルでVEGF発現を阻害するオリゴヌクレオチド、例えばアンチセンスRNA、ならびに血管新生阻害活性を有する様々な有機化合物および他の薬剤を含むが、これらに限定されない他の抗VEGF剤と組み合わせることができる。

10

【0068】

本発明は、VEGFR1のD3(または他のIg様ドメイン)によって媒介されるヘパリン結合²⁸が、全身投与には不利であるが、硝子体内(または他の局所)投与に重要な利点を付与することができることを提供する。実際、細胞外マトリックスの主要構成成分であるHSPSGに結合する能力²⁹は、硝子体における蓄積および網膜浸透を促進する³⁰。本発明は、HSPSGと相互作用する異なる能力を有する一連のVEGFR-1Fc融合構築物を提供する。これにより、異なる臨床条件下で有用である、眼における持続時間/半減期が異なるVEGF阻害剤を選択することができる。

20

【0069】

本発明の特徴および他の詳細は、ここでより具体的に記載され、好ましい技術および実験結果を記載する以下の実施例において示される。実施例は、本発明を例示する目的で提供され、限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0070】

より効果的で長期間持続する眼内使用のためのVEGF阻害剤を同定するために、VEGFR1Dにおけるヘパリン結合の多様性を研究した。これを受けて、8つのVEGFR1-Fc融合構築物を、差次ヘパリン結合を有するように設計し、これにより、HSPSG親和性のスペクトルを提供した。図1は、これらのタンパク質のドメイン構造を示し、ヘパリン結合ドメインを強調する。すべてのタンパク質は、リガンド特異性²⁷の主要な決定因子であるD2を含む。2つの構築物(V1233およびV233)は、重複したD3を有する。アフリベルセプトのドメイン構造も示す。

30

【0071】

初期の実験では、いくつかの構築物の発現レベルは低く、V1234、V1233、V234およびV124は、条件付けされた培地中の低いレベルで検出可能であった。興味深いことに、以前の研究では、ヘパリン(VEGF189またはVEGF206)に高い親和性を有するVEGFアイソフォームが、トランスフェクトされた細胞の馴化培地ではほぼ検出されず、細胞表面または細胞外マトリックスに大部分結合したことを示した³⁸⁹。しかしながら、それらはヘパリンまたはヘパリナーゼの添加により可溶性形態で放出され得、結合部位がHSPSGからなる³⁸⁹ことを示す。したがって、この実施例は、ヘパリンの添加が組換えVEGFR-1融合タンパク質のレベルにも影響を及ぼし得るかどうかを決定した。実際、トランスフェクトされた細胞の培地にヘパリンを添加すると、培地中の組換えタンパク質の濃度が用量依存的に増加した(データは示さず)。

40

【0072】

単に従来のプロテインA(PA)親和性クロマトグラフィーによる組換えタンパク質の

50

精製を試みた。しかしながら、この方法では、予想される質量の主要なバンドが得られ、強塩基性でヘパリン結合性で、宿主細胞由来のHSPGおよび他のアニオン性分子との組換えタンパク質の相互作用を反映している可能性が高い多数の小さいバンドがあった。したがって、方法に記載されているように、そのような不純物を取り除くプロトコルが開発された。タンパク質がPAに結合されるときに、1.2MのNaClの存在下で高pH(9.2)で洗浄すると、多数の汚染物質が放出された。次のステップの陰イオン交換クロマトグラフィーは、精製されたタンパク質がフロースルー状態である間に、汚染物質および凝集物の大部分を除去するのに非常に効果的であった。最終精製調製物のLPSレベルは $< 0.1 \text{ EU/mg}$ (範囲 $0.02 \sim 0.08$)であり、前臨床研究との互換性のレベルは非常に低かった³⁹。図2Aに示すように、銀染色SDS/PAGEで評価した組換えタンパク質の純度は、 $> 95\%$ であり、FDA承認薬物のEYLEAの純度と同等であった。図2Bは、EYLEAの隣にある3つの最も有望な候補、V23、V1233、およびV233の分析的SECプロファイルを示す。EYLEAと同様に、3つのタンパク質は、有意な凝集を伴わずに、予想される保持時間で単一のピークとして溶出した。

10

【0073】

組換えタンパク質は、BCECにおけるVEGF₁₆₅ (10 ng/ml)によって誘導された有糸分裂誘発を阻害する能力について試験された。図に示されているように、組換えタンパク質には阻害効果があり、 IC_{50} 値は、約 1 nM の範囲であったが、V124およびV24はそれほど強力ではなかった(図3)。また、VEGF₁₂₁によって刺激されたBCEC有糸分裂誘発を阻害するそれらの能力を記録した(図7)。興味深いことに、EYLEAは、ほぼすべての実験(10回以上)において、 IC_{50} が約 1 nM と低濃度でも活性を示し、強力であったが、試験した最高濃度でもVEGF刺激による増殖を約 80% 以上抑制しなかった。HVEC増殖アッセイを用いて同様の結果を得た(図8)。対照的に、VEGFR1構築物(V124およびV24を除く)は、VEGF誘導増殖を完全に遮断した。そのような差異を検出する能力は、VEGF刺激にตอบสนองのBCEC増殖アッセイの比較的高いダイナミックレンジ(約4倍の増加)を反映する可能性が高い。VEGFR1-D3は、特に、VEGFR1がVEGFR2^{40 41}よりも著しく効果的にVEGFに結合することを考慮して、VEGFR2からのD3よりも優れた相互作用面を提供し得る。この仮説を検証するために、各受容体からのVEGFR1/VEGF複合体(5T89)³⁰およびVEGFR2/VEGF複合体(3V2A)⁴²のタンパク質データバンクファイルと重ね合わせたD2-D3との比較を行った。この分析はこの仮説を支持している。例えば、VEGFR1-D3のArg280は、VEGF Phe36の側鎖と相互作用するが、VEGFR2は、そこにAspを有する。同様に、VEGFR1において、Arg261およびAsn290の両方がVEGF Glu64と相互作用し、VEGFR2において、Arg261がGlyによって置き換えられ、したがって、VEGFR2において、Asn290を置き換えるLysのみがVEGF Glu64と相互作用することができる。図9は、潜在的にVEGFと相互作用ことができ、VEGFR1とVEGFR2との間で異なるVEGFR1残基を示す。

20

30

【0074】

治療に関連する相互作用をさらに定義するために、組換えタンパク質がインビトロでウシ硝子体に結合するかどうかを評価した。図4に図示するように、EYLEA、対照IgG、またはペバシズマブは、ほとんどまたはまったく結合しなかったが、タンパク質は有意な結合を示した。最強の結合剤は、V1233、V233、V1234、続いてV123であった。V23は、EYLEA(または対照IgG)とV1233との中間的な結合特性を示した。硝子体結合は、用量依存的様態でヘパリンによって置換された。

40

【0075】

組換えタンパク質をマウスCNVモデルで試験し、対照IgGまたはEYLEAと比較した。広範な文献は、このモデルにおける抗VEGF剤の新生血管形成を抑制する能力を文書化する^{43 44 45}。概念実証試験には、様々な構築物間の効力および耐久性の違いを明らかにするのに最適である比較的低用量が選択された。また、IgG1アイソタイ

50

ブの比較的高用量の抗体の硝子体内投与は、FcγRIおよびc-Cb1を介したFcシグナルによって媒介される標的外の血管障害作用を有し、マクロファージの遊走障害を引き起こす可能性が報告されている⁴⁶。これらの効果は、データの解釈を混乱させる可能性がある。用いられる照射量は、有効であると同時に、そのようなオフターゲット効果を回避するはずである。最初は、各タンパク質は、レーザー治療の1日前に2.5 μgの用量で硝子体内に注射された。EYLEAも25 μgで試験された。図5Aに示されるように、EYLEAは、2.5 μgの用量で約30%の障害、25 μgで約50%の障害をもたらした。これらの知見は、発表された文献とほぼ一致する。例えば、Sai shinらは、約5 μgのアフリベルセプトの硝子体内注射により、マウスのCNV領域が約30%障害されたと報告した⁴⁴。実際、40 μgの用量は、マウスCNVモデルにおいてアフリベルセプトの最大障害性効果を達成するために一般的に使用される⁴⁷。

10

【0076】

予想外の知見だったのは、V123、V23、V1233およびV233の構築物のいくつかの効力が高かったことである。損傷の1日前にこれらのタンパク質を2.5 μg投与すると、25 μgのEYLEAで達成された障害レベルと一致するか、それを超えた。しかしながら、D4を含む構築物はいずれも、有意なCNV障害を示さなかった(図5A)。

【0077】

ヘパリン結合が単回投与後に永続的治療効果をもたらすかどうかを決定するために、V1233、EYLEA、または対照IgGを、レーザー誘導損傷の1日、7日、または14日前に硝子体内に注射した(2.5 μg)。図5Bに示されるように、EYLEAは、損傷の1日前に投与した場合にのみ有意な障害をもたらした。対照的に、V1233は、損傷の7日または14日前に投与した場合にも有意な障害をもたらした。

20

【0078】

その後の研究では、傷害の14日前に等モル量のEYLEA、V23、V1233およびV233(EYLEAおよびV23の4.8 μg、V233の6.3 μgおよびV1233の7.2 μg)を投与した。図5Cは、試験した用量において、EYLEAがCNVにほとんど影響を及ぼさなかったことを示している。対照的に、V23、V1233、およびV233は、有意なCNV障害をもたらした。この仮説の予測は、強いヘパリン結合特性を有する障害剤は、EYLEAと比較して低い全身曝露を有するであろうというもの³⁰である。図5Dに示すように、両眼に等モル量のEYLEA、V23、V233またはV1233を硝子体内に注射し、硝子体内投与の21日後までの異なる時点でヒトFc血清レベルを測定した。EYLEA投与は、実験全体を通して最高の血清レベルをもたらした。単一のヘパリン結合ドメインを有するV23は、EYLEAよりも低い血清レベルをもたらしたが、V1233またはV233よりも高い傾向があった。

