

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-540464

(P2023-540464A)

(43)公表日 令和5年9月25日(2023.9.25)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 6
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全60頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願2023-512663(P2023-512663)
 (86)(22)出願日 令和3年7月20日(2021.7.20)
 (85)翻訳文提出日 令和5年2月17日(2023.2.17)
 (86)国際出願番号 PCT/IB2021/000498
 (87)国際公開番号 WO2022/018516
 (87)国際公開日 令和4年1月27日(2022.1.27)
 (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,B

最終頁に続く

(71)出願人 523058788
 インスパイラル リミテッド
 中華人民共和国 ホンコン アドミラルティ クイーンズウェイ ナンバー 8 9 リッポー・センター・タワー・ツー 4階 ユニット 4 1 7
 (74)代理人 110003797
 弁理士法人清原国際特許事務所
 (72)発明者 シー, ジョンドン
 アメリカ合衆国 0 1 7 3 0 マサチューセッツ州 ベッドフォード ペイトリオッツ・パーク 1
 (72)発明者 チャオ, ウェイ
 アメリカ合衆国 0 2 1 1 0 マサチューセッツ州 ボストン ハイ・ストリート

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 眼疾患の処置のための組成物および方法

(57)【要約】

本発明は、眼疾患を処置するためのシステム、およびシステムを用いて眼疾患を処置する方法に関する。

【選択図】図1 B

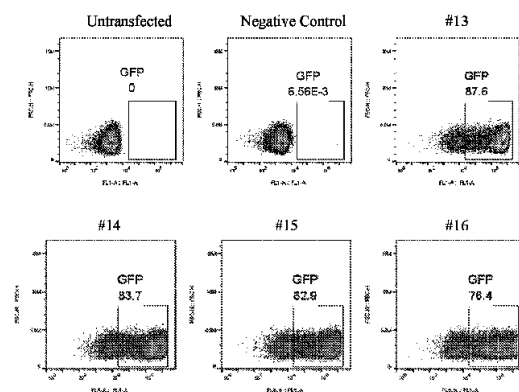


FIG. 1B

10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

医薬組成物であって、前記医薬組成物は、(i)第1のポリヌクレオチド、第1のシーケンスを操作しやすく含むこと、第1のプロモーターと別のシーケンスにリンクされた、操作しやすく、別のプロモーターにリンクされた、そこでは最初のシーケンスはアデノ随伴ウイルス(AAV)カプシド・タンパク質(そこで第2のシーケンスはAAVレプ・タンパク質をエンコードする)をエンコードします、および(ii)3番めのプロモーター(そこでは3番目のシーケンスは血管内皮細胞増殖因子(VEGF)阻害剤をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列を含む)に操作しやすくリンクされた3番めのシーケンスを含む別のポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

請求項1の組成物(そこではVEGF阻害剤は融合タンパク質である)またはそのVEGF抗体または、抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

請求項1または請求項2の組成物(そこではコドンにoptimizedされた核酸配列は配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする): SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: 4.

【請求項 4】

請求項1または請求項2の組成物(そこではコドンに最適化された核酸配列は配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする): SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: 12.

20

【請求項 5】

請求項3の組成物、そこで、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列: 1.

【請求項 6】

請求項5の組成物(そこではコドンに最適化された核酸配列は配列番号よりCpGジヌクレオチドの変更された数を含む): 13.

【請求項 7】

請求項6の組成物(そこではコドンに最適化された核酸配列は60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10または5つのCpGジヌクレオチド未満を含む)。

30

【請求項 8】

請求項7の組成物(そこではコドンに最適化された核酸配列はCpGジヌクレオチドを含まない)。

【請求項 9】

請求項1-8のうちのいずれかの組成物(そこでは3番目のシーケンスは配列番号のシーケンスを含む): SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: 18.

【請求項 10】

請求項1-9のうちのいずれかの組成物(そこでは第1のプロモーターと第2のプロモーターは昆虫細胞または哺乳動物細胞の発現のために適している)。

40

【請求項 11】

請求項10の組成物(そこでは昆虫細胞はSf9細胞である)。

【請求項 12】

請求項10の組成物(そこでは哺乳動物細胞はそれのHEK293細胞または派生的な細胞である)。

【請求項 13】

接着細胞は、分化細胞であることを特徴とする、請求項1に記載の組織構成物。

【請求項 14】

50

請求項 1 - 13 のうちのいずれかの組成物（そこでは第 1 のプロモーターまたは第 2 のプロモーターは p 10 プロモーターまたは p o l h プロモーターである）。

【請求項 15】

請求項 1 - 14 のうちのいずれかの組成物（そこでは 3 番目のプロモーターは C M V プロモーター、C A G プロモーター、M N D U 3 プロモーター、P G K プロモーター、E F 1 a プロモーターまたは眼の特有のプロモーターである）。

【請求項 16】

請求項 15 の組成物（そこでは R P E 65 遺伝子プロモーター、ヒト網膜の結合蛋白質遺伝子プロモーター、ネズミ科の 11 - c i s レチノイド・アルコール脱水素酵素遺伝子プロモーター、ロドプシン・プロモーター、r h o d o p o s i n キナーゼ・プロモーター、コラーゲン分解酵素阻害 3 プロモーター、光受容体レチノール結合蛋白質プロモーター、卵黄様黄斑ジストロフィ 2 プロモーターと光受容体間類網膜の結合蛋白質プロモーターから構成される群から眼に特有のプロモーターは選択される）。

10

【請求項 17】

請求項 1 - 16 のうちのいずれかの組成物（そこでは最初のシーケンス、第 2 のシーケンスまたは 3 番目のシーケンスの 3' 終了は、さらにポリ（A）シーケンスを含む）。

【請求項 18】

請求項 17 の組成物。（そこではポリ（1つの）シーケンスは h G H ポリ（1つの）、シミアンウイルス 40 ポリ（1つの）または - グロビン・ポリ（1つの）である）

【請求項 19】

請求項 1 - 18（そこでは第 2 のポリヌクレオチドはイントロンまたは調整する要素を含む）のうちのいずれかの組成物。

20

【請求項 20】

組成物の粘性は低い、ことを特徴とする請求項 108 に記載の組成物。

【請求項 21】

請求項 19 の組成物（そこでは調整する要素は T P L（アデノウイルスから三者間のリーダー配列）と e M L P（アデノウイルス・マヨール後期プロモーターからエンハンサーエレメント）シーケンスを含む）。

【請求項 22】

請求項 1 - 21（そこでは第 2 のポリヌクレオチドはコザック配列を含む）のうちのいずれかの組成物。

30

【請求項 23】

請求項 1 - 22（そこでは第 2 のポリヌクレオチドはヒト足場を付属の領域（S A R）シーケンスを含む）のうちのいずれかの組成物。

【請求項 24】

請求項 1 - 23（そこでは第 2 のポリヌクレオチドはさらにエンハンサーを含む）のうちのいずれかの組成物。

【請求項 25】

担体は薬学的に許容可能な担体である、ことを特徴とする請求項 113 に記載の組成物。

40

【請求項 26】

請求項 1 - 25 のうちのいずれかの組成物（そこでは第 2 のポリヌクレオチドはさらに充填材シーケンスを含む）。

【請求項 27】

請求項 1 - 26（そこでは第 2 のポリヌクレオチドは逆方向末端反復（I T R）シーケンスをさらに含む）のうちのいずれかの組成物。

【請求項 28】

個体はタモキシフェンに耐性がある、ことを特徴とする請求項 108 に記載の組成物。

【請求項 29】

請求項 1 - 28 のうちのいずれかの組成物（そこでは第 2 のポリヌクレオチドは付加的

50

な治療のタンパク質をエンコードする４番めのシーケンスをさらに含む）。

【請求項３０】

請求項２９の組成物（そこではＶＥＧＦ阻害剤、ＰＤＧＦ阻害剤、胎盤の成長因子阻害剤、インテグリン阻害剤、ｍＴＯＲ阻害剤、ａｎｇｉｏｐｏｉｅｔｉｎ阻害剤とＴＧＦ阻害作用薬から構成される群から付加的な治療のタンパク質は選択される）。

【請求項３１】

請求項３０の組成物（そこでは３番目のシーケンスと４番目のシーケンスはリンカーによる接続される）。

【請求項３２】

担体は薬学的に許容可能な担体である、ことを特徴とする請求項１１３に記載の組成物 10

【請求項３３】

前記ＴＡはペプチドである、ことを特徴とする請求項２４に記載のｍＴＡ。

【請求項３４】

細胞へ請求項１－３３のうちのいずれか１つの組成物をトランスフェクトすることにより調製された組み換えのアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）粒子。

【請求項３５】

請求項３４のｒＡＡＶ粒子（そこでは細胞は昆虫細胞または哺乳動物細胞である）。

【請求項３６】

接着細胞は、分化細胞であることを特徴とする、請求項１に記載の組織構成物。 20

【請求項３７】

請求項３５のｒＡＡＶ粒子（そこでは哺乳動物細胞はそのＨＥＫ２９３細胞または派生的な細胞である）。

【請求項３８】

接着細胞は、分化細胞であることを特徴とする、請求項１に記載の組織構成物。

【請求項３９】

配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化されたｎｕｃｌｅｏｉｃな辛辣なシーケンスを含むポリヌクレオチド：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４。

【請求項４０】

請求項３９のポリヌクレオチド、そこで、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：１。 30

【請求項４１】

請求項４０のポリヌクレオチド（そこではコドンに最適化された核酸配列は配列番号よりＣｐＧジヌクレオチドの変更された数を含む）：１３。

【請求項４２】

請求項４１のポリヌクレオチド（そこではコドンに最適化された核酸配列は６０、５５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０または５つのＣｐＧジヌクレオチド未滿を含む）。

【請求項４３】

請求項４２のポリヌクレオチド（そこではコドンに最適化された核酸配列はＣｐＧジヌクレオチドを含まない）。 40

【請求項４４】

請求項３９－４３のうちのいずれかのポリヌクレオチド（そこでは３番目のシーケンスは配列番号のシーケンスを含む）：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８。

【請求項４５】

さらにプロモーターを含む請求項３９－４４のうちのいずれかのポリヌクレオチド。

【請求項４６】

請求項４５のポリヌクレオチド（そこではプロモーターはＣＭＶプロモーター、ＣＡＧ 50

プロモーター、MNDU3プロモーター、PGKプロモーター、EF1aプロモーターまたは眼の特有のプロモーターである)。

【請求項47】

請求項46のポリヌクレオチド(そこではRPE65遺伝子プロモーター、ヒト網膜の結合蛋白質遺伝子プロモーター、ネズミ科の11-cisレチノイド・アルコール脱水素酵素遺伝子プロモーター、ロドプシン・プロモーター、rhodopopsinキナーゼ・プロモーター、コラーゲン分解酵素阻害3プロモーター、光受容体レチノール結合蛋白質プロモーター、卵黄様黄斑ジストロフィ2プロモーターと光受容体間網膜の結合蛋白質プロモーターから構成される群から眼に特有のプロモーターは選択される)。

【請求項48】

さらにポリ(A)シーケンスを含む請求項39-47のうちのいずれかのポリヌクレオチド。

【請求項49】

請求項48のポリヌクレオチド。(そこではポリ(1つの)シーケンスはhGHポリ(1つの)、シミアンウイルス40ポリ(1つの)または-グロビン・ポリ(1つの)である)

【請求項50】

イントロンまたは調整する要素をさらに含む請求項39-49のうちのいずれかのポリヌクレオチド。

【請求項51】

カバーは液体絆創膏を含む、ことを特徴とする請求項49に記載の方法。

【請求項52】

請求項50のポリヌクレオチド(そこでは調整する要素はTPL(アデノウイルスから三者間のリーダー配列)とeMLP(アデノウイルス・マヨール後期プロモーターからエンハンサーエレメント)シーケンスを含む)。

【請求項53】

さらにコザック配列を含む請求項39-52のうちのいずれかのポリヌクレオチド。

【請求項54】

請求項39-53のうちのいずれかのポリヌクレオチドを含む組み換えのアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子。

【請求項55】

細胞または細胞または対象の組織へ請求項1-33のうちのいずれかの組成物、請求項34-38および請求項54のうちのいずれかのrAAV粒子または請求項39-53のうちのいずれかのポリヌクレオチドを投与することを含む対象の組織のVEGF阻害剤を示す方法。

【請求項56】

対象に請求項1-33のうちのいずれかの治療上有効な量の組成物、請求項34-38および請求項54のうちのいずれかのrAAV粒子または請求項39-53のうちのいずれかのポリヌクレオチドを投与することを含むその必要性のある対象の眼疾患を処置する方法。

【請求項57】

請求項56の方法(そこではぬれた加齢黄斑変性症(滲出型AMD)、糖尿病性網膜症、糖尿病の黄斑の浮腫、増殖性糖尿病性網膜症と黄斑の浮腫から構成される群から目の疾患は選択される)。