30

【0079】

最後に、OIRモデルにおけるV1233とEYLEAの複数回投与を比較した。CNVモデルの所見と一致して、V1233は、EYLEAよりも新生血管形成を障害することに強力であった(図6)。

【0080】

図7は、VEGF165またはVEGF121によって刺激されたBCEC増殖に対する融合タンパク質の障害効果を示す。結果は、対照に対するVEGF刺激増殖の抑制の%として表される。細胞数は、相対蛍光単位(RFU)530/590(励起/放出)、3連の平均によって決定した。

40

【0081】

図8は、HUVEC増殖に対する組換えVEGF受容体Fc融合タンパク質の障害効果を示す。3日間、VEGF165(10 ng/ml)とともに、V123、V1233、V233、V23、またはEYLEA(10~2000 ng/ml)を添加し、細胞生存率を決定した。結果は、対照に対するVEGF刺激増殖の抑制の%として表される。細胞数は、相対蛍光単位(RFU)530/590(励起/放出)、3連の平均によって決定

50

した。統計解析を、Graph Pad Prismソフトウェアにおいて2元配置分散分析によって行った。統計学的有意性 * $p < 0.001$ 、** $p < 0.0001$ は、VEGF単独と比較することによって計算した。

【0082】

図9は、VEGF/VEGFR2複合体(3V2A)の結晶構造を、VEGF/VEGFR1複合体(5T89)の結晶構造に重ね合わせたことを示す。潜在的にVEGFと相互作用することができ、VEGFR1とVEGFR2との間で異なるVEGFR1残基を標識する。黄色および青色のグレースケール：VEGFグリーングレースケール：VEGFR1 D2。白色：VEGFR1 D3。分析は、VEGFR2 D3と比較して、VEGFとVEGFR1 D3との間のより広範な相互作用を指摘する。

10

【0083】

精製したCHO発現V1233の活性を、2つの独立したバイオアッセイで試験した。BCEC増殖(図10)およびPromega VEGFバイオアッセイ(図11)。両方のアッセイは、2つの独立したパッチの精製されたV1233が、EYLEAと同様の(より大きくはないが)効力を有するVEGF刺激成長または受容体活性化を阻害することを示す。

【0084】

また、293細胞(Exp1-293系)とは対照的に、CHO細胞における構築物の発現は、培地へのヘパリンの添加に依存しないと判断し(図12)、大きな利点となった。さらに、CHO由来V1233がマウスCNVモデルにおいて完全に活性であり、293発現V1233に劣らず強力であることが決定された(図13)。

20

【0085】

考察

D3とHSPGとの相互作用は、様々な組織内での隔離に起因するVEGFR1ベースの抗VEGF戦略の制限と長い間考えられており、結果として全身半減期が低下する。そのような問題を克服するために、HolashらはVEGFR1 D3をVEGFR2 D3²¹に置き換えた。同じ目的のために、Leeらは、より最近、VEGFR1 D3にグリコシル化部位を導入し、正電荷を効果的に中和し、したがって、D3媒介性HSPG結合⁴⁸を排除した。両方の場合において、全身半減期は、元のVEGFR1構築物²¹⁴⁸と比較して増加した。

30

【0086】

本研究は、HSPGと相互作用する異なる能力を有する一連のVEGFR-1 Fc融合構築物を設計する。前提は、VEGFR1 D3(またはD4⁴⁹などの他のIg様D)によって媒介されるヘパリン結合は、全身治療には不利であるが、a)阻害剤を硝子体内または眼内の他の構造内のHSPGまたは他の陰イオン分子に固定し、したがってその半減期を増加させるべきであることから、硝子体内投与に使用されるVEGF阻害剤に独自の利点を付与し得ることであり、b)そのような阻害剤は、VEGFに効果的に結合し、遮断するために、一様に分布する必要はなく、または眼の構造内に深く浸透する必要はないため、硝子体内投与に使用するVEGF阻害剤には独特の利点を与えるかもしれないということである。様々な研究により、VEGFがHSPGまたは血管系または他の部位における受容体分布によって決定される生化学的勾配に反応して、その産生部位からかなりの距離まで拡散することができることが示された⁵⁰⁸⁹。例えば、VEGFは、血管系からかなりの距離であっても腫瘍細胞によって産生されるが、VEGF受容体への親和性が高いため、血管内に拡散し、蓄積する⁵¹⁻⁵³。したがって、硝子体結合VEGFR1バリエーションは、強い勾配を生成し、VEGFを引き寄せ、中和することができる

40

【0087】

非常に緊密な結合剤を有するSPR($K_d < 100 \text{ pm}$)⁵⁴などのセンサープラットフォームを使用して正確な親和性測定を取得する際の課題、他のVEGF阻害剤²¹⁵に対するアフリベルセプトの親和性に関する矛盾するデータ、およびVEGFに対する

50

中和抗体と他の標的⁵⁶⁵⁷との間の結合親和性と治療的効力/有効性との間の相関性の低さを考慮して、本研究は、生体IC₅₀データに焦点を当て、より生理学的に関連性があることを選択した。図4に示されているように、組換えタンパク質には阻害効果があり、IC₅₀値は、約1 nMの範囲であったが、V124およびV24はそれほど強力ではなかった。

【0088】

これらのタンパク質がウシの硝子体に結合する。最強の結合剤は、V1233、V1234、続いてV123であった。V23は有意であったが、硝子体結合が低かった。対照IgG、EYLEA、またはAVASTINでは、代わりに結合が最小限であった。

【0089】

我々の研究で予想外の知見だったのは、V123、V23、V1233およびV233の構築物のいくつかの効力が高かったことである。損傷の1日前にこれらの構築物を2.5 μg投与すると、25 μgのEYLEAで達成された阻害レベルと一致するか、それを超えた。EYLEAではなくV1233が、損傷の7日または14日前に投与した場合にCNVの予防に有意な効果があるという知見は、効果の持続性および治療的価値を実証する。

【0090】

また、これらのヘパリン結合タンパク質の硝子体内注射は、EYLEAよりもはるかに低い全身レベルをもたらすことが分かった。この特性は、例えば、ROPの治療に特に有用であり得る。これは、顕著な全身曝露を有する抗VEGF剤での治療が、有害な神経発達効果を有し得ることが報告されているためである⁵⁸⁵⁹。

【0091】

興味深いことに、これらの分子(V₂₋₄を除く)がインビトロでVEGF刺激有糸分裂誘発を阻害する能力を示したという事実にもかかわらず、D4を含有する構築物(V1234、V234、V124、V24)のいずれもインビボで顕著な阻害をもたらさなかった(少なくとも試験した用量で)ことである。しかしながら、これらの構築物はすべて、非還元条件下のSDS/PAGEおよびサイズ排除クロマトグラフィー(図示せず)によって評価されるように、オリゴマーまたは凝集体を形成する傾向を示した。初期の研究⁶⁰では、D4(D7と一緒に)がVEGFR-1二量体化の要件として同定されたが、そのような効果はリガンド依存性であることが既知である。結晶構造研究は、そのような同型相互作用の原因となるD4のループを明らかにした³⁰。高濃度および/またはFc構築物によって課せられる強制的な二量体化がリガンド非依存性相互作用をもたらし、凝集をもたらす可能性があると考えられる。いずれにしても、炎症および免疫原性の可能性を考えると、凝集体は望ましい医薬品ではない⁶¹、⁶²。重要なことに、D4を含むタンパク質の有意な有効性の欠如は、すべてのタンパク質が同じ方法論によって精製され、強力なヘパリン結合特性を有するため、汚染物質が観察された有効性に関与している可能性を主張する。

【0092】

結論として、アフリベルセプトは、腫瘍学的適応症の全身半減期を改善するために、ヘパリン結合ヘパリンドメインを排除するように設計された。本研究で説明される構築物は、代わりに硝子体における結合および保持を促進して、より持続的で治療に関連する相互作用を確実にするように設計されている。

【0093】

CHO細胞を発現系として用いた実験では、トランスフェクト細胞の培地にヘパリンを添加する要件は、培地にヘパリンを添加することで組換えタンパク質濃度の非常に小さな増加をもたらされるように、大幅に減少した。これは、293細胞とCHO細胞との間のHSPG組成/濃度の差によって説明される可能性が高い。

【0094】

方法

VEGFR-Fc発現プラスミドの構築のために、シグナルペプチドをコードする核酸

10

20

30

40

50

断片と、VEGFR127（遺伝子ID：2321）のうちの1～4個の細胞外Ig様ドメインの組み合わせをGenScrep USA Inc.によって合成した。以下の構築物を行った：V123、D1、D2およびD3、V23、D2およびD3、V1233、D1、D2、D3およびD3、V233 D2、D3およびD3、V1234、D1、D2、D3およびD4、V234、D2、D3およびD4、V124、D1、D2およびD4、V24、D2およびD4。合成された断片は、EcoRIおよびBglII部位でpFUSE-hIgG1-Fc1ベクター（InvivoGen、#pfuse-hg1fc1）に挿入され、様々なVEGFR1 ECDを含有するプラスミドが生成された。次に、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit（Takara、R046A）を使用して、ECDとFc断片との間のインターバルアミノ酸RおよびS（BglII部位）を除去し、227アミノ酸ヒトIgG1-Fcを有するVEGFR1 ECDの融合タンパク質を発現するプラスミドを生成した。

10

【0095】

トランスフェクションおよび馴化培地の調製

製造業者の指示に従い、Expi293発現系（Life technologies、A14524）を使用して、精製用の馴化培地を生成した。簡潔に、Expi293F（商標）細胞（ThermoFisher）を、8%CO₂の加湿雰囲気中、37℃で、Expi293（商標）発現培地中で懸濁培養した。細胞密度が250万/mlに達したら、プラスミドDNAおよびExpiFectamine（商標）293試薬を混合し、5分間インキュベートし、細胞に添加した。DNAおよびトランスフェクトされた試薬の最終濃度は、それぞれ、1μgおよび2.7μl/ミリリットルであった。トランスフェクションの5時間後、100μg/mlのヘパリン（Sigma、H3149）およびプロテアーゼ阻害剤カクテル1：400（Sigma、P1860）を細胞に添加した。トランスフェクションの16時間後、エンハンサー試薬1および2を添加した。トランスフェクションの96時間後、馴化培地を採取した。製造業者の指示に従い、ヒトFc ELISA Kit（Syd Labs、EK000095-HUFC-2）を使用して、Fc融合タンパク質濃度についてアリコートを試験した。プロテアーゼ阻害剤をバルクに添加し（1：500）、さらに使用するまで-80℃で保存した。

20

【0096】

組換えタンパク質の精製

発熱物質不含試薬を使用した。使用する前に、カラムおよび機器（Akt Explorer System）を0.5 NのNaOHに曝露して消毒した。トランスフェクトされた細胞からの馴化培地を、PBS、0.01%のポリソルベート（PS）20に調整した。PS20を、すべてのステップで緩衝液に添加した。20,000×gで30分間遠心分離した後、上清を、Hi-Trap MabSelect SuRe（5ml、GE Healthcare）を使用するプロテインA（PA）親和性クロマトグラフィーにかけた。ローディング後、カラムを、20mMジエタノールアミン、pH9.2、1.2MのNaClで洗浄した後、0.1Mのクエン酸、pH3.0で溶出し、これをすぐに中和した。次に、PA溶出プールを、20mMのジエタノールアミン、pH9.2に希釈し、Hi-Trap Q（GE Healthcare）陰イオン交換カラムに適用した。結合した物質を、NaClの勾配で溶出した。精製された組換えタンパク質を含有するフロースルーを、直ちに20mMのTris、pH6.8に調整し、ヘパリン-セファロース（Hi-Trap（商標）-HS）への結合により濃縮した。0.2～0.45MのNaCl（構築物に依存）で洗浄した後、組換えVEGFR1融合タンパク質を1MのNaClで溶出した。最終的な研磨ステップは、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）からなった。最後に、10mMのTris、pH6.8、10mMのヒスチジン、5～7%のスレアロース（threhalose）、40mMのNaCl、0.01%のPS20への透析により、タンパク質を緩衝液交換した。目標は、等浸透圧製剤（約300mOsm）に近いものを得ることである。内毒素レベルを決定するために、Toxin Sensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit（

30

40

50

GenScript、L00350)を、製造業者のプロトコルに従って使用した。

【0097】

細胞増殖アッセイ

内皮細胞増殖アッセイは、本質的に以前に記載されているように実施された^{63, 64}。初代ウシ脈絡膜内皮細胞(BCEC)(継代数<10)(VEC Technologies Rensselaer, NY、カタログ番号BCME-4)をトリプシン処理し、再懸濁し、10%ウシ仔牛血清、2mMグルタミンおよび抗生物質を補充した低グルコースDMEM中の96ウェルプレート(コーティングなし)に、200 μ l容量でウェル当たり1000細胞の密度で播種した。rhVEGF₁₆₅(R&D Systems、カタログ番号293-VE-010)またはrhVEGF₁₂₁(R&D System 10
s、カタログ番号4644-VS010)を10ng/mlの濃度で添加した。アフリベルセプト(EYLEA)は薬局から購入した。阻害剤は、リガンドを添加する前に、図に示されるように、様々な濃度で細胞に添加された。5または6日後、細胞をAlamar Blueと4時間インキュベートした。蛍光を、530nmの励起波長および590nmの発光波長で測定した。

【0098】

プールしたドナー(Lonzaカタログ番号C2519A)、継代5~9由来の初代ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を、EGM-2内皮細胞増殖培地(Lonza)中の0.1%ゼラチンコーティングプレート上で培養した。細胞を、5%CO₂の加湿雰囲気 20
で37に維持した。細胞増殖を測定するため、0.5%FBSを含有する200 μ lの内皮基底増殖培地EBM-2(Lonza)中に懸濁した1800個のHUVECを、96ウェルプレートに播種した。4時間後、10、20、50、250、500、1000および2000ng/mlの濃度の組換えFc融合タンパク質およびEYLEAを、10ng/mlのVEGF₁₆₅とともに細胞に添加した。細胞を3日間培養し、製造業者の指示に従って、細胞生存率をalamarBlue細胞生存率試薬(Thermo Fisher Scientific)によって決定した。

【0099】

ウシの硝子体へのインビトロ結合

ウシ硝子体試料(InVision BioResource, Seattle, WA)を4で解凍し、次いでPBSで1:1で希釈し、0.22 μ mのフィルターで濾過し 30
、分取し、-80で保存した。総タンパク質濃度を、Pierce BCAタンパク質アッセイによって測定した。Costar 96ウェルEIA/RIAストリップウェルを、室温で4時間、硝子体(1pg/ウェル)でコーティングし、続いて、PBS-0.1% Tween 20(PBS-T)で1回洗浄した。各ウェルに、0.08~10nMのキメラVEGF受容体タンパク質を50 μ l体積で添加し、4で一晩インキュベートした。次いで、プレートをPBS-Tで洗浄し、APコンジュゲートヤギ抗ヒトFc(1:2000、Invitrogen、#A18832)とともに室温で1時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tで洗浄した後、室温で15~30分間、1ステップPNPP基質(Thermo Scientific, Rockford, IL, #37621)を添加した。吸光度は405nmで測定されるであろう。S 40

【0100】

レーザー誘導脈絡膜新生血管(CNV)

雄のC57BL/6Jマウス(6~8週)を、レーザー治療の前にケタミン/キシラジンカクテルで麻酔した。CNV病変は、ダイオードレーザー(IRIDEX, Oculight GL)、ならびにスポットサイズ50 μ m、出力180mW、および露光時間100msの細隙灯(Zeiss)を使用するレーザー光凝固によって誘導された。^{47, 65}。典型的には、4つのレーザー火傷が、各眼の視神経乳頭の周りの3、6、9、および12時の位置で誘導された。異なる構築物またはIgGアイソタイプを、1 μ lの容量の2.5 μ g/眼の用量で硝子体内に注射した。EYLEAは、2.5または25 μ gで陽性対照として使用された。注射の1日後にレーザー治療を行い、レーザー治療の7日後 50

に、眼を摘出し、4%のパラホルムアルデヒド(PFA)で15分間固定した。別の一連の研究では、レーザー治療の1日、7日、または14日前に、選択された構築物を1回注射した。脈絡膜-強膜複合体および網膜を分離し、網膜および脈絡膜組織の両方の全体マウント染色により血管系を証明するために抗CD31免疫蛍光法(IF)を実施した。CD31 IFの場合、ラット抗マウス抗体BD 550274を、1:100に希釈し、4で一晩インキュベートした。二次抗ラット抗体(Life Technologies A11006)との4時間のインキュベーション後、全体マウントを488nmで撮像した。病変領域の新生血管および網膜の血管密度の定量化は、Image Jによって行われた。P値は、スチューデントのt検定によって評価された(有意な変化、 $p < 0.05$)。

10

【0101】

酸素誘発性網膜症モデル

酸素誘発性網膜症(OIR)マウスモデルは、虚血性血管性眼疾患の分子変化を描写するのに有用であることが証明されている確立された方法である⁶⁶⁻⁶⁷。密閉チャンバを使用して、新生仔マウスを産後7日目(P7)からP12まで75%の酸素に曝露した後、21%の酸素(室内空気)に戻す。この高酸素症への曝露は、虚血性脈管障害の血管遮断期を模倣して、中心網膜の血管退縮と正常な撓骨血管の成長の停止を引き起こす。室内空気に戻ると、網膜の無血管領域は低酸素になる⁶⁸⁻⁶⁹。この低酸素は、血管新生因子、特にVEGF70の発現を誘導し、血管網膜と無血管網膜の接合部における異常な網膜新生血管の成長をもたらす。阻害剤の効果を試験するために、新生血管相の阻害を試験するために、高酸素症に曝露する前に硝子体内注射を実施する。P7の野生型C57BL/6jマウスは、げっ歯類のフェイスマスクを通して流れるイソフルランを使用して麻酔される。まぶたは、Vannasマイクロディセクションハサミを使用して開き、引き戻して目を露出させる。次に、ピコスプリッターIII(Parker Hannifin)に取り付けられた引っ張られたガラス製マイクロピペットを用いて、0.5plの溶液を硝子体内に注射する。注射後、針は30秒間目に残し、漏れを最小限に抑えるためにゆっくりと引き抜かれる。この手順は、対照として等モルのヒトIgG1(Bio X Cell, West Labanon, NH)を注射して、僚眼で繰り返される。EYLA、種々の構築物を、種々の用量で対照IgG1に対して試験する。まぶたは抗生物質の軟膏で覆われていた。次いで、リッターをP7-P12由来の75%過酸素チャンバ内に配置して、OIR表現型を生成する。新生血管形成のピーク時であるP17では、動物を殺し、目を除去し、解剖し、血管をBSL-FITCで染色する。網膜を平らに取り付け、共焦点顕微鏡によって画像化した。新生血管形成の程度を、前網膜血管芽の体積を測定することによって定量化した⁶⁷⁻⁷⁰⁻⁷²。血管遮断および新生血管形成を、記載したように自動ソフトウェアを使用して分析した⁷³。

20

30

【0102】

CHO細胞研究

プラスミドの構築および発現

VEGFR1のシグナルペプチド(遺伝子ID:2321)およびヒトIgG1-Fcドメイン(遺伝子ID:3500)で1~3個の細胞外Ig様ドメイン(ECD)をコードする核酸断片をGenScrep USA Inc.によって合成した。断片を、XbaIおよびEcoRI部位でpD2535nt-HDPデュアルEF1aプロモーターベクター(ATUM)に挿入し、227アミノ酸ヒトIgG1-FcでVEGFR1 ECDの融合タンパク質を発現するプラスミドを生成した。VEGFR1 ECD構築物は以下の通りである。V123はECD1、2および3を含み、V1233はECD1、2、3および3を含み、V233はECD2、3および3を含み、V23はECD2および3を含む。すべての構築物の真偽を配列解析によって検証した。