【請求項58】

請求項1-33のうちのいずれかの組成物または請求項39-53のうちのいずれかのポリヌクレオチドを有する細胞を導入することを含む組み換えのアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 1 】

関連出願の相互参照

この出願は、2020年7月21日出願の中国特許出願第202010706658.X号（代理人明細書57837-709.711番）、および2020年7月21日出願の中国特許出願第202010706505.5号（代理人明細書57837-712.711番）、の利益を主張し、その全体の内容は参照によって本明細書に援用される。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

血管形成は、組織への血管の新生または成長を表す、または既存の毛細管または血管の一層の形成または成長、疾患および健康の重要な役割を果たします。病理学の目の血管形成または新血管新生が網膜、脈絡膜と角膜の生じる場合があります、重症の視力障害を引き起こす場合があります。眼血管形成は、ぬれた加齢黄斑変性症（滲出型AMD）、糖尿病性網膜症、黄斑の浮腫などを含む広範囲の疾患に関連しています。

10

【 0 0 0 3 】

血管形成関連の障害を処置するための多くの薬物が、抗VEGF抗体（Lucentisのような）または融合タンパク質（Eyleaのような）のような開発されています。しかしながら、頻繁に繰り返された注射剤はこれらの薬物の短い半減期により有効性を維持するように要求されます。従って、血管形成を標的とする新しい治療は、血管形成に関連する眼疾患の処置のために必要とされます。

【 0 0 0 4 】

20

配列表

本出願は配列表を包含しており、これは、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、その全体を引用することで本明細書に組み込まれる。2021年7月19日に作成されたASCIIのコピーは、57837-712__601__SLという名称であり、24,376バイトのサイズである。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 5 】

現在、血管形成に関連した眼疾患を有効に処置することができる組成物と方法を開発する芸術の必要性があります。

【 0 0 0 6 】

30

いくつかの態様では、本の開示は、第1のプロモーターに操作しやすくリンクされた第1のシーケンス、と別のプロモーターに操作しやすくリンクされた別のシーケンスを含む第1のポリヌクレオチドを含む組成物を提供します。そこでは最初のシーケンスはアデノ随伴ウイルス（AAV）カプシド・タンパク質（そこで第2のシーケンスはAAVレプ・タンパク質をエンコードする）、と3番めのプロモーター（そこでは3番目のシーケンスは血管内皮細胞増殖因子（VEGF）阻害剤をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列を含む）に操作しやすくリンクされた3番めのシーケンスを含む別のポリヌクレオチドをエンコードします。

【 0 0 0 7 】

いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、融合タンパク質、またはそのVEGF抗体または、抗原結合フラグメントです。いくつかの実施形態では、コドンにoptimizedされた核酸配列は、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードします：SEQ ID NO：SEQ ID NO：SEQ ID NO：4。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードします：SEQ ID NO：SEQ ID NO：SEQ ID NO：SEQ ID NO：SEQ ID NO：SEQ ID NO：SEQ ID NO：12。いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：1。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は、配列番号よりCpGジヌクレオチドの変更された数を含みます：13。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は60、55、5

40

50

0、45、40、35、30、25、20、15、10または5つのCpGジヌクレオチド未満を含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列はCpGジヌクレオチドを含みません。いくつかの実施形態では、3番目のシーケンスは、配列番号のシーケンスを含みます：SEQ ID NO：16。いくつかの実施形態では、第1のプロモーターと第2のプロモーターは昆虫細胞または哺乳動物細胞の発現のために適しています。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞はそれについてHEK293細胞または派生的な細胞です。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、第1のプロモーターまたは第2のプロモーターはp10プロモーターまたはpolhプロモーターです。いくつかの実施形態では、3番目のプロモーターは、CMVプロモーター、CAGプロモーター、MNDU3プロモーター、PGKプロモーター、EF1aプロモーターまたは眼の特有のプロモーターです。いくつかのembodimentsでは、眼に特有のプロモーターは、RPE 65遺伝子プロモーター、ヒト網膜の結合蛋白質遺伝子プロモーター、ネズミ科の11-cisレチノイド・アルコール脱水素酵素遺伝子プロモーター、ロドプシン・プロモーター、rhodopopsinキナーゼ・プロモーター、コラーゲン分解酵素阻害3プロモーター、光受容体レチノール結合蛋白質プロモーター、卵黄様黄斑ジストロフィ2プロモーターと光受容体間質網膜の結合蛋白質プロモーターから構成される群から選択されます。いくつかの実施形態では、最初のシーケンス、第2のシーケンスまたは3番目のシーケンスの3'終了は、さらにポリAシーケンスを含みます。いくつかの実施形態では、ポリAシーケンスは、hGHポリ(A)、シミアンウイルス40ポリ(A)または-グロビン・ポリ(A)です。いくつかの実施形態では、最初のシーケンスと第2のシーケンスはリンカーによる接続されます。幾つかの実施形態において、リンカーはペプチドリinkerである。幾つかの実施形態において、リンカーは環状構造を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは内部リボソーム導入部位(IRES)を含みます。いくつかの実施形態では、IRESは口蹄疫ウイルス(FMDV)からです。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドはイントロンまたは調整する要素を含みます。幾つかの実施形態では、組成物はリボソームを含む。いくつかの実施形態では、調整する要素はTPL(アデノウイルスから三者間のリーダー配列)とeMLP(アデノウイルス・マヨール後期プロモーターからエンハンサーエレメント)シーケンスを含みます。いくつかの実施形態において、第2のドメインはVHドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドはヒト足場を付属の領域(SAR)シーケンスを含みます。幾つかの実施形態において、第2癌処置はエポキシケトンを含む。幾つかの実施形態において、耳は中耳である。幾つかの実施形態において、第1化合物は更に別の第1化合物を含む。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドはさらに逆方向末端反復(ITR)シーケンスを含みます。いくつかの実施形態では、ITRシーケンスはAAV2 ITRです。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、付加的な治療のタンパク質をエンコードする4番目のシーケンスをさらに含みます。いくつかの実施形態では、付加的な治療のタンパク質は、VEGF阻害剤、PDGF阻害剤、胎盤の成長因子阻害剤、インテグリン阻害剤、mTOR阻害剤、angiopoietin阻害剤とTGF阻害作用薬から構成される群から選択されます。いくつかの実施形態では、3番目のシーケンスと4番目のシーケンスはリンカーによる接続されます。幾つかの実施形態において、リンカーはペプチドリinkerである。幾つかの実施形態において、リンカーは環状構造を含む。

【0008】

別の態様では、本の開示は、本明細書に開示されたポリヌクレオチドのうちのいかなるものまたは細胞へ本明細書に開示された組成物のいずれかでも導入することにより調製された組み換えのアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子を提供します。いくつかの実施形態では、細胞は昆虫細胞または哺乳動物細胞です。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞はそれについてHEK293細胞または派生的な細胞です。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

別の態様では、本の開示は、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された *n u c l e o i c* な辛辣なシーケンスを含むポリヌクレオチドを提供します： *S E Q I D N O : S E Q I D N O : S E Q I D N O : 4* . いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列： 1 . いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は、配列番号より *C p G* ジヌクレオチドの変更された数を含みます： 1 3 . いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は 6 0、5 5、5 0、4 5、4 0、3 5、3 0、2 5、2 0、1 5、1 0 または 5 つの *C p G* ジヌクレオチド未満を含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は *C p G* ジヌクレオチドを含みません。いくつかの実施形態では、3 番目のシーケンスは、配列番号のシーケンスを含みます： *S E Q I D N O : S E Q I D N O : 1 6* . いくつかの実施形態では、装置はさらに制御装置を含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは、*C M V* プロモーター、*C A G* プロモーター、*M N D U 3* プロモーター、*P G K* プロモーター、*E F 1 a* プロモーターまたは眼の特有のプロモーターです。いくつかの実施形態では、眼に特有のプロモーターは、*R P E 6 5* 遺伝子プロモーター、ヒト網膜の結合蛋白質遺伝子プロモーター、ネズミ科の *1 1 - c i s* レチノイド・アルコール脱水素酵素遺伝子プロモーター、ロドプシン・プロモーター、*r h o d o p o s i n* キナーゼ・プロモーター、コラーゲン分解酵素阻害 3 プロモーター、光受容体レチノール結合蛋白質プロモーター、卵黄様黄斑ジストロフィ 2 プロモーターと光受容体間質網膜の結合蛋白質プロモーターから構成される群から選択されます。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはさらにポリ A シーケンスを含みます。いくつかの実施形態では、ポリ A シーケンスは、*h G H* ポリ (A)、シミアンウイルス 4 0 ポリ (A) または - グロビン・ポリ (A) です。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはさらにイントロンまたは調整する要素を含みます。幾つかの実施形態では、組成物はリポソームを含む。いくつかの実施形態では、調整する要素は *T P L* (アデノウイルスから三者間のリーダー配列) と *e M L P* (アデノウイルス・マヨール後期プロモーターからエンハンサーエレメント) シーケンスを含みます。いくつかの実施形態では、ヒドロゲルはさらに造影剤を含む。

【 0 0 1 0 】

別の態様では、本の開示は、本明細書に開示されたポリヌクレオチドのうちのいかなるものでも含む組み換えのアデノ随伴ウイルス (*r A A V*) 粒子を提供します。

【 0 0 1 1 】

別の態様では、本の開示は、細胞、細胞へ投与することを含む対象の組織、*r A A V* 粒子のうちのいかなるものでも本明細書に開示した対象の組織または本明細書に開示されたポリヌクレオチドのいずれかの *V E G F* 阻害剤を示す方法を提供します。

【 0 0 1 2 】

別の態様では、本の開示は、*r A A V* 粒子のうちの治療上有効な量のいかなるものでも本明細書に開示した対象または本明細書に開示されたポリヌクレオチドのいずれかに投与することを含むその必要性のある対象の眼疾患を処置する方法を提供します。いくつかの実施形態では、目の疾患は、ぬれた加齢黄斑変性症 (滲出型 *A M D*)、糖尿病性網膜症、糖尿病の黄斑の浮腫、増殖性糖尿病性網膜症と黄斑の浮腫から構成される群から選択されます。

【 0 0 1 3 】

別の態様では、本の開示は、本明細書に開示された組成物のうちのいかなるものを有するも細胞を導入するまたは本明細書に開示されたポリヌクレオチドのうちのいかなるものを有するも導入するを含む組み換えのアデノ随伴ウイルス (*r A A V*) 粒子を調製する方法を提供します。いくつかの実施形態における、細胞における本明細書に開示されたポリヌクレオチドのうちのいかなるものでも示すことを含む方法。幾つかの実施形態において、宿主細胞は原核細胞又は真核細胞である。幾つかの実施形態において、細胞は分裂細胞である。幾つかの実施形態において、宿主細胞は原核細胞又は真核細胞である。幾つかの

実施形態において、細胞は分裂細胞である。いくつかの実施形態では、方法は b a c m i d DNA および / またはバキュロウィルスを生成することを含みます。いくつかの実施形態では、方法は V E G F 阻害剤発現シーケンス (本明細書に開示されたポリヌクレオチドのような) を含む b a c m i d DNA を生成することを含みます。いくつかの実施形態では、方法は b a c m i d DNA r A A V キャップ・レブ発現シーケンスを生成することを含みます。いくつかの実施形態では、方法は、バキュロウィルスを生成するために b a c m i d DNA を有する細胞をトランスフェクトすることを含みます。いくつかの実施形態では、方法はバキュロウィルスを生成するために V E G F 阻害剤発現シーケンスを含む b a c m i d DNA を有する細胞をトランスフェクトすることを含みます。いくつかの実施形態では、方法は、r A A V キャップ・レブ発現シーケンスを含むバキュロウィルスを生成するために b a c m i d DNA を有する細胞をトランスフェクトすることを含みます。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に開示された、パッケージにされた r A A V / V E G F 阻害剤ウイルス粒子を得るために細胞 (S f 9 細胞のような) を感染させるためにバキュロウィルスを混合することをさらに含みます。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

参照による援用

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも個々の刊行物、特許、または特許出願がそれぞれ参照により本明細書に具体的かつ個別に引用されるのと同じ程度にまで、参照により本明細書に引用される。引用により組み込まれる刊行物および特許または特許出願が、本明細書に含まれる開示に矛盾する程度にまで、本明細書は、そのような矛盾のある題材に取って代わる、および / または、それに先行するように意図される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 5 】

本発明の新規な特徴は、とりわけ添付の特許請求の範囲とともに説明される。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される例示的实施形態を示す以下の詳細な説明、および添付の図面 (本明細書では「図面」および「図」ともいう) を参照することによって得られるだろう。

【 0 0 1 6 】

【 図 1 A 】 1 A は、2 9 3 T 細胞における第 2 のポリヌクレオチド・コード化 G F P のトランスフェクションの 4 8 時間後に緑の蛍光性のタンパク質 (G F P) の発現を示す蛍光画像を説明します。

【 図 1 B 】 1 B は、トランスフェクションの 4 8 時間後に細胞を示す G F P のパーセンテージを示すフローサイトメトリ結果を説明します。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 7 】

本発明の好ましい実施形態が本明細書に示され記載されてきたが、こうした実施形態はほんの一例として提供されることは当業者にとって明白である。当業者は発明から外れずに、多くの変異、変化と置換について考えることができます。本明細書に記載される本発明の実施形態の様々な代案が、利用されることもあることを理解されたい。

【 0 0 1 8 】

もし他の方法で述べられなかったならば、本明細書に開示されたいくつかの実施形態の実行は免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクスと組換え DNA の従来技術を使用します。例えば、Sambrook and Green, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th Edition (2012); the series Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds.); the series Methods In Enzymology (Academic Press, Inc.), PC 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G.