40

【0103】

CHO K1グルタミン合成酵素(GS)ヌル細胞(HD-BIOP3, Horizon)を安定発現のために使用し、Neon(商標)トランスフェクションシステム(#M

50

PK10096, ThermoFisher)を用いてトランスフェクションを実施した。簡潔に述べると、線形化した構築物DNAを、Horizon Discoveryによって提供されるプロトコルに従って、HD-BIOP3細胞中にエレクトロポレーションによってトランスフェクションし、細胞を、4 mMのL-グルタミン(#25030081, ThermoFisher)を含有するCD FortiCHO培地(#A1148301, ThermoFisher)中で、5%CO₂の加湿雰囲気下、37℃で48時間培養した。2日目の回収後、培地を選択培地、50 μMのMSXを含有するCD FortiCHO(#76078, Sigma)で変更した。最大20日間の培養のために、VEGFR1 ECDの4つのプールを選択し、バンクした。培地中のVEGFR1融合タンパク質の発現を、ヒトFc ELISAキット(EK000095-HUFC-2, Syd Lab Inc.)および抗ヒトIgG1 Fc抗体(A-10648, Invitrogen)によるウエスタンブロッティングによって評価した。4つのプールの発現レベルは、100万個の細胞当たり1.9~13 μgであった(平均でV123で7.1、V1233で1.98、V233で4.7、V23で12.7)。

【0104】

単一細胞クローンスクリーニングのために、プール細胞を希釈し、プロトコルに従って選択した(Horizon)。約60日間の培養後、合計39個のクローンを選択し、ストックした。8個はV123、11個はV1233、9個はV233、11個はV23である。各クローンの培養培地中のVEGFR1融合タンパク質の発現をELISAおよびウエスタンブロットにより評価した。発現レベルは、100万個の細胞当たり3.0~18.3 μgである(平均して、V123で12、V1233で3.7、V233で6.5、およびV23で13)。

【0105】

大規模な培地調製のために、細胞(単一細胞クローン)を、 $0.5 \times 10^6 / \text{ml}$ の密度でスピナーフラスコに播種し、5%のCO₂で、加湿雰囲気および125 rpm(25 mm軌道を有する軌道シェーカー)で、1:1000アンチ克蘭ピング剤(#0010057AE, ThermoFisher)および1:200プロテアーゼ阻害剤カクテル(p1860, Sigma)を補充したCD FortiCHOの培地中で37℃で培養した。細胞生存率および密度を毎日モニタリングし、培地を5~7日間のインキュベーション後に回収した(細胞密度は $7.0 \sim 10 \times 10^6 / \text{ml}$ 、生存率は>90%)。クローン、V1233-26、V233-52/67およびV23-5を大型培養培地調製に使用した。培地中のVEGFR1融合タンパク質の発現をELISAにより検証し、ウエスタンブロットおよび培地を-80℃で保存してさらなる精製を行った。発現レベルは、20~115 μg/mlであった(V1233は23 μg/ml、V233は47 μg/ml、V23は105 μg/mlの平均)。

【0106】

精製

より高いレベルのV1233タンパク質(20~30 μg/ml)クローン14、26、44および46を発現するHorizon Discovery(HD)-BIOP3CHO細胞を精製する。4つのクローンはすべて、同様の最終生成物を得たので、その後の精製のために、クローン26を使用した。V1233-26からおよそ10 mgに相当する条件培地を以下のように行った。37℃で解凍した条件培地を5%PBSおよび0.01%(v/v)Tween 20に調整し、20,000 gで30分間4℃で遠心分離した。1×PBSおよび0.01%Tween 20で平衡化したプロテインAカラム(HiTrap(商標)MabSelect(商標)Sure5ml)(GE Healthcare)に、明確化した抽出物を適用した。カラムを、高pH、高塩緩衝液(5 CV:20 mMのエタノールアミン(pH 9.2、1.2 MのNaCl、0.01% Tween 20)、および結合したタンパク質を0.1 Mのクエン酸(pH 3.0)によって溶出させ、1 MのTris(pH 9.5)の体積の1/5を添加することによって直ちに中和した。Flt1タンパク質を含有する画分をプールし、20 mMのエタノールアミン(pH 9

．2、0.01% Tween 20) 中で10倍に希釈し、HiTrap (商標) Q HP 5 ml (GE Healthcare) アニオン交換カラムに適用した。フロースルーに存在するFlt1タンパク質を、10% v/vの0.5MのTris (pH 6.8) を添加することによってpH 6.8に調整し、20mMのTris (pH 6.8)、0.01% Tween 20中で平衡化したHiTrap (商標) HPヘパリン1mlカラムに適用した。カラムを緩衝液中の0.45MのNaClで洗浄し、続いて1MのNaCl中で最終溶出した。Flt1陽性画分をプールし、10mMのTris (pH 7.2、0.4m NaCl、0.01% Tween 20) 中のHiLoad Superdex 16x600カラム (GE Healthcare) 中のゲル濾過クロマトグラフィーに供した。高分子量凝集塊を除く画分をプールし、HiTrap (商標) Heparin HP 1mlカラムに結合した後に濃縮し、続いて前述のように1MのNaCl溶出を行った。

【0107】

溶出したタンパク質を、Float-A-Lyzer RG2透析装置、MWCO 100kDまたは50kD (Spectrum Laboratories) を使用して透析し、Amicon遠心フィルターUltraCel 50kを使用して濃縮した。

【0108】

大規模精製 (50mgタンパク質に相当する条件培地) のために、方法を以下のように変更した。プロテインAクロマトグラフィーは、0.1Mのクエン酸中で最終溶出する前に、緩衝液1 (50mMのTris、pH 8.5、1.2MのNaCl、0.5Mのアルギニン、0.01%のTween 20) および緩衝液2 (25mMのリン酸ナトリウム、pH 6.5、200mMのNaCl、0.01%のTween 20) を使用して、2つの洗浄ステップを有するHiTrap Prism A 5mlカラムを使用して行った。HiTrap Qを20mMのTris (pH 8.5) を用いて実施し、わずかに高い塩 (0.55M) を用いてHiTrapヘパリンカラムを洗浄した。ゲル濾過工程を、緩衝液10mMのヒスチジン、pH 6.0、80mMのNaCl、0.01%のTween 20中のより広いカラム (HiLoad 26x600) で行った。透析の代わりに、PD10カラムを緩衝液交換に使用し、最終的なタンパク質を、pH 5.0の10mMの酢酸ナトリウム、7%のトレハロース、および0.01%のTween 20中に保存した。

【0109】

クロマトグラフィーをFPLCシステムAKTA Avant (GE Healthcare) で行った。カラムおよび器具は、各実行の前に0.5NのNaOHによって消毒 (所定の場所での洗浄) された。各工程後のSDS-PAGEおよび銀染色によって、タンパク質の純度を測定した。最終的なタンパク質調製の質は、分析的ゲル濾過によって決定した。

【0110】

総タンパク質推定を、タンパク質アッセイ染料試薬 (Bio-Rad)、およびヒトFcタンパク質およびヒトIgG (Syd Labs) のFc ELISAキットによって行った。全体的なタンパク質回収率はおよそ10%であり、最終的なタンパク質は0.004EU/mg前後、HCP 150ng/mg前後のエンドトキシンレベルを達成した。

参考文献

- [1] Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 1987, 235: 442-7.
- [2] Klagsbrun M, D'Amore PA: Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991, 53: 217-39.
- [3] Ferrara N, Adamis AP: Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2016, 15: 385-403.
- [4] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nature* M

ed 2003, 9:669-76.

[5] Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology* 1991, 5:1806-14.

[6] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *Journal of Biological Chemistry* 1991, 266:11947-54.

[7] Park JE, Keller G-A, Ferrara N: The vascular endothelial growth factor isoforms (VEGF): Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell* 1993, 4:1317-26.

[8] Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shimada DT: Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 2002, 16:2684-98.

[9] Ferrara N: Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action. *Mol Biol Cell* 2010, 21:687-90.

[10] de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992, 255:989-91.

[11] Terman BI, Dougher Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem-Biophys-Res-Commun* 1992, 187:1579-86 issn:0006-291x.

[12] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO-J* 1996, 15:17

10

20

30

40

50

51 issn: 0261-4189.

[13] Alitalo K, Tammela T, Petrova TV: Lymph angiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005, 438: 946-53.

[14] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7: 359-71.

[15] Ferrara N: VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002, 2: 795-803. 10

[16] Miller JW, LeCouter J, Strauss EC, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. *Ophthalmology* 2013, 120: 106-14.

[17] Apte RS, Chen DS, Ferrara N: VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 2019, 176: 1248-64.

[18] Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N: Humanization of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody for the Therapy of Solid Tumors and Other Disorders. *Cancer Res* 1997, 57: 4593-9. 20

[19] Chen Y, Wiesmann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, de Vos AM, Lowman HB: Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *Journal of Molecular Biology* 1999, 293: 865-81. 30

[20] Chamow SM, Ryll T, Lowman HB, Farson D: Therapeutic Fc-Fusion Proteins. *Wiley Blackwell*, 2014.