R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6th Edition (R. I. Freshney, ed. (2010)).
【0019】

定義

本明細書及び特許請求の範囲で用いられるように、「a」、「an」、及び「the」は、内容が他に明確に示していない限り、複数の参照を含む。例えば、用語「immunoadactivator」は1つ以上の免疫の賦活物質を含みます。

10

【0020】

用語「約 (about)」または「およそ (approximately)」は、当業者によって決定されるような特定の値の許容可能な誤差範囲内であることを意味し、これは、その値がどのように測定または決定されるか、例えば測定システムの限界に部分的に左右される。芸術の実行に応じて、例えば、「に関して」ある以上の標準偏差内に示されるかもしれません。代替的に、「約」とは所定の値の最大で20%、最大で10%、最大で5%、または最大で1%の範囲内を意味し得る。または、特に、生物系または手順のために、用語は、2倍以内に好ましくは5倍以内に、値の桁をより好ましくは意味するかもしれません。特有の値が適用およびクレームの記載された場合、もし他の方法で述べられなかったならば、それは仮定されるべきです、特有の値の許容可能な誤差範囲内の方法「に関する」用語。

20

【0021】

本明細書に用いられるような用語「処置」は、個体における疾患の処置の自然経過を変更する試みを表し、臨床病理学の間に予防またはインプリメンテーションの臨床の介在かもしれません。希望の治療効果は含むが、その疾患の発生または再発を防ぐ、症状を和らげる、その疾患のいかなる直接か間接の病理学の結果も低減する、転移を防ぐ、疾患進行の速度を遅くする、改善する、あるいは疾患状態および/またはより良くする予後の低減に限定的ではありません。

【0022】

本明細書に用いられるように、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」と「タンパク質」は、あらゆる長さのアミノ酸ポリマーを参照するために交換可能に本明細書に用いられます。ポリマーは線状かもしれないか、あるいは環状か、分岐しました。それは修正済のアミノ酸を含んでいるかもしれません。そして、それは非アミノ酸による中断されるかもしれません。用語は、またラベルが付けられた構成要素を有する接合などの硫酸化、グリコシレーション、lipidation、アセチル化、リン酸化、ヨウ素化、メチル化、酸化、タンパク質分解の治療、リン酸化、isoprenylation、ラセミ化、セレン化、タンパク質（例えばアルギニン）へのアミノ酸の転移RNAを媒介とした付加、ubiquitinationまたは他の操作によるような、修飾されたアミノ酸ポリマーを含みます。本明細書に用いられるように、用語「アミノ酸」は参照します、に、自然でおよび/または不自然か、合成の、アミノ酸類似体およびpeptidomimeticsと同様にグリシンとDまたはLの光学異性体を含むアミノ酸。指定されたタンパク質から「誘導した」ポリペプチドまたはアミノ酸配列順序は、ポリペプチドの起源を表します。むしろ、ポリペプチドはアミノ酸配列順序を実質的にシーケンスの中でエンコードされたポリペプチド、またはその部分のアミノ酸配列順序と同様にしています、部分は、どこで少なくとも10-20のアミノ酸または少なくとも20-30のアミノ酸から構成されるか、または少なくとも30-50のアミノ酸、または、それは、シーケンスの中でエンコードされたポリペプチドに免疫学的に同一視することができます。用語は、また指定された核酸配列から発現されたポリペプチドを含みます。本明細書に用いられるように、用語「領域」はタンパク質またはペプチドの他の部分と物理的にまたは機能的に識別されるタンパク質の一部を表します。物理的に定義された領域は、それらの膜結合型のシーケ

30

40

50

ンスまたは細胞質の境界のシーケンスなどのまさに疎水性のシーケンスまたは親水性アミノ酸シーケンスを含みます。領域も例えば遺伝子複製による引き起こされた内部相同による定義することができます。機能的に定義された領域には異なる生物学的機能があります。例えば、抗原束縛領域は、抗原に結合する抗原を拘束力のある単位または抗体の部分を表します。連続するアミノ酸配列順序による機能的に定義された領域をエンコードする必要はありません。そして、機能的に定義された領域は 1 つ以上の物理的に定義された領域を含んでいるかもしれません。

【 0 0 2 3 】

本明細書に用いられるように、用語「アミノ酸」は、アミノ酸類似体および *p e p t i d o m i m e t i c s* を含み、これらに限定されずにも D または L の光学異性体を含み、これらに限定されずにも、生まれつきの名人および / または不自然か合成アミノ酸を表します。標準の 1 つのレターまたは 3 - レター・コードはアミノ酸を参照するために用いられます。このコンテキストでは、アミノ酸は、当技術で既知のあるレターと 3 レターの略語による一般に表わされます。例えば、アラニンは A またはアラバマによる表わすことができます。

10

【 0 0 2 4 】

ポリペプチドの場合には、本明細書に用いられるように、「シーケンス」はアミノ末端からカルボキシ末端へ方角のポリペプチドへのアミノ酸のシーケンスです。そこでは互いに隣接している残基はシーケンスの中でポリペプチドのあります。一次構造は連続的です。シーケンスは、また 1 つまたは 2 つの方角の追加の残基を含むと知られていたポリペプチドの一部の線状のシーケンスかもしれません。

20

【 0 0 2 5 】

本明細書に用いられるように、「同一性」、「相同」または「シーケンス同一性」は 2 つ以上のポリヌクレオチド・シーケンス、または 2 つ以上のポリペプチド配列間の類似点を順番に並べるために参照します。2 つの異なるアミノ酸配列順序間のシーケンス同一性、類似性または相同を測定するために E M B O S S 針または B e s t F i t などのプログラムを用いる時、デフォルト設定は用いることができます。または、b l o s u m 4 5 または b l o s u m 8 0 などの適切な得点するマトリックスは、最適化同一性、類似性または相同性のスコアのために選択することができます。むしろ、同族のポリヌクレオチドは、より好ましくは少なくとも 9 0 % より好ましくはむしろ、厳格な条件の下で交雑し、少なくとも 7 0 % が少なくとも 8 0 % あるものです (9 5 % 、より好ましくは) 9 7 % 、より好ましくは 9 8 % およびより好ましくはこれらのシーケンスに比較された 9 9 % のシーケンス同一性さえ。最適に比較可能な長さのシーケンスを整列させる時、同族のポリペプチドはむしろ少なくとも 8 0 % 、少なくとも 9 0 % 、または少なくとも 9 5 % を持っているか、少なくとも 9 7 % 、または少なくとも 9 8 % が同一性を順番に並べるか、または少なくとも 9 9 % のシーケンス同一性があります。

30

【 0 0 2 6 】

本明細書に開示された抗原結合単位に関する限り、用語「パーセント・シーケンス同一性 (%) 」は、いかなる保存的置換もシーケンス同一性の一部と見なさずに、シーケンスを整列させて、シーケンス同一性の最大のパーセンテージを得るのに必要なときにギャップを導入した後に質問シーケンスおよび第 2 の間の同じ a n i m o 酸と参照ポリペプチド配列のパーセンテージとして定義されます。アミノ酸配列順序のパーセント同一性を測定するための配列は、B L A S T 、 B L A S T - 2 、 A L I G N 、 N E E D L E または M e g a l i g n (D N A S T A R) などの公に有効なコンピューター・ソフトウェアを用いることにより、芸術の熟練したものによる感謝された様々な面の中で例えば達成することができます。当業者は、比較されている配列の全体にわたる最大の整列を達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む整列を測定するための、適切なパラメーターを測定することができる。パーセント同一性は、定義されたポリペプチド配列全体の長さの間測定することができる、またはより短い長さの間測定することができる、例えば、破片の長さ以上、より大きな定義されたポリペプチド配列から得られた、少なくとも 5 つ、1 0

40

50

(少なくとも)の、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100または少なくとも200連続する残基の破片のような。これらの長さは単に典型的です。そして、パーセント同一性が測定することができる長さを記載するために表、図または本明細書にリストするシーケンスにおける示されるシーケンスによる支持されたいかなる破片長さも用いることができることが、理解されるに違いありません。

【0027】

本明細書に記載されたタンパク質は、参照シーケンスに関する1つ以上の変異をしているかもしれません。その変異は、欠失、挿入または、付加、またはアミノ酸残基の置換かもしれません。「欠失」は、1つ以上のアミノ酸残基の除去によりアミノ酸配列順序の変化を表します。「挿入」または「付加」は、基準シーケンスに比較して、1つ以上のアミノ酸残基の付加の帰着するアミノ酸配列順序変化を表します。「置換」「または置換された」1つ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸に取り替えられることを意味します。ここで、参照シーケンスに対する抗原結合フラグメントの変異は、抗原結合フラグメントを参照シーケンスに比較することにより測定することができます。比較のシーケンスの最適な配列は、芸術のあらゆる既知の方法に応じて果たすことができます。

10

【0028】

本明細書に用いられたように、用語「分離された」自然界、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体または破片において場合には、細胞・他の構成要素から分離に言及する、それについて。当業者は、それらとそれらの自然発生の相当物を区別するためには、非自然発生のポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその破片が「分離される必要がない」ことに気づいています。加えて、「濃縮」ポリヌクレオチド、「分離された」ポリヌクレオチドまたは「希釈された」ポリヌクレオチド、またはペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその破片は、より大きな単位体積について分子の濃縮または数のためにそれらの自然発生の相当物から識別可能です、より(「集中する」)またはその自然発生の相当物(「分離する」)より小さな豊富化は1つの単位体積当たりの解決の重量などの絶対量に基づいて、測定することができるか、またはそれを第2に関連があって測定することができます、潜在的に、出所混合物においてある干渉物質。

20

【0029】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」、「ヌクレオチド」と「オリゴヌクレオチド」は、交換可能に用いられます。彼らは、あらゆる長さ(デオキシリボヌクレオチドモリボヌクレオチドも)またはアナログのヌクレオチドの重合体の形を表します。ポリヌクレオチドはいかなる三次元構造も持つことができ、いかなる既知か未知の作用も果たすことができます。以下はポリヌクレオチドの制限しない例です: 遺伝子または遺伝子破片のコーディング、連鎖解析、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組み換えのポリヌクレオチド、枝分けさせられたポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、分離されたDNA、分離されたRNA、核酸プローブ、入門書、オリゴヌクレオチドまたは合成DNAから測定された座または非コードの領域。ポリヌクレオチドは、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログなど修飾されたヌクレオチドを含むかもしれない。ヌクレオチド構造への変異は、ポリヌクレオチドの形成の前に、またはその形成の後に与えることができます。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって阻止され得る。ポリヌクレオチドは、標識化構成要素との抱合によってなど、重合の後にさらに修飾され得る。

30

40

【0030】

ポリヌクレオチドに適用された時、「組み換えである」ことはポリヌクレオチドがクローニングであることを意味します。または、生成物は制限消化、連結反応と他の手順から起因しました。そして、生成物は自然界の中で発見されたポリヌクレオチドとは異なります。

【0031】

「遺伝子」、「遺伝子破片」という用語は交換可能に本明細書に用いられます。彼らは

50

、転写および翻訳の後に特有のタンパク質をエンコードすることができる少なくとも 1 つの読取枠を含んでいるポリヌクレオチドを表します。遺伝子または遺伝子破片はゲノムかもしれませんが、cDNA、またはポリヌクレオチドが少なくとも 1 つの読取枠を含んでいる限り、合成の、それはそのコード領域またはセグメント全体を覆うかもしれません。

【0032】

「操作しやすく接続しているか」、「有効に接続している」用語は、それらの意図した方法の中で作用への構成要素を許可する、構成要素の並置を表します。例えば、プロモーター・シーケンスが暗号配列の転写を促進する場合、プロモーター・シーケンスは暗号配列に操作しやすくリンクされます。

10

【0033】

本明細書に用いられるように、「発現」はポリヌクレオチドがmRNAへ転写される手順および/または転写されたmRNA（また「転写」と呼ばれた）がペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質へ次に変換される手順を表します。転写とエンコードされたポリペプチドは総体として遺伝子産物と呼ばれます。ポリヌクレオチドがゲノムDNAから誘導した場合、発現は真核細胞のmRNAのスプライシングを含むかもしれません。

【0034】

本明細書に用いられるように、用語「ベクター」はポリヌクレオチドが挿入することができる核酸ビヒクルを表します。ベクターが挿入されたポリヌクレオチドによるエンコードされたタンパク質の発現を可能にする時、ベクターは発現ベクトルと呼ばれます。ベクターは変態、形質導入またはトランスフェクションによる宿主細胞へ導入することができます。それは、それによる運ばれた遺伝物質が宿主細胞で示されうるほどのものです。当業者によく知られているベクターは含みます、しかし制限されない、プラスミド、ファージミド、酵母人工染色体(YAC)などの人工染色体、バクテリア人工染色体(BAC)とP1は、人工染色体(PAC)、ファージおよびM13ファージなどのファージと動物ウイルスを引き出しました。ベクターとして用いることができる動物ウイルス、含む、しかし制限されない、レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス(単純疱疹ウイルスのような)、ポックスウイルス、バキュロウイルス、乳頭腫ウイルス、および乳頭突起ポリオーマウイルス空胞のあるウイルス(egシミアンウイルス40)。ベクターは、プロモーター、転写開始剤、エンハンサー、選択要素とレポーター遺伝子を含み、これらに限定されずに、抑制発現に対して多数の要素を持つことができます。加えて、ベクターはまた複製開始点を含んでいるかもしれません。

20

30

【0035】

用語「トランスフェクション」は細胞で外来性DNAの摂取を参照するために用いられます。そして、外来性DNAが細胞膜の内部で導入された時、細胞は「トランスフェクトされました」。多くのトランスフェクション技術が、当技術分野において一般的に知られている。例えば国際公開第2009/101611号を参照されたい。(1973) ウイルス学、52:456、Sambrookら(1989) 分子クローニング、実験手引き書、コールド・スプリング湾研究所、ニューヨーク、デイビスら(1986) 分子生物学、Elsevierとチューの基本的方法ら(1981) 遺伝子13:197。そのような技術は適切な宿主細胞へ、ヌクレオチド統合ベクターと他の核酸分子などの1つ以上の外因性の核酸を導入するために用いることができます。

40

【0036】

本明細書に用いられるように、用語「抗体」は2組のポリペプチド鎖(1つの「光」(L)鎖と1つの「重い」(H)鎖がある各ペア)から一般に構成される免疫グロブリン分子を表します。抗体軽鎖はカッパおよび軽鎖へ分類することができます。重鎖はμ、δ、ε、またはγとして分類することができます。そして、抗体アイソタイプはIgM、IgD、IgG、IgAとIgEとしてそれぞれ定義されます。光および重鎖の内では、変数および不変部領域は、約12以上のアミノ酸の「J」領域による接続されます。

50

そして、重鎖は、また約3つ以上のアミノ酸の「D」領域を含んでいます。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと省略）と重鎖定常領域とで構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン（CH1、CH2、及びCH3）で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと省略）と軽鎖定常領域とで構成される。軽鎖不変部領域は領域CLから構成されます。抗体の定常領域は、免疫系（例えば、エフェクター細胞）と古典的な補体系の第1構成要素（C1q）の様々な細胞を含む、宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介してもよい。VHおよびVLの領域も、その間に点在したフレームワーク領域（FR）と呼ばれる、より多くの保存された領域を備えた高い変性（相補性決定領域（CDR）と呼ばれた）を有する領域へ細分することができます。VHとVLは各々、次の順の整えられた3つのCDRと4つのFRから構成されます：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、アミノ末端からカルボキシ末端へ整えられたFR4。個々の重い／軽鎖ペアの可変領域（VHおよびVL）は、抗体結合部位をそれぞれ形成します。各領域または領域へのアミノ酸の割付けは、免疫学に興味のあるタンパク質（国立衛生研究所（ベテスダ（メリーランド）（1987年および1991年））、またはChothiaのカバット・シーケンス& Lesk（1987）J. mol に続きます。生物学者196：901 - 917；Chothiaらの定義（1989）自然342：878 - 883。用語「抗体」は抗体を生成するいかなる特定の方法によるも限定的ではありません。例えば、それは組み換えの抗体、単クローン抗体と多クローン性抗体を含みます。抗体は、異なるアイソタイプ（例えばIgG、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM抗体）（eg、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4亜型）の抗体かもしれません。

10

20

【0037】

本明細書に用いられるように、用語「抗原結合フラグメント」は抗体に特に短縮していない抗体が結合するのと同じ抗原を拘束する能力を保持する、短縮していない抗体の破片を含むポリペプチド、および／または特に抗原に結合する長い抗体に競争する能力を表します。抗原結合フラグメントも「抗原結合部分」として知られています。一般に見る、基本の免疫学、7章（ボール（W）。）ed。第二版、参照によるすべての目的のその全体の明細書に組み入れられる、漆黒の出版（NY（1989））。完全な抗体のDNA再結合技術、酵素の切断または化学の切断を用いることは、抗体の抗原結合フラグメントを生成するかもしれません。ある場合には、抗原結合フラグメントが含ます、驚くべき、驚くべき。」F（ab）₂、Fd、Fv、dAbと相補性決定領域（CDR）破片、単一の鎖抗体（例えばscFv）、キメラ抗体、二重特異性抗体（二重特異性抗体）と、少なくとも特異性抗原結合能力を与えるのに十分な抗体の一部を含んでいるポリペプチド。ある場合には、抗原結合フラグメントが単一の鎖の抗体（例えばscFv）です。そこでは、VLおよびVHの領域はそれらが単一のポリペプチド鎖（参照、例えばバードら、サイエンス242：423 - 426（1988）、ヒューストンら、米国科学アカデミー紀要85：5879 - 5883（1988））であるリンカーを生成することを可能にすることにより、1価の分子を形成するためにペアになります。そのようなscFv分子には一般的な構造があるかもしれません：NH₂-VLリンカー-VH-COOHまたはNH₂-VHリンカー-VL-COOH。適切なリンカーは含みます、しかしそれについて繰り返されたGGGGSアミノ酸配列順序または変異体に限定的ではありませんでした。例えば、アミノ酸配列順序（GGGGS）₄とその変異体を有するリンカーは用いることができます。（ホリガーらを参照（1993）（Proc 国家アカデミーSci）。アメリカの90：6444 - 6448）用いることができる他のリンカーはAlfthanらによる記載されます。（1995）（タンパク質エング）。8：725 - 731、チョウイら（2001）（ヨーロッパJ Immunol）。31の解釈：94 - 106、フーら（1996）（癌事実）。56：3055 - 3061、Kipriyanovら（1999）（J. mol）。生物学的な293：41 - 56、Rooversら（2001）（癌 Immunol）。参照はすべて、参照によるすべての目的のそれらの全体の明細書に組み入れられます。

30

40

50

【 0 0 3 8 】

抗体（例えば上に言及されるような抗体フラグメント）の抗原結合フラグメントは、ルーチン技術（例えばDNA再結合技術、酵素の切断または化学の切断）による得ることができます。完全な抗体に関しては特に同じ方法の中でスクリーニングすることができます。もし、コンテキストが明白に示さなければ、用語「抗体」を参照する時、そうでなければ、それは、全体の抗体だけでなく抗体の抗原結合フラグメントも含みます。

【 0 0 3 9 】

本明細書に用いられるように、用語「宿主細胞」はベクターが導入することができる細胞を表します、含む、しかし限定的でない、に、大腸菌または枯草菌などの原核細胞、酵母菌またはアスペルギルス属などの菌による細胞、S 2 ミバエ細胞またはS f 9 昆虫細胞などの昆虫細胞、または繊維芽細胞などの動物細胞、CHO細胞、コス細胞、NSO細胞、HeLa細胞、BHK細胞、HEK 2 9 3細胞、またはヒト細胞。

10

【 0 0 4 0 】

「アンタゴニスト」、「阻害剤」という用語は交換可能に本明細書に用いられ、標的タンパク質の活動または発現の抑制により、標的タンパク質の生物学的な作用を阻害することができる分子を表します。従って、用語「アンタゴニスト」及び「阻害剤」は、標的タンパク質の生物学的な役割との関連において定義されている。本明細書における好ましいアンタゴニストは標的と特異的に相互作用（例えば、結合）するが、標的タンパク質が一員となる、信号伝達経路の他の員と相互作用することにより、標的タンパク質の生物活性を阻害する化合物も、この定義内に特異的に含まれている。

20

【 0 0 4 1 】

本明細書に用いられるように、「有効な量」は少なくとも特定の疾患または症状の測定可能な改善または予防を達成するのに必要な最低額を表します。有効な量は、患者の疾患状態、時代、ジェンダーと重量によって異なることができます。有効な量はまた治療の有益な効果が超過する量です、治療のあらゆる有毒または悪影響。癌または腫瘍の処置では、有効な薬物量は次の効果があるかもしれません：癌細胞の数を減らすこと、腫瘍の寸法の低減、周辺の器官へ癌細胞の浸潤の阻害、抑止的な腫瘍転移、抑止的な腫瘍の増殖、ある程度まで、および/または、1つ以上の症状の緩和、その疾患に関連した、ある程度まで。有効な量は1つ以上の適用の中で投与することができます。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用する時、用語「受容者」、「個体」、「対象」、「宿主」と「患者」は交換可能に用いられる、および診断されるか処置されることが従属するあらゆる哺乳類を参照する、好ましくはヒト。

30

【 0 0 4 3 】

本明細書に用いられるように、用語「治療」、「処置し」こと、および当量は、希望の薬学でおよび/または生理的な効果を得ることを一般に指すために本明細書に用いられます。効力は、完全にまたは部分的に疾患またはその症状を予防する点では予防かもしれないし、および/または疾患および/またはその疾患に起因する副作用を部分的にまたは完全に安定させるか直す点では治療かもしれません。本明細書に用いられるような「処置」は、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、霊長類、人間を含むこと他の類人猿（好ましくは人間）などの哺乳動物への疾患のいかなる処置も包含します。該方法は、（a）疾患または症状に弱いかもしれない対象の生じることから疾患または症状だが診断書の予防は、まだ生じていません；（b）病徴を阻害すること；（c）その疾患の発現を防ぐこと；（d）その疾患の症状を和らげること；（e）疾患または症状をおさまらせてください；（1）-（3）の任意の組み合わせによって達成される。

40

【 0 0 4 4 】

本明細書に用いられるような用語「キット」は、共通の使用のための、または営利上パッケージにされた組み合わせを表します、有効。例えば、本の開示のキットは、本明細書に開示された組成物、と組成物またはキットを用いるための指示を含んでいるかもしれません。用語「指示」は、治療薬のコマーシャル・パッケージの通常含まれている説明の挿

50

入物を表します。それは、適応症、使用、量、投与、併用に関する情報、禁忌および／またはそのような治療薬の使用に関する警告を含んでいます。

【 0 0 4 5 】

「コドン最適化」「またはコドン最適化された」という用語は、コドンが特有のシステム（例えば特有の種類または一群の種類）において発現には打ってつけのことができるように、核酸配列を構築するコドンを変更することを指します。例えば、核酸配列は哺乳動物細胞へのより効率的な発現のための最適化されます。同意語のコドンの存在により、コドン最適化は、エンコードされたタンパク質のアミノ酸配列順序を変更しません。様々なコドン最適化方法は、米国の特許の番号 5,786,464 と 6,114,148 の開示されたものなどの技術で知られています。それは参照によるすべての目的のそれらの全体の本明細書に組み入れられます。「同意語のコドン」は、同じアミノ酸をエンコードするコドンを表します。

10

【 0 0 4 6 】

タンパク質を構成する 20 のアミノ酸と、アミノ酸をエンコードする 64 のコドンがあります。アミノ酸は各々少なくとも 1 つのコドンに相当します。そして、1 つのアミノ酸は 6 つまでのコドン（縮重暗号）に相当する場合があります。異なる生体（同じ生体の異なるタンパク質をコード化する遺伝子さえ）も、縮重暗号の異なる使用頻度を持っており、特定の優先度があります。それらの中で、高周波を有するコドンは好ましいコドンと呼ばれます。そして、めったに用いられないものはまれか低周波のコドンと呼ばれます。遺伝子コドンの最適化は、好ましいコドンを利用し、低い利用を有するまれか低周波のコドンを回避し、遺伝子転写の後に mRNA の二次構造を単純化し、高性能発現の助けになり、発現に不利で、GC 含有量を調節しているモチーフを低減しているモチーフを incorporating すること等により、タンパク質発現レベルを増加する場合があります。多くの一般的なコドン最適化原理がありますが、これらの一般的な最適化原理は、一様に単一の遺伝子治療ベクターに適用することができません。異なる一般的な最適化原理は互いに否定するかもしれません。例えば、CpG 島の組成物またはコード領域の GC 含有量の変更は、コドン利用優先度の選択に影響するかもしれません。加えて、異なるコドン最適化は異なる翻訳後修飾と異なる生物活性に至るかもしれません。