[21] Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS: VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99: 11393-8. 40

[22] Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research G, Maguire MG, Martin DF, Ying GS, Jaffe GJ, Daniel E, Grunwald JE, Toth CA, Ferris FL, 3rd, Fine SL: Five-Year Outcomes with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: The Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trial 50

- s. *Ophthalmology* 2016, 123:1751-61.
- [23] Holz FG, Tadayoni R, Beatty S, Berger A, Cereda MG, Cortez R, Hoyng CB, Hykin P, Staurenghi G, Heldner S, Bogumil T, Heah T, Sivaprasad S: Multi-country real-life experience of anti-vascular endothelial growth factor therapy for wet age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2015, 99:220-6.
- [24] Regula JT, Lundh von Leithner P, Foxton R, Barathi VA, Cheung CM, Bo Tun SB, Wey YS, Iwata D, Dostalek M, Moelleken J, Stubenrauch KG, Nogoceke E, Widmer G, Strassburger P, Koss MJ, Klein C, Shima DT, Hartmann G: Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases. *EMBO Mol Med* 2016, 8:1265-88. 10
- [25] Rodrigues GA, Mason M, Christie LA, Hansen C, Hernandez LM, Burke J, Luhrs KA, Hohman TC: Functional Characterization of Abicipar-Pegol, an Anti-VEGF DARPIn Therapeutic That Potently Inhibits Angiogenesis and Vascular Permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018, 59:5836-46. 20
- [26] Vorum H, Olesen TK, Zinck J, Hedegaard M: Real world evidence of use of anti-VEGF therapy in Denmark. *Curr Med Res Opin* 2016:1-32.
- [27] Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N: The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO Journal* 1996, 15:4919-27. 30
- [28] Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM: Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 1997, 91:695-704. 40
- [29] Christinger HW, Fuh G, de Vos AM, Wiesmann C: The Crystal Structure of Placental Growth Factor in Complex with Domain 2 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1. *J Biol Chem* 2004, 279:10382-8.
- [30] Markovic-Mueller S, Stutfeld E, Asthana M, Weinert T, Bliven S, Goldie KN, Kisko K, Capitani G, Ballmer-Hofer K: Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracellular Domain in Complex with VEGF-A. *Structure* 50

2017, 25:341-52.

[31] Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen T-N, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH: Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine* 1998, 4:336-40.

[32] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Med* 1999, 5:623-8.

[33] Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller G-A, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N: VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999, 126:1149-59.

[34] Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N: Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000, 60:6253-8.

[35] Lissbrant IF, Hammarsten P, Lissbrant E, Ferrara N, Rudolfsson SH, Bergh A: Neutralizing VEGF bioactivity with a soluble chimeric VEGF-receptor protein flt(1-3) IgG inhibits testosterone-stimulated prostate growth in castrated mice. *Prostate* 2004, 58:57-65.

[36] Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT: Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol* 2001, 75:9828-35.

[37] Kim ES, Serur A, Huang J, Manley CA, McCrudden KW, Frischer JS, Soffer SZ, Ring L, New T, Zabski S, Rudge JS, Holash J, Yancopoulos GD, Kandel JJ, Yamashiro DJ: Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:11399-404.

[38] Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992, 267:26031-7.

[39] Malyala P, Singh M: Endotoxin limits in formulations for preclinical research.

10

20

30

40

50

- J Pharm Sci 2008, 97:2041-4.
- [40] Shibuya M: VEGFR and type-V RTK activation and signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013, 5:a009092.
- [41] Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N: Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. J Biol Chem 1994, 269:25646-54. 10
- [42] Brozzo MS, Bjelic S, Kisko K, Schleier T, Leppanen VM, Alitalo K, Winkler FK, Ballmer-Hofer K: Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. Blood 2012, 119:1781-8.
- [43] Kwak N, Okamoto N, Wood JM, Campochiaro PA: VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000, 41:3158-64. 20
- [44] Saishin Y, Takahashi K, Lima e Silva R, Hylton D, Rudge JS, Wiegand SJ, Campochiaro PA: VEGF-TRAP(R1R2) suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. J Cell Physiol 2003, 195:241-8.
- [45] Campa C, Kasman I, Ye W, Lee WP, Fuh G, Ferrara N: Effects of an anti-VEGF-A monoclonal antibody on laser-induced choroidal neovascularization in mice: optimizing methods to quantify vascular changes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008, 49:1178-83. 30
- [46] Bogdanovich S, Kim Y, Mizutani T, Yasuma R, Tudisco L, Cicatiello V, Bastos-Carvalho A, Kerur N, Hirano Y, Baffi JZ, Tarallo V, Li S, Yasuma T, Arpitha P, Fowler BJ, Wright CB, Apicella I, Greco A, Brunetti A, Ruvo M, Sandomenico A, Nozaki M, Ijima R, Kaneko H, Ogura Y, Terasaki H, Ambati BK, Leusen JH, Langdon WY, Clark MR, Armour KL, Bruhns P, Verbeek JS, Gelfand BD, De Falco S, Ambati J: Human IgG1 antibodies suppress angiogenesis in a target-independent manner. Signal Transduct Target Ther 2016, 1. 40
- [47] Silva RLE, Kanan Y, Mirando AC, Kim J, Shmueli RB, Lorenc VE, Fortmann SD, Sciama J, Pandey NB, Green JJ, Popel AS, Campochiaro PA: Tyrosine kinase blocking collagen IV-derived peptide suppresses ocular neo 50

- vascularization and vascular leakage. *Sci Transl Med* 2017, 9.
- [48] Lee JE, Kim C, Yang H, Park I, Oh N, Hua S, Jeong H, An HJ, Kim SC, Lee GM, Koh GY, Kim HM: Novel glycosylated VEGF decoy receptor fusion protein, VEGF-Grab, efficiently suppresses tumor angiogenesis and progression. *Mol Cancer Ther* 2015, 14:470-9.
- [49] Park M, Lee ST: The fourth immunoglobulin-like loop in the extracellular domain of FLT-1, a VEGF receptor, includes a major heparin-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 264:730-4. 10
- [50] Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C: VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003, 161:1163-77.
- [51] Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR: Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *Journal of Experimental Medicine* 1991, 174:1275-8. 20
- [52] Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W: Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992, 359:845-8. 30
- [53] Qu H, Nagy JA, Senger DR, Dvorak HF, Dvorak AM: Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1995, 43:381-9.
- [54] Yang D, Singh A, Wu H, Kroe-Barrett R: Comparison of biosensor platforms in the evaluation of high affinity antibody-antigen binding kinetics. *Anal Biochem* 2016, 508:78-96. 40
- [55] Yang J, Wang X, Fuh G, Yu L, Wakshull E, Khosravi M, Day ES, Demeule B, Liu J, Shire SJ, Ferrara N, Yadav S: Comparison of binding characteristics and in vitro activities of three inhibitors of vascular endothelial growth factor a. *Mol Pharm* 2014 50

- , 11:3421-30.
- [56] Gerber HP, Wu X, Yu L, Weissman C, Liang XH, Lee CV, Fuh G, Olsson C, Damico L, Xie D, Meng YG, Gutierrez J, Corpuz R, Li B, Hall L, Rangel L, Ferrando R, Lowman H, Peale F, Ferrara N: Mice expressing a humanized form of VEGF-A may provide insights into safety and efficacy of anti-VEGF antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104:3478-83.
- [57] Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhardt C, Roost H, Aguet M, Hengartner H, Zinkernagel RM: The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 1997, 276:2024-7. 10
- [58] Morin J, Luu TM, Superstein R, Ospina LH, Lefebvre F, Simard MN, Shah V, Shah PS, Kelly EN, Canadian Neonatal Network I: Neurodevelopmental Outcomes Following Bevacizumab Injections for Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics* 2016, 137. 20
- [59] Sankar MJ, Sankar J, Chandra P: Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs for treatment of retinopathy of prematurity. *Cochrane Database Syst Rev* 2018, 1:CD009734.
- [60] Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G: Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272:10382-8. 30
- [61] Roberts CJ: Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol* 2014, 32:372-80.
- [62] Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I: Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immunotoxicol* 2014, 11:99-109. 40
- [63] Yu L, Wu X, Cheng Z, Lee CV, Lecouter J, Campa C, Fuh G, Lowman H, Ferrara N: Interaction between Bevacizumab and Murine VEGF-A: A Reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49:522-7.
- [64] Xin H, Zhong C, Nudleman E, Ferrara N: Evidence for Pro-angiogenic Functions of VEGF-Ax. *Cell* 2016, 167:275-84 e6.
- [65] Lambert V, Lecomte J, Hansen S, Blacher 50

- S, Gonzalez ML, Struman I, Sounni NE, Rozet E, de Tullio P, Foidart JM, Rakic JM, Noel A: Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nat Protoc* 2013, 8: 2197-2111.
- [66] Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, Foley E, Smith RG, Schaeffer JM: Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* 1997, 276: 1706-9. 10
- [67] Chen J, Connor KM, Aderman CM, Smith LE: Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest* 2008, 118: 526-33.
- [68] Gardiner TA, Gibson DS, de Gooyer TE, de la Cruz VF, McDonald DM, Stitt AW: Inhibition of tumor necrosis factor- α improves physiological angiogenesis and reduces pathological neovascularization in ischemic retinopathy. *Am J Pathol* 2005, 166: 637-44. 20
- [69] Chen J, Connor KM, Aderman CM, Willett KL, Aspegren OP, Smith LE: Suppression of retinal neovascularization by erythropoietin siRNA in a mouse model of proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009, 50: 1329-35.
- [70] Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE: Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 1995, 92: 10457-61 issn: 0027-8424. 30
- [71] Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR: Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nature Medicine* 1999, 5: 1390-5. 40
- [72] Lange C, Ehlken C, Martin G, Konzok K, Moscoso Del Prado J, Hansen LL, Agostini HT: Intravitreal injection of the heparin analog 5-amino-2-naphthalenesulfonate reduces retinal neovascularization in mice. *Exp Eye Res* 2007, 85: 323-7.
- [73] Xiao S, Bucher F, Wu Y, Rokem A, Lee CS, 50

Marra KV, Fallon R, Diaz-Aguilar S, Aguilar E, Friedlander M, Lee AY: Fully automated, deep learning segmentation of oxygen-induced retinopathy images. JCI Insight 2017, 2.