20

【 0 0 4 7 】

「活発な」または、本の発明の目的の「活動」は、対応する在来か自然発生のポリペプチドの生物活性を保持する、治療のタンパク質の形を表します。活動はより大きいかもしれません、より、等しい、に、または対応する在来か自然発生のポリペプチドを有する観測されたそれ未満。

30

【 0 0 4 8 】

ウェット型黄斑変性

斑は網膜の中央部です。網膜の変性として知られる黄斑変性は黄斑変性に関する眼疾患です。

【 0 0 4 9 】

加齢黄斑変性症（AMD）は、50歳のときにわたる人々における不可逆の視力障害の最も重要な原因のうちの 1 つです。AMD は、「乾燥して」、「ぬれた」2つの型へ臨床的に分類されます。AMD のぬれた形では、新しい血管は、網膜の組織（特に斑より下のもの）への血液供給を形成し変更します。しかしながら、新しい血管は容易に破損されます。そして、それらの破裂は、周囲の組織、形成に傷跡を残す網膜の組織とビジョンの急速な損失に出血および損傷をもたらすでしょう。その疾患は迅速に進行し、盲目にしばしば至ります。ぬれた黄斑変性は、黄斑変性に関連した盲目の約 90% を占めて、通常視野の中心の歪曲から始まります。

40

【 0 0 5 0 】

いくつかのサイトカインは、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、VEGF レセプタ（VEGFR）、胎盤の成長因子、血小板由来増殖因子（PDGF）、低酸素症誘導可能な要素（HIF）、angiopoietin（Ang）と他のサイトカインを含み、これ

50

らに限定されずに、血管形成の調節の重要な役割を果たすと分かりました、およびMAPキナーゼ(MPK)。

【0051】

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は、46 kDa(それは色素上皮細胞を含む目の細胞における示される)の寸法を有する糖タンパク質です、周皮細胞、血管内皮細胞、神経膠、および神経節細胞。VEGFは様々な眼疾患に関連すると知られている、虚血の網膜症を含み、これらに限定されずに、眼内の新血管新生、加齢黄斑変性症(AMD)、滲出型AMD、萎縮型AMD、網膜新生血管、糖尿病の黄斑の浮腫、糖尿病の網膜虚血、糖尿病の網膜浮腫、増殖性糖尿病性網膜症、網膜静脈閉塞、網膜中心静脈閉塞症(網膜静脈分枝閉塞症)。

10

【0052】

Eylea(r)(VEGFを拘束力のある融合タンパク質(aflibercept))は滲出型AMDの治療のための承認された薬物です。それは目の新血管新生を防ぎ、このように、滲出型AMDを処置することができます。Lucentis(r)(抗VEGF抗体(ranibizumab))は滲出型AMDの治療のための承認された別の薬物です。また、それは目の新血管新生を防ぎ、このように、滲出型AMDを処置することができます。臨床研究は、患者の約95%がLucentis(r)を投与したことを示しました、改善した、または安定したビジョン。しかしながら、両方の薬物は非常に高価です。そして、頻繁に繰り返された注射剤はこれらの薬物の短い半減期により有効性を維持するように要求されます。従って、新しい治療は、関連する眼疾患を処置するためにVEGFを標的とすることの必要です。

20

【0053】

組換えAAVベクター

アデノ随伴ウイルス(AAV)はパルボウイルス科ファミリーのもので、一本鎖DNA(ssDNA)ウイルスです。AAVゲノムは長さ約4.7キロベースで、DNA鎖の両端と、レブおよびキャップと呼ばれる2つの読取枠(ORF)で逆方向末端反復(ITR)を含んでいます。

【0054】

「AAV逆方向末端反復」(ITR)シーケンスは、在来の単鎖のAAVゲノムの両端で存在する約145のヌクレオチドのシーケンスです。ITRは、アデノ随伴ウイルス・ゲノムへの効率的な複製の対称的な核酸配列です。それは複製起点としてウイルスDNA合成のために用いることができ、組み換えのAAVベクターのために必要な構造の構成要素です。

30

【0055】

「レブ」はポリヌクレオチドを含んでいます、順番に並べる、4のレブ・タンパク質rep78のエンコード、それをrep68し、rep52し、rep40する、AAV生活環のために必要です。「脱帽してください」ポリヌクレオチドを含んでいる、順番に並べる、AAVカプシド・タンパク質のエンコード、VP1、VP2、およびVP3、AAVカプシド・タンパク質VP1、VP2とVP3が24の対称なAAVカプシドを形成するために互いと相互に作用することができる場合には。

40

【0056】

AAVは分割され分割されなかったヒト細胞を有効に感染させる場合があります。そして、そのゲノムは、宿主細胞ゲノムへの1回の染色体のサイトへ統合することができます。最も重要なことには、AAVは人体の存在しますが、現在の調査はAAVがいかなる疾患にも関連していないことを示唆します。その高い安全性、低い免疫原性、広い宿主領域と動物への外来遺伝子の長期的な安定した発現を調停する能力に基づいて、AAVは遺伝子治療の最も有望なベクターシステムになりました。

【0057】

AAV血清型または感染した組織または、細胞に基づいて、13の異なるAAVがこれまで確認されました(すなわちAAV1-AAV13)。さらに、表あるの下に示される

50

ように、AAVを用いる多くの有利なベクターシステムが特有の細胞型へのトランスフェクションのための開発されています。AAV血清型中で、血清型2（AAV2）は最も広く調査される（用いられる）ものです。それは網膜の上皮、光受容細胞、骨格筋、中枢神経と肝細胞を感染させる場合があります。それは担体として多くの臨床研究のために用いられました。

【0058】

【表1】

Table 1 AAV serotypes and their tissues used as carriers in gene therapy

AAV Serotype	Delivery Organization
AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9	central nervous system
AAV1, AAV8, AAV9	heart
AAV2	kidney
AAV7, AAV8, AAV9	liver
AAV4, AAV5, AAV6, AAV9	lung
AAV8	pancreas
AAV2, AAV5, AAV8	photoreceptor cell
AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV8	retinal epithelium
AAV1, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9	skeletal muscle

10

20

【0059】

本明細書に用いられるように、用語「組み換えのAAVベクター（rAAVベクター）」は1つ含んでいるポリヌクレオチド・ベクターを表します。または、より異種のシーケンス（すなわち非-AAV-派生した核酸配列）は2つのAAV逆方向末端反復（ITR）による側面に位置しました。AAVレブとキャップ・タンパク質を示す宿主細胞における示す時、rAAVベクターはAAVへウイルス粒子を複製しパッケージにすることができます。

【0060】

「組み換えのAAV（rAAV）ウイルス」または「rAAVウイルス粒子」は、rAAVベクターをカプセルに入れる少なくとも1つのAAVカプシド・タンパク質からなるAAVウイルス粒子を表します。rAAVウイルス粒子の産生のために現在用いられた宿主細胞は、すべて293個の細胞、コス細胞、HeLa細胞、KB細胞と他の哺乳動物細胞株などの哺乳動物から細胞型です。rAAVウイルス粒子はrAAVプラスミドを備えた提供される哺乳動物細胞培養系の中で生むことができます。しかしながら、ほとんどの哺乳動物細胞培養系の出力は治験と工業規模産生のための必要性を満たすのが困難です。この理由で、Sf9細胞などの昆虫細胞を用いるrAAVウイルス粒子プロダクション・システムは、最近開発されています。しかしながら、昆虫細胞のAAVを生成するために、AAVカプシド・タンパク質の正しい理論混合比を得るためにいくつかの変異をな

30

40

【0061】

バキュロウイルスはバキュロウイルス・ファミリーが所有しており、二重らせん構造のサーキュラーDNAウイルスです。そのゲノム・サイズは90kb-230kbの間であります。バキュロウイルスは、節足動物においてもっぱら寄生し、600匹を超える昆虫を感染させることができると知られています。1983年には、スミスらが、成功裡にSpodoptera frugiperda細胞系統Sf9（mol細胞Biol、1983年、3：2156-2165）における人間-インターフェロンを示すためにAutographa Californica多重カプシド核多角体ウイルス（AcMNPV）を用いることにより、第一のバキュロウイルス発現システムを作出しました。その

50

時以来、バキュロウィルス発現システムは継続的に改善され開発されており、広く用いられている真核生物の発現システムになりました。2002年には、U r a b eらが、バキュロウィルスに感染したS f 9昆虫細胞がA A Vの複製を支持することができることを確認しました。彼らは、S f 9細胞と成功裡に準備したr A A Vウィルス粒子を共同感染させるためにA A Vのレブ遺伝子、キャップ遺伝子とI T Rコア発現要素をそれぞれ運んで、3つの組み換えのバキュロウィルスを用いました。その時以来、研究者は、r A A Vウィルス粒子の大規模調製のために、より適しているシステムをc o n t i n u o u s l yに開発しました。

【0062】

現在、r A A Vウィルス粒子の大規模調製の2つの主なバキュロウィルス発現システムがあります：2つのバキュロウィルス・システム（2つのB a cシステム）とパッケージにする細胞系統依存の1つのバキュロウィルス・システム（1つのB a cシステム）。2つのバキュロウィルス・システムを用いて、r A A Vウィルス粒子を調製する主な過程は、レブ遺伝子と、1つのバキュロウィルス・ゲノムへのA A Vのキャップ遺伝子を統合し、I T Rコア発現要素と、別のバキュロウィルス・ゲノムへ興味のある標的遺伝子を統合することです。その後、2つの組み換えのバキュロウィルスは興味のある遺伝子を運ぶr A A Vウィルス粒子を生む宿主細胞を共同感染させるために用いられます。1つのバキュロウィルス・システムを用いて、r A A Vウィルス粒子を調製する主な過程は、レブおよびキャップの遺伝子の発現を引き起こすパッケージング細胞系統の確立を有する始まります。パッケージング細胞系統はレブを統合します。そして、レブ遺伝子とキャップ遺伝子がそうだったように、キャップ遺伝子発現要素は強いプロモーターp o l hプロモーターをバキュロウィルス後期遺伝子発現の管理下に配置しました。h r 2エンハンサー配列とA A Vレブ・タンパク結合シーケンスは、さらにp o l hプロモーターの上流に付加になりえます。A A V I T Rと標的遺伝子を含んでいる組み換えのバキュロウィルスによる感染症の後、パッケージング細胞系統へのレブ遺伝子とキャップ遺伝子はタンパク質を示すために引き起こされ、それによって、標的遺伝子を統合するr A A Vウィルス粒子を生成します。

【0063】

いくつかの実施形態では、r A A Vベクターはかつてはr A A Vウィルス粒子の興味のある遺伝子を運びました、促進してもよい、1つ以上を含む「発現調整する要素。」用語「発現調整する要素」本明細書に用いられたように、異種のポリヌクレオチドの転写と翻訳を促進するポリヌクレオチド・シーケンスを含む操作しやすくリンクしたポリヌクレオチドの発現に影響する核酸配列に言及します。発現調節要素の制限しない例は含みます、しかし制限されない、プロモーター、エンハンサー、イントロン継手信号、ポリアデニル化（ポリ（1つの））、逆方向末端反復シーケンス（I T R）。いくつかの実施形態では、ポリ（A）シーケンスは、h G Hポリ（A）、シミアンウィルス40ポリ（A）または-グロビン・ポリ（A）です。

【0064】

「プロモーター」は、標的生成物をエンコードする異種のポリヌクレオチド・シーケンスに隣接した位置にあったD N A塩基配列です。それは、通常異種のポリヌクレオチドなどの隣接したシーケンスに操作しやすくリンクされます。プロモーターの不在への異種のポリヌクレオチドの発現レベルと比較して、プロモーターは、一般に異種のポリヌクレオチドの発現レベルを増加します。

【0065】

「エンハンサー」はプロモーターの活動を増強するシーケンスです。プロモーターと異なり、エンハンサーはプロモーター作用をしておらず、プロモーター（すなわち上流にまたは下流にプロモーターの）に関連のあるそれらの位置と無関係に一般に機能することができます。エンハンサーエレメント（またはその部分）の制限しない例はバキュロウィルス・エンハンサーと、昆虫細胞の中で見つけられたエンハンサーエレメントを含みます。

【0066】

10

20

30

40

50

「充填材シーケンス」は、ベクターなどのより大きな核酸分子の含まれていたヌクレオチド配列を表し、プロモーターおよび暗号配列の間でのような2つの核酸配列間の必要な間隔を作出するかまたは希望の長さに核酸配列を延長するために一般に用いられます。充填材シーケンスはタンパク質暗号情報を含んでいません。充填材シーケンスは未知か合成起源を持っているかもしれないし、および/または他の核酸配列 *in the* に無関係かもしれないし、より大きな核酸分子。

【0067】

組成物

1つの態様では、本の開示は、第1のポリヌクレオチドと別のポリヌクレオチドを含む組成物を提供します。そこでは最初のポリヌクレオチドは、第1のプロモーターに操作しやすくリンクされた第1のシーケンス、と別のプロモーターに操作しやすくリンクされた別のシーケンスを含みます。

10

【0068】

いくつかの実施形態では、最初のシーケンスはアデノ随伴ウイルス(AAV)キャップ・タンパク質をエンコードします。キャップ・タンパク質は、機能的なAAVカプシド(すなわち、DNAをパッケージにすることができ、標的細胞を感染させることができること)を形成することができる技術で既知のあらゆる構造タンパク質かもしれません。いくつかの実施形態では、キャップ・タンパク質はVP1、VP2とVP3を含みます。いくつかの実施形態では、それが機能的なAAVカプシドを生成することができる限り、キャップ・タンパク質はVP1、VP2、VP3のすべてを含む必要はありません。いくつかの実施形態では、キャップ・タンパク質はVP1およびVP2を含みます。いくつかの実施形態では、キャップ・タンパク質はVP1およびVP3を含みます。いくつかの実施形態では、キャップ・タンパク質はVP2およびVP3を含みます。幾つかの実施形態では、RNAは、された核酸塩基を含まない。幾つかの実施形態では、RNAは、された核酸塩基を含まない。幾つかの実施形態では、RNAは、された核酸塩基を含まない。

20

【0069】

VP1、VP2、VP3はあらゆるAAV血清型から誘導しているかもしれません。いくつかの実施形態では、VP1はAAV血清型ある(AAV1)とAAV血清型2(AAV2)から誘導しているかもしれません、AAV血清型3(血清型3Aと3Bを含むAAV3)とAAVは、4(AAV4)とAAVをセロタイプで分けます、5(AAV5)とAAVをセロタイプで分ける、6(AAV6)とAAVをセロタイプで分ける、7(AAV7)とAAVをセロタイプで分ける、8(AAV8)とAAVをセロタイプで分ける、9(AAV9)とAAVをセロタイプで分ける、10(AAV10)セロタイプで分ける、AAV血清型11(AAV11)、AAV血清型12(AAV12)、AAV血清型13(AAV13)、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8と他の既知のAAV。いくつかの実施形態では、VP1は、血清型AAV1、AAV2(AAV3)(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74またはAAV-2i8から野性型VP1から誘導しています。それはこれらの野性型VP1タンパク質に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%または高い同一性持っていますいくつかの実施形態では、VP1は血清型AAV1から野性型VP1から誘導しています、AAV2、AAV2変異体(AAV2.7m8、AAV2(コッドY-F)とAAV2tYFのような)、AAV3(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74またはAAV-2i8、1つ以上のアミノ酸置換、欠失および/または付加を持っている。

30

40

【0070】

いくつかの実施形態では、VP2はAAV1から誘導しているかもしれません、AAV2、AAV2変異体(AAV2.7m8、AAV2(コッドY-F)とAAV2tYFのような)、AAV3(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、

50

AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV(Rh10(-))、AAV-Rh74、AAV-2i8と他の既知のAAV)。いくつかの実施形態では、VP2は、血清型AAV1、AAV2(AAV3)(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74またはAAV-2i8から野性型VP2から誘導しています。それはこれらの野性型VP1タンパク質に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%または高い同一性持っていますいくつかの実施形態では、VP2は、血清型AAV1、AAV2(AAV3)(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74またはAAV-2i8から野性型VP2から誘導しています。それには1つ以上のアミノ酸置換、欠失および/または付加があります。

10

【0071】

VP3はAAV1から誘導しているかもしれませんが、AAV2、AAV2変異体(AAV2.7m8、AAV2(コッドY-F)とAAV2tYFのような)、AAV3(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8と他の既知のAAV。いくつかの実施形態では、VP3は、血清型AAV1、AAV2(AAV3)(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74またはAAV-2i8から野性型VP3から誘導しています。それはこれらの野性型VP3タンパク質に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%または高い同一性持っていますいくつかの実施形態では、VP3は、血清型AAV1、AAV2(AAV3)(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74またはAAV-2i8から野性型VP3から誘導しています。それには1つ以上のアミノ酸置換、欠失および/または付加があります。

20

【0072】

例えばいくつかの実施形態では、キャップはVP1、VP2および/または同じ血清型のAAVから誘導したVP3を含みます、キャップはVP1、VP2および/またはAAV2からすべて誘導したVP3を含むかもしれませんが。いくつかの実施形態では、キャップはVP1、VP2および/または異なる血清型のAAVから誘導したVP3を含みます。例えば、キャップは、VP1、VP2および/またはAAV1のうちのいかなるものからも誘導したVP3の1つ以上を含むかもしれませんが、AAV2、AAV2変異体(AAV2.7m8、AAV2(コッドY-F)とAAV2tYFのような)、AAV3(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、およびAAV-2i8。

30

【0073】

いくつかの実施形態では、キャップをエンコードする最初のシーケンスは、第1のプロモーターに操作しやすくリンクされます。第1のプロモーターは、細胞におけるキャップの発現を駆り立てることができる技術における既知のあらゆる適切なプロモーターかもしれませんが。いくつかの実施形態では、第1のプロモーターは、組織特異的プロモーター、構成するプロモーターまたは規制されたプロモーターかもしれませんが。例えばいくつかの実施形態では、第1のプロモーターは異なる出所から選択されるかもしれませんが、第1のプロモーターは、ウイルスのプロモーター、プラント・プロモーターまたは哺乳類のプロモーターかもしれません。

40

【0074】

第1のプロモーターの例は含みます、しかし制限されない、ヒト・サイトメガロウイルス

50

ス (C M V) エンハンサー / プロモーター (例えば、早い (C M V I E) 即時の C M V 、エンハンサー / プロモーター) 、シミアンウイルス 40 エンハンサー / プロモーター (例えばシミアンウイルス 40 の初期のエンハンサー / プロモーター) 、 J C ポリオーマウイルス・プロモーター、ミエリン塩基性蛋白質 (M B P) 、単純疱疹ウイルス (H S V - ある) の潜伏期に関連するプロモーター (L A P) または神経膠線維酸性蛋白質 (G F A P) プロモーター、ルー肉腫ウイルス (R S V) 末端反復配列 (L T R) プロモーター、ニューロンに特有のプロモーター (N S E) 、血小板由来増殖因子 (P D G F) プロモーター、 h S Y N 、メラニン凝集ホルモン (M C H) プロモーター、 C B A 、マトリックス・メタロプロテイン・プロモーター (M P P) 、鶏 - アクチン・プロモーター、 C A G 、 M N D U 3 、 P G K と E F 1 a プロモーター。

10

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、第 1 のプロモーターは哺乳動物細胞への発現のために適しているプロモーターです。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞はそれについて H E K 2 9 3 細胞または派生的な細胞です。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、第 1 のプロモーターは昆虫細胞の発現のために適しているプロモーターです。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、昆虫細胞の発現のために適しているプロモーターは含めます、しかし制限されない、 p o l h プロモーター、 p 1 0 プロモーター、基礎的なプロモーター、誘導可能なプロモーター、 E 1 プロモーター、または E 1 プロモーター。幾つかの実施形態において、プロモータは構成型プロモータである。幾つかの実施形態において、プロモータは構成型プロモータである。

20

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、最初のシーケンスの 3 ' 終了はさらにポリアデニル化シーケンス (すなわちポリ (A) シーケンス) を含みます。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シーケンスの長さは及ぶかもしれませんが、から、 5 0 0 b p への 1 b p に関して。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シーケンスの長さはそうかもしれませんが、しかし制限されなかった、ある、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 2 0 の、 3 0 、 5 0 、 1 0 0 、 2 0 0 または 5 0 0 ヌクレオチド。いくつかの実施形態では、ポリ (A) シーケンスは、 h G H ポリ (A) 、シミアンウイルス 40 ポリ (A) または - グロビン・ポリ (A) です。

30

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態では、第 2 のシーケンスは A A V レブ・タンパク質をエンコードします。そこではレブ・タンパク質は、折れ重なり、パッケージング r A A V ウイルス粒子のために必要なあらゆる複製タンパク質かもしれません。いくつかの実施形態では、レブ・タンパク質は r e p 7 8 、 r e p 6 8 、 r e p 5 2 と r e p 4 0 を含みます。いくつかの実施形態では、 r A A V ウイルス粒子が複製されパッケージにされることをそれが可能にする限り、レブ・タンパク質は r e p 7 8 、 r e p 6 8 、 r e p 5 2 と r e p 4 0 のすべてを含む必要がありません。いくつかの実施形態では、レブ・タンパク質は、 r e p 7 8 、 r e p 6 8 、 r e p 5 2 と r e p 4 0 のうちのいかなる 3 も含みます。いくつかの実施形態では、レブ・タンパク質は、 r e p 7 8 、 r e p 6 8 、 r e p 5 2 と r e p 4 0 のうちのいかなる 2 も含みます。いくつかの実施形態では、レブ・タンパク質は、 r e p 7 8 および r e p 5 2 を含みます。いくつかの実施形態では、レブ・タンパク質は r e p 7 8 および r e p 4 0 を含みます。いくつかの実施形態では、レブ・タンパク質は r e p 6 8 および r e p 5 2 を含みます。いくつかの実施形態では、レブ・タンパク質は r e p 6 8 および r e p 4 0 を含みます。

40

【 0 0 7 8 】

r e p 7 8 (r e p 6 8) は r e p 5 2 します。そして、 r e p 4 0 はあらゆる A A V 血清型から誘導しているかもしれません。いくつかの実施形態では、 r e p 7 8 は、 A A V 1 、 A A V 2 (A A V 3) (A A V 3 A および 3 B を含む) 、 A A V 4 、 A A V 5 、 A

50

A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74、A A V - 2 i 8 と他の既知の A A V から誘導しているかもしれません。いくつかの実施形態における、rep 78 は血清型 A A V 1 から野性型 rep 78 から誘導している、A A V 2、A A V 3 (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74 または A A V - 2 i 8、野性型に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 % またはより高い同一性を持っている、タンパク質を rep 78 する。いくつかの実施形態では、rep 78 は、血清型 A A V 1、A A V 2 (A A V 3) (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74 または A A V - 2 i 8 から野性型 rep 78 から誘導しています。それには 1 つ以上のアミノ酸置換、欠失および/または付加があります。

10

【0079】

いくつかの実施形態では、rep 68 は、A A V 1、A A V 2 (A A V 3) (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74、A A V - 2 i 8 と他の既知の A A V から誘導しているかもしれません。いくつかの実施形態における、rep 68 は血清型 A A V 1 から野性型 rep 68 から誘導している、A A V 2、A A V 3 (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74 または A A V - 2 i 8、野性型に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 % またはより高い同一性を持っている、タンパク質を rep 68 する。いくつかの実施形態では、rep 68 は、血清型 A A V 1、A A V 2 (A A V 3) (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74 または A A V - 2 i 8 から野性型 rep 68 から誘導しています。それには置換、欠失および/または 1 つ以上のアミノ酸の付加があります。

20

【0080】

いくつかの実施形態では、rep 52 は、A A V 1、A A V 2 (A A V 3) (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74、A A V - 2 i 8 と他の既知の A A V から誘導しているかもしれません。いくつかの実施形態における、rep 52 は血清型 A A V 1 から野性型 rep 52 から誘導している、A A V 2、A A V 3 (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74 または A A V - 2 i 8、野性型に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 % またはより高い同一性を持っている、タンパク質を rep 52 する。いくつかの実施形態では、rep 52 は、血清型 A A V 1、A A V 2 (A A V 3) (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74 または A A V - 2 i 8 から野性型 rep 52 から誘導しています、1 つ以上のアミノ酸置換、欠失および/または付加を持っています。

30

40

【0081】

いくつかの実施形態では、rep 40 は、A A V 1、A A V 2 (A A V 3) (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74、A A V - 2 i 8 と他の既知の A A V から誘導しているかもしれません。いくつかの実施形態における、rep 40 は血清型 A A V 1 から野性型 rep 52 から誘導している、A A V 2、A A V 3 (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V

50

6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74またはAAV-2i8、野性型に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%またはより高い同一性を持っている、タンパク質をrep52する。いくつかの実施形態では、rep40は、血清型AAV1、AAV2(AAV3)(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74またはAAV-2i8から野性型rep52から誘導しています、1つ以上のアミノ酸置換、欠失および/または付加を持っています。

【0082】

いくつかの実施形態では、レブはrep78、rep68、rep52および/または同じ血清型AAVから誘導したrep40を含みます。例えば、レブはrep78、rep68、rep52および/またはAAV2のみから誘導したrep40を含むかもしれません。いくつかの実施形態では、レブはrep78、rep68、rep52および/または異なる血清型AAVから誘導したrep40を含みます。例えば、レブは、他の既知のAAV rep78のAAV1、AAV2(AAV3)(AAV3Aおよび3Bを含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8とある以上を含むかもしれません、rep68する、rep52する、および/またはrep40。