【図面】

【図 1】

VEGF阻害剤の構造

【図 2 A】

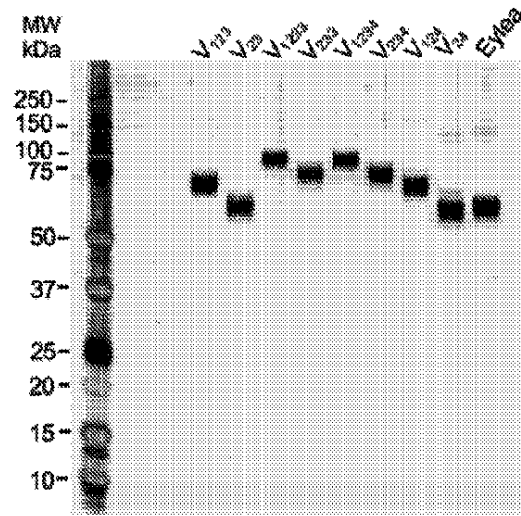
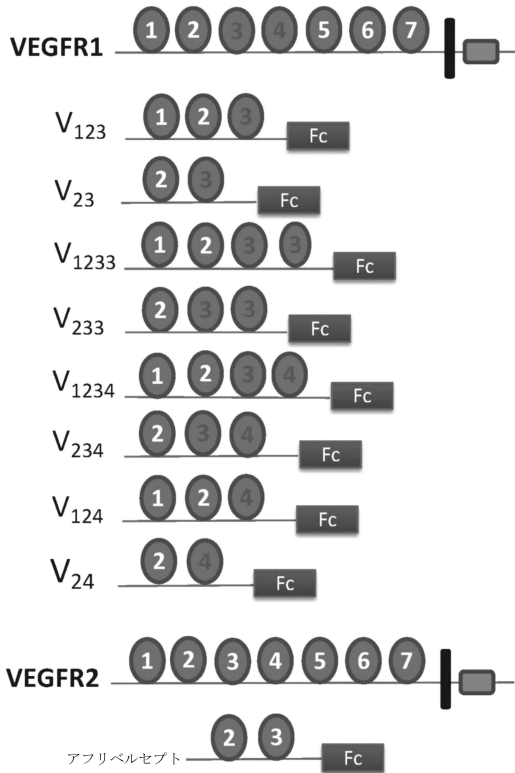


FIGURE 2A

10

20

30

40

50

【 2 B 】

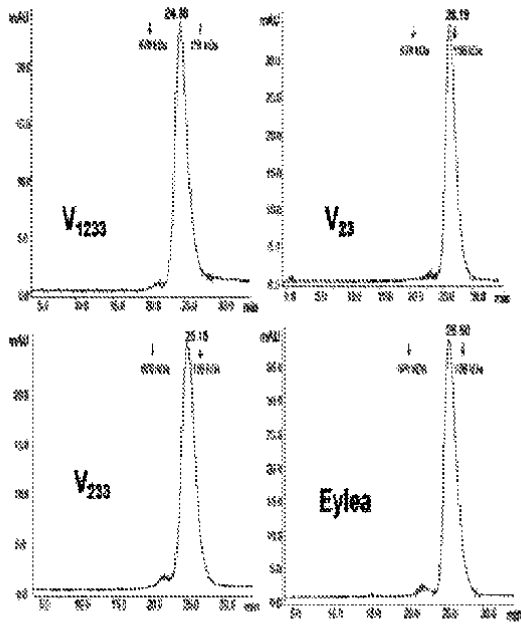
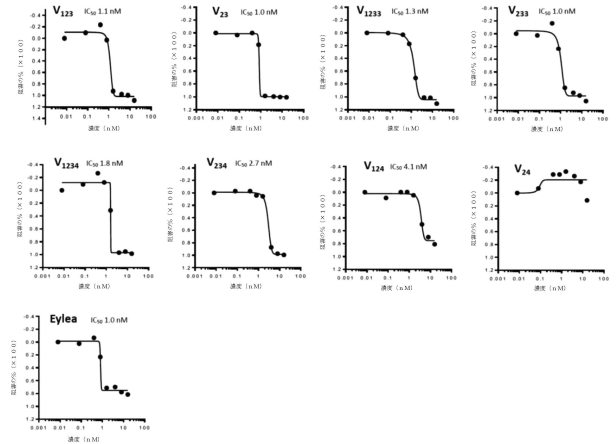


FIGURE 2B

【 3 】

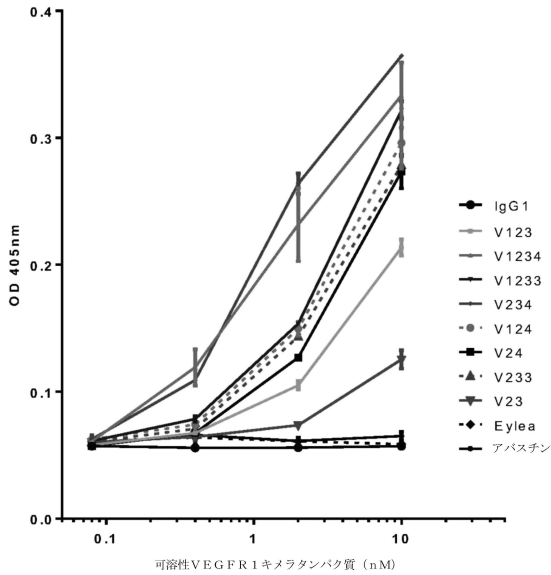


10

20

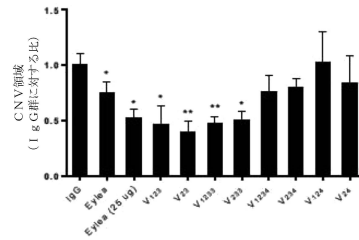
【 4 】

ウシの硝子体への結合



***p<0.01; **p<0.05

【 5 A 】

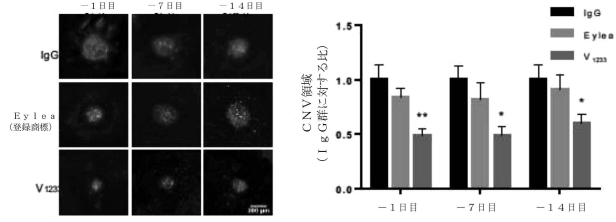


30

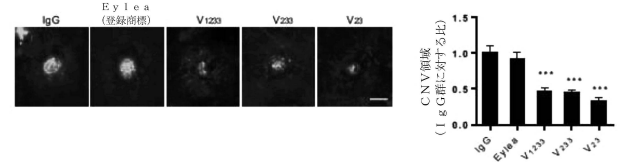
40

50

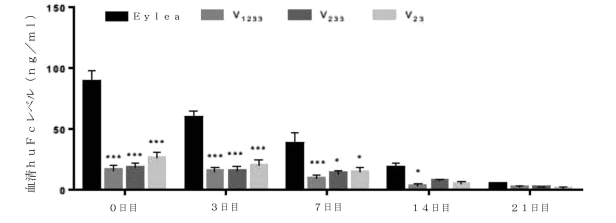
【 5 B 】



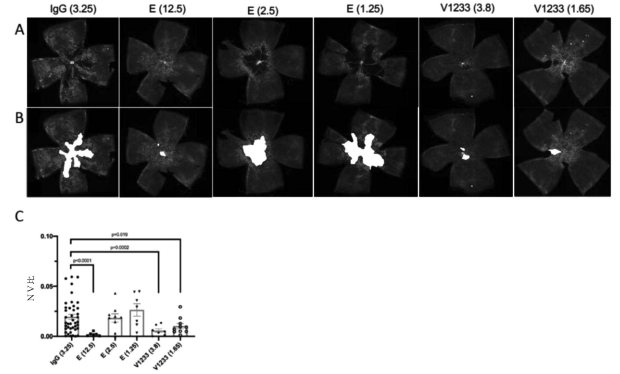
【 5 C 】



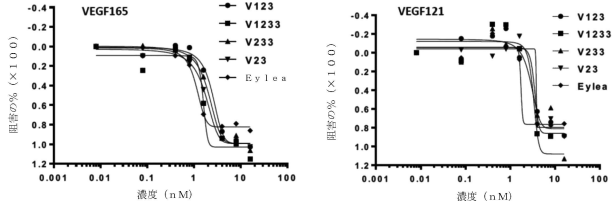
【 5 D 】



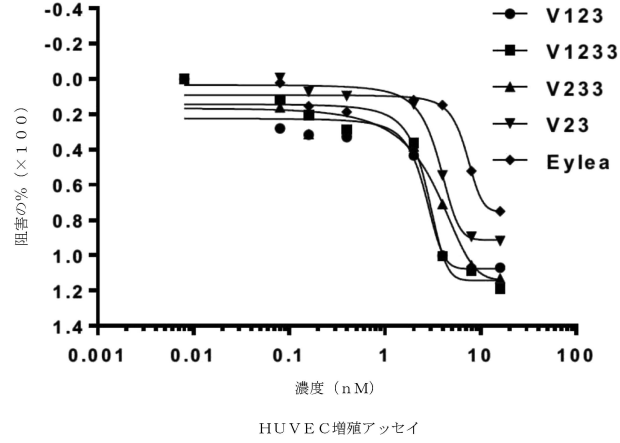
【 6 A - C 】



【 7 】



【 8 】



10

20

30

40

50

【 図 9 】

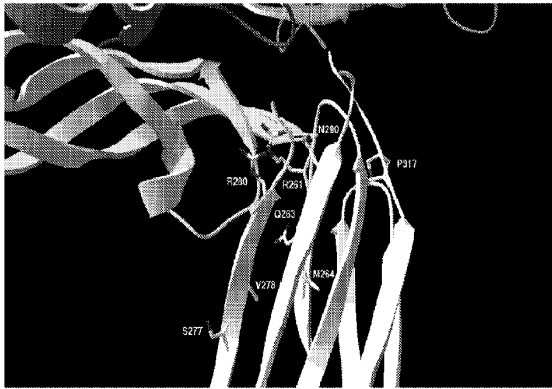
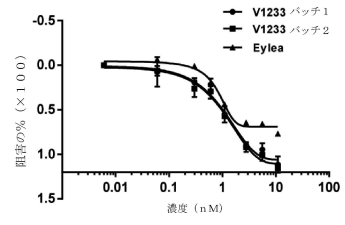