【0083】

いくつかの実施形態では、レブ・タンパク質をエンコードする第2のシーケンスは、別のプロモーターに操作しやすくリンクされます。第2のプロモーターは、細胞におけるキャップの発現を駆り立てることができる技術における既知のあらゆる適切なプロモーターかもしれません。いくつかの実施形態では、第2のプロモーターは、組織特異的プロモーター、構成するプロモーターまたは規制されたプロモーターかもしれません。いくつかの実施形態では、第2のプロモーターは異なる出所から選択されるかもしれません。例えば、第2のプロモーターは、ウイルスのプロモーター、プラント・プロモーターまたは哺乳類のプロモーターかもしれません。

【0084】

第2のプロモーターの例は含みます、しかし制限されない、ヒト・サイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー/プロモーター(例えば、早い(CMV IE)即時のCMV、エンハンサー/プロモーター)、シミアンウイルス40エンハンサー/プロモーター(例えばシミアンウイルス40の初期のエンハンサー/プロモーター)、JCポリオーマウイルス・プロモーター、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)、単純疱疹ウイルス(HSV-ある)の潜伏期に関連するプロモーター(LAP)または神経膠線維酸性蛋白質(GFAP)プロモーター、ルー肉腫ウイルス(RSV)末端反復配列(LTR)プロモーター、ニューロンに特有のプロモーター(NSE)、血小板由来増殖因子(PDGF)プロモーター、hSYN、メラニン凝集ホルモン(MCH)プロモーター、CBA、マトリックス・メタロプロテイン・プロモーター(MPP)、鶏 - アクチン・プロモーター、CAG、MNDU3、PGKとEF1aプロモーター。

【0085】

いくつかの実施形態では、第2のプロモーターは哺乳動物細胞への発現のために適しているプロモーターです。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞はそれについてHEK293細胞または派生的な細胞です。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、第2のプロモーターは昆虫細胞の発現のために適しているプロモーターです。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、昆虫細胞の発現のために適しているプロモーターは含めます、しかし制限されない、polhプロモーター、p10プロモーター、基礎的なプロモーター、誘導可能なプロモーター、E1プロモーター、またはE1プロモーター。幾つかの実施形態において、プロモータは構成型プロモータである。幾つかの実施形態において、プロモータは構成型プロモータ

タである。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態では、第 2 のシーケンスの 3 ' 終了はさらにポリアデニル化シーケンス（すなわちポリ（ A ）シーケンス）を含みます。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シーケンスの長さは約ある b p から 5 0 0 b p に及ぶかもしれません。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シーケンスの長さはそうかもしれませんが、しかし制限されなかった、ある、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20の、30、50、10、200または500ヌクレオチド。いくつかの実施形態では、ポリ（ A ）シーケンスは、h G H ポリ（ A ）、シミアンウイルス 4 0 ポリ（ A ）または - グロビン・ポリ（ A ）です。

10

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、キャップおよびレブは同じ A A V 血清型から誘導しているかもしれません。例えば、キャップとレブは両方とも、同じ A A V 1、A A V 2（ A A V 3 ）（ A A V 3 A および 3 B を含む）、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V 1 3、A A V - R h 1 0、A A V - R h 7 4、A A V - 2 i 8 または他の既知の A A V から誘導しているかもしれません。

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態では、キャップおよびレブは異なる A A V 血清型から誘導しているかもしれません。例えば、レブが A A V のうちのいかなるものからも誘導しているかもしれない一方、キャップは、A A V 1、A A V 2（ A A V 3 ）（ A A V 3 A および 3 B を含む）、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V 1 3、A A V - R h 1 0、A A V - R h 7 4、A A V - 2 i 8 または他の既知の A A V から誘導しているかもしれません、言及した、しかしキャップが誘導したもの。例えば、レブが A A V 5 から誘導している一方、キャップは A A V 2 から誘導しているかもしれません。

20

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態では、第 1 のプロモーターと第 2 のプロモーターは同じプロモーターかもしれません。例えば、第 1 のプロモーターと第 2 のプロモーターは、p o l h プロモーター、p 1 0 プロモーター、基礎的なプロモーター、誘導可能なプロモーター、E 1 プロモーターと E 1 プロモーターから構成される群から選択された同じプロモーターです。例えば、いくつかの実施形態では、第 1 のプロモーターと第 2 のプロモーターは両方とも p o l h プロモーターです。いくつかの実施形態では、第 1 のプロモーターと第 2 のプロモーターの両方は p 1 0 プロモーターです。

30

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態では、第 1 のプロモーターと第 2 のプロモーターは異なるプロモーターかもしれません。例えば、第 1 のプロモーターと第 2 のプロモーターは、p o l h プロモーター、p 1 0 プロモーター、基礎的なプロモーター、誘導可能なプロモーター、E 1 プロモーターと E 1 プロモーターから選択された 2 人の異なるプロモーターかもしれません。例えば、いくつかの実施形態では、第 1 のプロモーターは p o l h プロモーターです。そして、第 2 のプロモーターは p 1 0 プロモーターです。いくつかの実施形態では、第 1 のプロモーターは p 1 0 プロモーターです。そして、第 2 のプロモーターは p o l h プロモーターです。

40

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態では、最初のシーケンスと第 2 のシーケンスはリンカーをエンコードするシーケンスによるリンクされます。幾つかの実施形態において、リンカーはペプチドリinkerである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは 2 A ペプチドを含むシーケンスです。いくつかの実施形態では、2 A ペプチドは、ブタの J i e s h e n ウィルス（ P T V - ある ）の口蹄疫ウイルス（ F M D V ）、馬鼻炎 A ウィルス（ E R A V ）、T h o s e a a s i g n a ウィルス（ T a V ）または 2 A ペプチドから例えば誘導して、

50

類 A p h t h o r a またはカルジオウイルスから誘導した 2 A ペプチドから選択されるか
 もしれません。いくつかの実施形態では、リンカーをエンコードするシーケンスはさらに
 プロモーター・シーケンスを含みます。幾つかの実施形態において、プロモータは誘導プ
 ロモータである。

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示された組成物の第 2 のポリヌクレオチドは 3
 番めのシーケンスを含みます、V E G F 阻害剤をエンコードする、コドンに最適化された
 核酸配列を含みます。いくつかの実施形態では、組成物は s c A A V ベクターを含みます
 。そこでは s c A A V ベクターは第 2 のポリヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形
 態では、組成物は s s A A V ベクターを含みます。そこでは s s A A V ベクターは第 2 の
 ポリヌクレオチドを含みます。

10

【 0 0 9 3 】

V E G F 阻害剤は、V E G F タンパク質の活動または発現の抑制により V E G F タンパ
 ク質の生物学的な作用を阻害することができるあらゆるポリペプチドまたはタンパク質か
 もしれません。いくつかの実施形態では、V E G F 阻害剤はそれについて抗 V E G F 抗体
 または抗原結合フラグメントです。いくつかの実施形態では、抗原結合フラグメントは含
 みます、しかし制限されない、F a b、驚くべき。J F (a b J) 2、F d、F v、d A
 b、および相補性決定領域 (C D R) 破片、単一の鎖の抗体 (s c F v)、キメラ抗体と
 二重特異性抗体。いくつかの実施形態では、抗 V E G F 阻害剤は r a n i b i z u m a b
 、ベバシズマブまたは a f l i b e r c e p t から選択されます。

20

【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態では、V E G F 阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：ある
 または配列番号に対して少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、
 9 8 % または 9 9 % の相同を持っているシーケンス：1 . いくつかの実施形態では、V E
 G F 阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも 9 9 . 1 %、9 9 . 2 %、9 9 . 3 %、9
 9 . 4 %、9 9 . 5 %、9 9 . 6 %、9 9 . 7 %、9 9 . 8 % または 9 9 . 9 % があるシ
 ーケンスを含みます：1 . いくつかの実施形態では、V E G F 阻害剤は、配列番号のシー
 ケンスを含みます：2 または少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7
 %、9 8 %、配列番号への 9 9 % の相同があるシーケンス：2 . いくつかの実施形態では
 、V E G F 阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも 9 9 . 1 %、9 9 . 2 %、9 9 . 3
 %、9 9 . 4 %、9 9 . 5 %、9 9 . 6 %、9 9 . 7 %、9 9 . 8 % または 9 9 . 9 % が
 あるシーケンスを含みます：2 . いくつかの実施形態では、V E G F 阻害剤は、配列番号
 のシーケンスを含みます：3 または少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %
 、9 7 %、9 8 %、配列番号への 9 9 % の相同があるシーケンス：3 . いくつかの実施形
 態では、V E G F 阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも 9 9 . 1 %、9 9 . 2 %、9
 9 . 3 %、9 9 . 4 %、9 9 . 5 %、9 9 . 6 %、9 9 . 7 %、9 9 . 8 % または 9 9 .
 9 % があるシーケンスを含みます：3 . いくつかの実施形態では、V E G F 阻害剤は、配
 列番号のシーケンスを含みます：4 または少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、
 9 6 %、9 7 %、9 8 %、配列番号への 9 9 % の相同があるシーケンス：4 . いくつかの
 実施形態では、V E G F 阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも 9 9 . 1 %、9 9 . 2
 %、9 9 . 3 %、9 9 . 4 %、9 9 . 5 %、9 9 . 6 %、9 9 . 7 %、9 9 . 8 % または
 9 9 . 9 % があるシーケンスを含みます：4 .

30

40

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態では、V E G F 阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：5 ま
 たは配列番号に対して少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9
 8 % または 9 9 % の相同を持っているシーケンス：5 . いくつかの実施形態では、V E G
 F 阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも 9 9 . 1 %、9 9 . 2 %、9 9 . 3 %、9 9
 . 4 %、9 9 . 5 %、9 9 . 6 %、9 9 . 7 %、9 9 . 8 % または 9 9 . 9 % があるシ
 ーケンスを含みます：5 . いくつかの実施形態では、V E G F 阻害剤は、配列番号のシー
 ケンスを含みます：6 または配列番号に相同性で、少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9

50

5 %、96 %、97 %、98 %または99 %があるシーケンス：6 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99 . 1 %、99 . 2 %、99 . 3 %、99 . 4 %、99 . 5 %、99 . 6 %、99 . 7 %、99 . 8 %または99 . 9 %があるシーケンスを含みます：6 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：7または配列番号に対して少なくとも70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %または99 %の相同を持っているシーケンス：7 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99 . 1 %、99 . 2 %、99 . 3 %、99 . 4 %、99 . 5 %、99 . 6 %、99 . 7 %、99 . 8 %または99 . 9 %があるシーケンスを含みます：7 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：0、1、および2いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、少なくとも70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %または配列番号に相同性の99 %があるシーケンスを含みます：0、1、および2いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99 . 1 %、99 . 2 %、99 . 3 %、99 . 4 %、99 . 5 %、99 . 6 %、99 . 7 %、99 . 8 %または99 . 9 %があるシーケンスを含みます：2592、2594、または2595である。

10

【0096】

いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：8または配列番号に対して少なくとも70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %または99 %の相同を持っているシーケンス：8 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99 . 1 %、99 . 2 %、99 . 3 %、99 . 4 %、99 . 5 %、99 . 6 %、99 . 7 %、99 . 8 %または99 . 9 %があるシーケンスを含みます：8 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：9または配列番号に相同性で、少なくとも70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %または99 %があるシーケンス：9 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99 . 1 %、99 . 2 %、99 . 3 %、99 . 4 %、99 . 5 %、99 . 6 %、99 . 7 %、99 . 8 %または99 . 9 %があるシーケンスを含みます：9 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：10または配列番号に対して少なくとも70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %または99 %の相同を持っているシーケンス：10 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99 . 1 %、99 . 2 %、99 . 3 %、99 . 4 %、99 . 5 %、99 . 6 %、99 . 7 %、99 . 8 %または99 . 9 %があるシーケンスを含みます：10 . いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：2007年、9と3631。いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、少なくとも70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %または配列番号に相同性の99 %があるシーケンスを含みます：2007年、9と3631。いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99 . 1 %、99 . 2 %、99 . 3 %、99 . 4 %、99 . 5 %、99 . 6 %、99 . 7 %、99 . 8 %または99 . 9 %があるシーケンスを含みます：2007年、9と3631。

20

30

40

【0097】

いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列はranibizumabをエンコードします。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列はベバシズマブをエンコードします。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列はafliberceptをエンコードします。いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：あるまたは配列番号に対して少なくとも70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99 . 1 %、99 . 2 %、99 . 3 %、99 . 4 %、99 . 5 %、99 . 6 %、99 . 7 %、99 . 8 %または99 . 9 %の相同を持っているシーケンス：1 . いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコ

50

ードする、コドンに最適化された核酸配列：2または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：2.いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：3または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：3.いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：4または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：4.