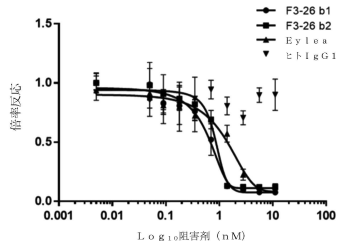
FIGURE 9

【 図 10 】

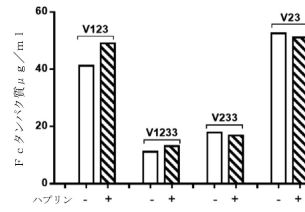


10

【 図 11 】



【 図 12 】



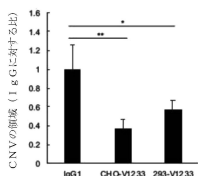
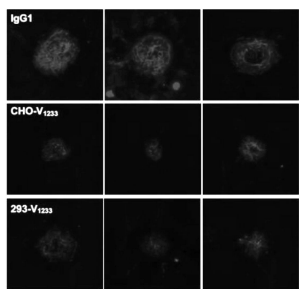
20

30

40

50

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

V₁₂₃

アミノ酸配列

```
MVSYWD TGVL CALL SCLL LFGSSSGS KLKD PELS LKST QHMQAGOT LHL QCRGEAAH KWSL PEMYS
KE SERLS ITKSACGRNGKFCST LNLTAQANHTG FYSCKYLA VPTS KKKTESA YIFISDTGRFV
EMYS E IPEI IHMTEGRELVIPCRVTSNITV LKPFLLD LIDBGRK I IWSRKGFI ISNATYK EIGL
LTC EATVNGHLYKTNL YLHRQTNT I I DVQIS TFRPVK LRGHTLV LNLCTAT P L NTRVQMTWSY PDK
NKRASVRRRI DQSN SHANI FYSVLITDKMQNDKGLYTCRVRSS GFSEKSVNTSVH IYDKVQISTP RP
PAPELLGSPVLFPPKPKD LMI SRPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYN
TYRVVSVLTVLHQDWLNGEKYKCKVSNKALPAIEKTIKSAKGQPRPOVYLPSSREMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDI IAVEVSNQGQ PENNYKTT PVLVDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNH
YTQKLSLSIPGK
```

核酸配列

```
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTCACAGGATC
TAGTTCAGGTTCAAATAAAGATCCTGAACCTGAGTTTAAAAGCCACCCAGCATGCAAGCAG
GCCAGACACTGCATCCCAATCGAGGGGGGAAGCACCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGGT
AAGGAAAGCGAAGGCTGACGACTAACTAAATCTGCTGTGAAAGAAATGGCAAAACATTCGCACTG
TTTAACTTGAACACAGCTCAAGCAAAACACACTGGCTTCTACAGCTGCAAAATCTAGCTGTACTA
CTTCAAGAAGAAAGAAACAGAACTCTGCAATCTATATATATAGTGATACAGGCTGTTTGGTA
GAGATGTACAGTGAAATCCCGAAATTTATACACATGACTGAAGGAAGGAGCTGTGCTCATTCCTGCGG
GGTTCATGCACCTAACTACTGTTACTTTAAAAGAGTTTCCACTTGAACACTTGTATCCCTGATGGAA
AAACGCAATACTGCGGACAGTAGAAGGGCTTCACTATCAAAATGCAAGCTACAAAGAAATAGGGCTT
CTGACTGTGAAGCAACAGCTCAATGGGCAITTTGATAAGACAAACTATCTCACACATCGCAAAACCAA
TACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCAAGCCAGTCAAACTTACTTAGAGGCATACCTCTGTCC
TCAATTTGACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTCAAATGACTGGAGTTACCTGTGATGAAAA
AATAAGAGAGCTTCCGTAAAGCGAGAAATGACCAAGCAATCCCATGCAACATATTTCTACAGTGT
TCTTACTTGTGACAAAATGACAGCAAGAGCAAGGACTTTATACTTGTGCTGTAAGGAGTGGACCAT
CATTCAAACTGTAAACACTCAGTGCATATATATGATAAAGCAAAACTACACATGCCACCGCCACGTC
CCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCTGCTGCTTCTCTTCCGCCCAAAAACCAAGGACACCTGAT
GATCTCCGGACCCCTGAGGTCACTGCTGTGTTGGAGCTGAGCCAGGAAGCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGTTACTGGACGGCGTGGAGGTGCAATAAGCAAGACAAAGCCGCGGGAAGCAGTCAAC
AGCAGTACCGTGTGTGACGCTCCTCACCGTCTGACACAGGACTGCTGAAATGGCAAGGATACAA
GTGCAAGGCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCTCCATGCAAGAAACCTCTCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAAGCAACAGGTGACACCTGCCCCCTCCCGGAGGAGTACCAAGAAACAGGTGACGCTG
ACTGCTGTGTAAGGCTTCTATCCAGCAGCATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGACCGGGA
GAACAACTACAAGCACGCTCCGCTGCTGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTTACAGCAAGCTCA
CCGTGACAGAGCAGGTGGACAGGGGAAGCTTCTCATGCTCGCTGATGACGAGGCTCTGCA
AACACCTACAGCGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
```

イタリック体の灰色: シグナルペプチド、黄色: 1g 様ドメイン1、青色: 免疫グロブリン様ドメイン2

灰色: 1g 様ドメイン3、下線付き黒色: ヒト1gG1-Fc断片

10

20

【 図 1 5 】

V₂₃

アミノ酸配列

```
MVSYWD TGVL CALL SCLL LFGSSSGI FISDTGR FVEMYS E IPEI IHMTEGRELVIPCRVTSNITV
LTKKFLDLT LIDBGRK I IWSRKGFI ISNATYK EIGL LICEATVNGHLYKTNL YLHRQTNT I I DVQIS
TFRPVK LRGHTLV LNLCTAT P L NTRVQMTWSY PDKNKRASVRRRI DQSN SHANI FYSVLITDKMQN
KDKGLYTCRVRSS GFSEKSVNTSVH IYDKVQISTP RP PAPELLGSPVLFPPKPKD LMI SRPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYN TYRVVSVLTVLHQDWLNGEKYKCKVSNKAL
PAIEKTIKSAKGQPRPEQVYLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI IAVEVSNQGQ PENNYKTT P
VLVDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNH YTKLSLSIPGK
```

核酸配列

```
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTCACAGGATC
TAGTTCAGGTTCAAATAAAGATCCTGAACCTGAGTTTAAAAGCCACCCAGCATGCAAGCAG
GCCAGACACTGCATCCCAATCGAGGGGGGAAGCACCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGGT
AAGGAAAGCGAAGGCTGACGACTAACTAAATCTGCTGTGAAAGAAATGGCAAAACATTCGCACTG
TTTAACTTGAACACAGCTCAAGCAAAACACACTGGCTTCTACAGCTGCAAAATCTAGCTGTACTA
CTTCAAGAAGAAAGAAACAGAACTCTGCAATCTATATATATAGTGATACAGGCTGTTTGGTA
GAGATGTACAGTGAAATCCCGAAATTTATACACATGACTGAAGGAAGGAGCTGTGCTCATTCCTGCGG
GGTTCATGCACCTAACTACTGTTACTTTAAAAGAGTTTCCACTTGAACACTTGTATCCCTGATGGAA
AAACGCAATACTGCGGACAGTAGAAGGGCTTCACTATCAAAATGCAAGCTACAAAGAAATAGGGCTT
CTGACTGTGAAGCAACAGCTCAATGGGCAITTTGATAAGACAAACTATCTCACACATCGCAAAACCAA
TACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCAAGCCAGTCAAACTTACTTAGAGGCATACCTCTGTCC
TCAATTTGACTGCTACCACTCCCTTGAACAGGAGTTCAAATGACTGGAGTTACCTGTGATGAAAA
AATAAGAGAGCTTCCGTAAAGCGAGAAATGACCAAGCAATCCCATGCAACATATTTCTACAGTGT
TCTTACTTGTGACAAAATGACAGCAAGAGCAAGGACTTTATACTTGTGCTGTAAGGAGTGGACCAT
CAITCAAACTGTAAACACTCAGTGCATATATATGATAAAGCAAAACTACACATGCCACCGCCACGTC
CCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCTGCTGCTTCTCTTCCGCCCAAAAACCAAGGACACCTGAT
GGTGTCAATAAGCAAAAGCCGCGGGAAGGAGTACAAAGCAGCTGACAGTGTGCTGAGGCTTCTC
TCAGCTTCTGCAAGGACTGGCTGATGCAAGGAGTACAGTGCAGAGTCTGCAACACCACTACAGCAG
AAGAGCTTCCCGGTA
```

イタリック体の灰色: シグナルペプチド、青色: 1g 様ドメイン2、灰色: 1g 様ドメイン3

下線付き黒色: ヒト1gG1-Fc断片

【 図 1 6 】

V₁₂₃

アミノ酸配列

```
MVSYWD TGVL CALL SCLL LFGSSSGS KLKDPELS LKST QHMQAGOT LHL QCRGEAAH KWSL PEMYS
KESERLS ITKSACGRNGKFCST LNLTAQANHTG FYSCKYLA VPTS KKKTESA YIFISDTGRFV
EMYS E IPEI IHMTEGRELVIPCRVTSNITV LKPFLLD LIDBGRK I IWSRKGFI ISNATYK EIGL
LTC EATVNGHLYKTNL YLHRQTNT I I DVQIS TFRPVK LRGHTLV LNLCTAT P L NTRVQMTWSY PDK
NKRASVRRRI DQSN SHANI FYSVLITDKMQNDKGLYTCRVRSS GFSEKSVNTSVH IYDKVQISTP RP
PAPELLGSPVLFPPKPKD LMI SRPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQYN
TYRVVSVLTVLHQDWLNGEKYKCKVSNKALPAIEKTIKSAKGQPRPOVYLPSSREMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDI IAVEVSNQGQ PENNYKTT PVLVDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNH
YTQKLSLSIPGK
```

核酸配列

```
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTCACAGGATC
TAGTTCAGGTTCAAATAAAGATCCTGAACCTGAGTTTAAAAGCCACCCAGCATGCAAGCAG
GCCAGACACTGCATCCCAATCGAGGGGGGAAGCACCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGGT
AAGGAAAGCGAAGGCTGACGACTAACTAAATCTGCTGTGAAAGAAATGGCAAAACATTCGCACTG
TTTAACTTGAACACAGCTCAAGCAAAACACACTGGCTTCTACAGCTGCAAAATCTAGCTGTACTA
CTTCAAGAAGAAAGAAACAGAACTCTGCAATCTATATATATAGTGATACAGGCTGTTTGGTA
GAGATGTACAGTGAAATCCCGAAATTTATACACATGACTGAAGGAAGGAGCTGTGCTCATTCCTGCGG
GGTTCATGCACCTAACTACTGTTACTTTAAAAGAGTTTCCACTTGAACACTTGTATCCCTGATGGAA
AAACGCAATACTGCGGACAGTAGAAGGGCTTCACTATCAAAATGCAAGCTACAAAGAAATAGGGCTT
CTGACTGTGAAGCAACAGCTCAATGGGCAITTTGATAAGACAAACTATCTCACACATCGCAAAACCAA
TACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCAAGCCAGTCAAACTTACTTAGAGGCATACCTCTGTCC
TCAATTTGACTGCTACCACTCCCTTGAACAGGAGTTCAAATGACTGGAGTTACCTGTGATGAAAA
AATAAGAGAGCTTCCGTAAAGCGAGAAATGACCAAGCAATCCCATGCAACATATTTCTACAGTGT
TCTTACTTGTGACAAAATGACAGCAAGAGCAAGGACTTTATACTTGTGCTGTAAGGAGTGGACCAT
CAITCAAACTGTAAACACTCAGTGCATATATATGATAAAGCAAAACTACACATGCCACCGCCACGTC
CCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCTGCTGCTTCTCTTCCGCCCAAAAACCAAGGACACCTGAT
GGTGTCAATAAGCAAAAGCCGCGGGAAGGAGTACAAAGCAGCTGACAGTGTGCTGAGGCTTCTC
TCAGCTTCTGCAAGGACTGGCTGATGCAAGGAGTACAGTGCAGAGTCTGCAACACCACTACAGCAG
AAGAGCTTCCCGGTA
```

イタリック体の灰色: シグナルペプチド、黄色: 1g 様ドメイン1 青色: 1g 様ドメイン2

灰色: 1g 様ドメイン3、下線付き黒色: ヒト1gG1-Fc断片

30

40

50

【 図 1 7 】

V₂₃₃

アミノ酸配列

MVSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...

核酸配列

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...

イタリック体の灰色: シグナルペプチド、青色: 1g 様ドメイン2、灰色: 1g 様ドメイン3

下線付き黒: ヒト1gG1-Fc断片

【 図 1 8 】

V₁₂₃₄

アミノ酸配列

MVSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...

核酸配列

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...

イタリック体の灰色: シグナルペプチド、黄色: 1g 様ドメイン1 青色: 1g 様ドメイン2

灰色: 1g 様ドメイン3、グリーン: 1g 様ドメイン4、下線付き黒: ヒト1gG1-Fc断片

10

20

【 図 1 9 】

V₂₃₄

アミノ酸配列

MVSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...

核酸配列

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...

イタリック体の灰色: シグナルペプチド、青色: 1g 様ドメイン2、灰色: 1g 様ドメイン3、グリーン: 1g 様ドメイン4、

下線付き黒: ヒト1gG1-Fc断片

【 図 2 0 】

V₂₄

アミノ酸配列

MVSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...
MYSYDVTGVLVLCALLSCLLLTGSSSGFI...

核酸配列

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...
ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTC...

イタリック体の灰色: シグナルペプチド、青色: 1g 様ドメイン2、グリーン: 1g 様ドメイン4

下線付き黒: ヒト1gG1-Fc断片

30

40

50

【 配列表 】

202350250100001.app

【手続補正書】

【提出日】令和4年9月2日(2022.9.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

Fc-IgGに作動可能に連結されたVEGF結合部分を含む、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に関連する眼の障害を治療するための薬学的組成物であって、前記VEGF結合部分が、VEGFR-1のIgG様ドメイン2である少なくとも1つのVEGF結合ドメインを含み、(a)第1の治療有効量の薬学的組成物が、対象に硝子体内投与され、第2の治療有効量の薬学的組成物が、前記対象に硝子体内投与される、及び(b)前記第1の治療有効量の薬学的組成物が硝子体内投与された10~30週間後に、前記第2の治療有効量の薬学的組成物が、前記対象に硝子体内投与される、方法。

【請求項2】

前記第2の治療有効量の薬学的組成物が、前記第1の治療有効量の薬学的組成物が投与された16~24週間後に硝子体内投与される、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項3】

前記治療有効量の前記薬学的組成物の後続投与が、10~30週間隔で、少なくとも1年間、硝子体内投与される、請求項1又は2記載の薬学的組成物。

【請求項4】

前記薬学的組成物が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合能力を有する、請求項1~3のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記薬学的組成物が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合VEGF刺激内皮細胞増殖阻害能力を有する、請求項1~4のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項6】

前記薬学的組成物が、アフリベルセプトよりも優れたVEGF刺激有糸分裂誘発阻害能力を有する、請求項1~5のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項7】

前記VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン1、2、および3(V₁₋₂₋₃)からなる、請求項1~6のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項8】

前記VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン2および3(V₂₋₃)からなる、請求項1~6のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項9】

前記薬学的組成物が、配列番号3のアミノ酸27~459を含む、請求項8に記載の薬学的組成物。

【請求項10】

前記VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン1、2、3および3(V₁₋₂₋₃₋₃)からなる、請求項1~6のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項11】

前記VEGF結合部分が、本質的にVEGFR-1のIgG様ドメイン2、3および3(V₂₋₃₋₃)からなる、請求項1~6のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項12】

前記第1の治療有効量の前記薬学的組成物が、約1~10mgである、請求項1~11のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項13】

10

20

30

40

50

前記第 1 の治療有効量の前記薬学的組成物が、約 3 ~ 6 m g である、請求項 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 4】

前記第 2 の治療有効量の前記薬学的組成物が、約 1 ~ 1 0 m g である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 5】

前記第 2 の治療有効量の前記薬学的組成物が、約 3 ~ 6 m g である、請求項 1 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 6】

前記 V E G F に関連する眼の障害が、新生血管加齢性黄斑変性症、近視に続発する脈絡膜新生血管、増殖性糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、網膜静脈閉塞症などの網膜血管閉塞、眼の腫瘍、フォンヒッペル・リンダウ症候群、未熟児網膜症、またはポリープ状脈絡膜血管症である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 1 7】

前記 V E G F に関連する眼の障害が、新生血管加齢性黄斑変性症である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 8】

抗 V E G F 剤を含む、眼内新生血管を阻害するための薬学的組成物であって、F c - I g G に作動可能に連結された V E G F 結合部分を含み、前記 V E G F 結合部分が、V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 2 である少なくとも 1 つの V E G F 結合ドメインを含み、第 1 の治療有効量の前記薬学的組成物が対象に投与され、第 2 の治療有効量の前記薬学的組成物が、前記対象に硝子体内投与され、前記第 1 の治療有効量の前記薬学的組成物が硝子体内投与された 1 0 ~ 3 0 週間後に、前記第 2 の治療有効量の前記薬学的組成物が硝子体内投与される、薬学的組成物。

20

【請求項 1 9】

抗 V E G F 剤を含む、必要としている対象において V E G F に関連する虚血性血管性眼疾患を治療するための薬学的組成物であって、前記抗 V E G F 剤が、F c - I g G に作動可能に連結された V E G F 結合部分を含み、前記 V E G F 結合部分が、V E G F R - 1 の I g G 様ドメイン 2 である少なくとも 1 つの V E G F 結合ドメインを含む、薬学的組成物。

【請求項 2 0】

前記抗 V E G F 剤が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合能力を有する、請求項 1 9 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 2 1】

前記抗 V E G F 剤が、アフリベルセプトよりも優れた硝子体結合 V E G F 刺激内皮細胞増殖阻害能力を有する、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 2】

前記抗 V E G F 剤が、アフリベルセプトよりも優れた V E G F 刺激有糸分裂誘発阻害能力を有する、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/061519

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

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

a. forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/061519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/00; A61P 27/02; C07K 14/71; C07K 19/00 (2021.01)
CPC - A61K 38/00; A61K 38/179; A61P 27/02; C07K 2319/30 (2021.01)

10

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
see Search History document

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/147944 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 01 August 2019 (01.08.2019) entire document	1-15
A	US 2019/0194271 A1 (ALLGENESIS BIOTHERAPEUTICS INC.) 27 June 2019 (27.06.2019) entire document	1-15
A	WO 2013/082511 A1 (GENENTECH, INC. et al) 06 June 2013 (06.06.2013) entire document	1-15
A	US 2016/0032259 A1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (KAIST)) 04 February 2016 (04.02.2016) entire document	1-15
A	US 2017/0305996 A1 (KOREA PRIME PHARM CO., LTD.) 26 October 2017 (26.10.2017) entire document	1-15

20

30

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 29 January 2021	Date of mailing of the international search report 12 FEB 2021
------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------

40

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 0 7 K 14/71 (2006.01)	C 0 7 K 14/71	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 9 2 1 0 1 サンディエゴ フロント ストリート 5 5 0 ユ
ニット 1 1 0 3

F ターム (参考) 4C076 AA95 BB24 CC10 CC11 EE41 EE59 FF31
4C084 AA02 BA01 BA02 BA22 MA66 NA05 NA14 ZA331 ZA332 ZA361
ZA362 ZB261 ZB262
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA51 DA75 DA76 EA20
EA50