10

【0098】

いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：5または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：5.いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：6または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：6.いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：7または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：7.いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：配列番号に相同性の5、6と7、または少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%があるアミノ酸配列順序：0、1、および2

20

30

【0099】

いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：8または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：8.いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：9または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：9.いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：10または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：10.いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：配列番号に相同性の8、9と10、または少なくとも70%、80%、90%、95

40

50

%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%があるアミノ酸配列順序：2007、9と3631。

【0100】

いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：11または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：11。いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：12または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の相同を持っているシーケンス：12。

10

【0101】

いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は、配列番号13よりCpGジヌクレオチドの変更された数を含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は配列番号13より少ないCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は配列番号13より多くのCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10または5つのCpGジヌクレオチド未満を含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75または80のCpGジヌクレオチド以上を含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は0-80のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は5-75のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は10-70のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は15-65のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は20-60のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は25-55のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は30-50のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は35-45のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、CpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列はCpGジヌクレオチドを含んでいません。いくつかの実施形態では、3番目のシーケンスは、配列番号のシーケンスを含みます。SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: 18。

20

30

40

【0102】

いくつかの実施形態では、3番目のシーケンスは、3番めのプロモーターに操作しやすくリンクされます。いくつかの実施形態では、3番目のプロモーターは、CMVプロモーター、CAGプロモーター、MNDU3プロモーター、PGKプロモーター、EF1aプロモーターまたは眼に特有のプロモーターです。いくつかの実施形態では、眼に特有のプロモーターは網膜色素上皮(RPE)の細胞特異的なプロモーターです。RPEの細胞特異的なプロモーターは含めるが、RPE65遺伝子プロモーター、ヒト網膜の結合蛋白質(CRALBP)遺伝子プロモーター、ネズミ科の11-cis-レチノール脱水素酵素(RDH)遺伝子プロモーター、ロドプシン・プロモーター、rhodopopsinキナーゼ・プロモーター、コラーゲン分解酵素阻害3(Timp3)プロモーター、光受容体

50

レチノール結合蛋白質プロモーターとガラス状の黄斑ジストロフィ 2 (卵黄様黄斑ジストロフィ 2) プロモーター (光受容体間網膜の結合蛋白質 (IRBP) プロモーター) に限定的ではありません。

【0103】

いくつかの実施形態では、第 2 のポリヌクレオチドは、合図 (ポリアデニル化合図 (ポリ (1 つの))) を結合して、逆方向末端反復 (ITR)、エンハンサーを含み、これらに限定されずに、さらに他の調節配列を含みます、詰めるシーケンス、終端装置、タンパク質低下合図、内部リボソーム・エントリー要素 (IRES)、2A シーケンス。いくつかの実施形態では、ポリ (A) シーケンスは、hGH ポリ (A)、シミアンウイルス 40 ポリ (A) または - グロビン・ポリ (A) です。

10

【0104】

いくつかの実施形態では、第 2 のポリヌクレオチドはさらにエンハンサー領域を含みます。いくつかの実施形態では、エンハンサー領域はシミアンウイルス 40 エンハンサー、サイトメガロウイルス・エンハンサー、IRBP エンハンサー、免疫グロブリン遺伝子から誘導したエンハンサーを含みます。いくつかの実施形態では、エンハンサー領域は、CMV、CAG、MNDU3、PGK または EF1a プロモーターの上流に位置します。いくつかの実施形態では、エンハンサーは眼に特有のプロモーターの上流に位置します。いくつかの実施形態では、エンハンサー領域は、CMV、CAG、MNDU3、PGK、EF1a プロモーターに下流に位置します。いくつかの実施形態では、エンハンサーは、眼に特有のプロモーターに下流に位置します。

20

【0105】

いくつかの実施形態では、第 2 のポリヌクレオチドはさらに逆方向末端反復シーケンス (ITR) を含みます。幾つかの実施形態では、印字ヘッドは、少なくとも 1 つのノズルを含む。いくつかの実施形態では、デバイスは 2 つのモードを含む。いくつかの実施形態では、第 1 および第 2 の経路は同じである。一実施形態において、2 つのペン先構成要素は互いから絶縁される。いくつかの実施形態では、ITR は AAV から誘導した ITR です。いくつかの実施形態では、ITR は、AAV1、AAV2 (AAV3) (AAV3A および 3B を含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8 と他の既知の AAV から誘導しているかもしれません。いくつかの実施形態では、AAV1、AAV2 (AAV3) (AAV3A および 3B を含む)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-2i8 と他の既知の AAV から野性型 ITR と比較して、ITR には 1 つ以上の塩基変異、挿入または欠失があります、しかし標的遺伝子複製、ウイルス・パッケージングおよび / または統合などの希望のターミナル反復配列作用を保持する。

30

【0106】

幾つかの実施形態において、組成物は更に、1 以上のフィラー配列を含む。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、CMV、CAG、MNDU3、PGK または EF1a プロモーター・シーケンスの上流に位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、CMV、CAG、MNDU3、PGK または EF1a プロモーター・シーケンスに下流に位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは眼に特有のプロモーターの上流に位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、眼に特有のプロモーターに下流に位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、5' ITR シーケンスの 5' 終わりに位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、5' ITR シーケンスの 3' 終わりに位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、3' ITR シーケンスの 5' 終わりに位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、3' ITR シーケンスの 3' 終わりに位置します。

40

【0107】

いくつかの実施形態では、充填材シーケンスの長さは約 0.1 kb - 5 kb かもしれま

50

せん、のような、しかし、0 . 1 k bに限定的でなかった、0 . 2 k b、0 . 3 k b、0 . 4 k b、0 . 5 k b、0 . 6 k b、0 . 7 k b、0 . 8 k b、0 . 9 k b、ある k b、1 . 1 k b、1 . 2 k b、1 . 3 k b、1 . 4 k b、1 . 5 k b、1 . 6 k b、1 . 7 k b、1 . 8 k b、1 . 9 k b、2 k b、2 . 1 k b、2 . 2 k b、2 . 3 k b、2 . 4 k b、2 . 5 k b、2 . 6 k b、2 . 7 k b、2 . 8 k b、2 . 9 k b、3 k b、3 . 1 k b、3 . 2 k b、3 . 3 k b、3 . 4 k b、3 . 5 k b、3 . 6 k b、3 . 7 k b、3 . 8 k b、3 . 9 k b、4 . 0 k b、4 . 1 k b、4 . 2 k b、4 . 3 k b、4 . 4 k b、4 . 5 k b、4 . 6 k b、4 . 7 k b、k b (4 . 8)、または。(4 . 9) (5 . 0 k b)

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドはさらにイントロンを含みます。ある場合には、イントロンが、転写されるかもしれないが翻訳されないあらゆるシーケンスを表すかもしれません。ある場合には、イントロンが、転写されるあらゆるシーケンスを表すかもしれないし、細胞の成熟したRNA転写物から取り除かれます。ある場合には、イントロンが約少なくともある b p、50 b p、100 b p、150 b p、200 b p、300 b p、400 b p、500 b p、600 b p、700 b p、800 b p、900 b p、1000 b p、2000 b p、3000 b p、4000 b pまたは5000 b pを含むかもしれません。ある場合には、イントロンが約300 b pかもしれません。ある場合には、イントロンが約200 - 400 b pかもしれません。ある場合には、イントロンが約100 - 500 b pかもしれません。ある場合には、イントロンが約50 - 200 b pかもしれません。ある場合には、イントロンが完全な自然発生のイントロンまたはキメラ的なイントロンのいずれかかもしれません。いくつかの実施形態では、イントロンは3番目のシーケンスの上流に位置します。いくつかの実施形態では、イントロンは、プロモーターに下流に位置します。幾つかの実施形態において、第1化合物は更に別の第1化合物を含む。いくつかの実施形態では、調整する要素はT P L (アデノウイルスから三者間のリーダー配列)とe M L P (アデノウイルス・マヨール後期プロモーターからエンハンサーエレメント)シーケンスを含みます。いくつかの実施形態では、調整する要素は3番目のシーケンスの上流に位置します。幾つかの実施形態において、外部要素は機器の一部ではない。いくつかの実施形態において、第2のドメインはV Hドメインを含む。いくつかの実施形態では、コザック配列は3番目のシーケンスの上流に位置します。いくつかの実施形態では、コザック配列は、イントロンに下流に位置します。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドはヒト足場を付属の領域 (S A R) シーケンスを含みます。いくつかの実施形態では、S A Rシーケンスは、3番目のシーケンスに下流に位置します。いくつかの実施形態では、S A RシーケンスはポリA信号の上流に位置します。

【 0 1 0 9 】

いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、300、290、280未満のC p Gジヌクレオチドを含みます。270、172、2、171、5、169、6、138、5、137、6、130、1、129、7、128、3、127、1、117、5、114、6、90、5、71、7、71、3、58、4、54、2、47、0、40、1、33、2、31、8、31、4、30、1、29、3、24、2、21、4、16、3、いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、5を超えるC p Gジヌクレオチド、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300を含みます。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは100 - 300、100 - 200、100 - 150を含みます。150 - 200、150 - 250の、150 - 300、200 - 250、200 - 300、または250 - 300 C p Gジヌクレオチド。

【 0 1 1 0 】

いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、異なる治療のタンパク質をエンコードする4番目のシーケンスをさらに含みます。いくつかの実施形態では、異なる治療

10

20

30

40

50

のタンパク質は、V E G F 阻害剤、P D G F 阻害剤、インテグリン阻害剤、m T O R 阻害剤、a n g i o p o i e t i n 阻害剤またはT G F 阻害剤です。

【0111】

いくつかの実施形態では、4番目のシーケンスと3番目のシーケンスはリンカーをエンコードするシーケンスによるリンクされます。幾つかの実施形態において、リンカーはペプチドリナーである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、2Aペプチドのシーケンスを含みます。いくつかの実施形態では、2Aペプチドは、類A p h t h o r a (例えば口蹄疫ウイルス(FMDV)、馬鼻炎Aウイルス(ERAV)、Thos e a a s i g n a ウイルス(TaV)またはブタのt e s c h o v i r u s (PTV-ある)の2Aペプチド)またはカルジオウイルスから誘導した2Aペプチドから選択されるかもしれません。

10

【0112】

組換えA A V ウイルス粒子

別の態様では、本の開示は、細胞へ組成物または本の開示のポリヌクレオチドを導入することにより調製された組み換えのアデノ随伴ウイルス(r A A V)粒子を提供します。いくつかの実施形態では、細胞は昆虫細胞または哺乳動物細胞です。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物細胞です、それについてH E K 2 9 3 細胞または派生的な細胞です。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。

20

【0113】

いくつかの実施形態では、本の開示の組成物は当技術における既知のあらゆる方法による細胞へ送達することができます。いくつかの実施形態では、方法は含むが、エレクトロポレーションに限定的ではありません、リン酸カルシウム沈澱反応、およびリポソーム調停しました。幾つかの実施形態において、組成物は、目への注入のために製剤される。幾つかの実施形態において、組成物は、目への注入のために製剤される。いくつかの実施形態では、細胞はr A A V ウイルス粒子を生むために用いられます。

【0114】

r A A V ウイルス粒子は、当業者に知られていた方法による細胞から分離し精製することができます。例えば、r A A V は、遠心分離、H P L C、疎水性相互作用クロマトグラフィー(H I C)、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、限外濾過、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィーおよび/または他の浄化技術をウイルス粒子のために用いて精製することができます。

30

【0115】

別の態様では、本の開示は、本明細書に開示されたポリヌクレオチドのうちのいかなるものでも含むr A A V 粒子を提供します。

【0116】

ポリヌクレオチド

別の態様では、本の開示は、V E G F 阻害剤をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供します。V E G F 阻害剤は、V E G F タンパク質の活動または発現の抑制によりV E G F タンパク質の生物学的な作用を阻害することができますあらゆるポリペプチドまたはタンパク質かもしれません。いくつかの実施形態では、V E G F 阻害剤はそれについて抗V E G F 抗体または抗原結合フラグメントです。いくつかの実施形態では、抗原結合フラグメントは含みます、しかし制限されない、F a b、驚くべき。J F (a b) 2、F d、F v、d A b、および相補性決定領域(C D R)破片、単一の鎖の抗体(s c F v)、キメラ抗体と二重特異性抗体。いくつかの実施形態では、抗V E G F 阻害剤はr a n i b i z u m a b、ベバシズマブまたはa f l i b e r c e p t から選択されます。

40

【0117】

いくつかの実施形態では、V E G F 阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：ある

50

または配列番号に対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の相同を持っているシーケンス：1.いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%があるシーケンスを含みます：1.いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：2または少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、配列番号への99%の相同があるシーケンス：2.いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%があるシーケンスを含みます：2.いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：3または少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、配列番号への99%の相同があるシーケンス：3.いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%があるシーケンスを含みます：3.いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号のシーケンスを含みます：4または少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、配列番号への99%の相同があるシーケンス：4.いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、配列番号に相同性の少なくとも99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%があるシーケンスを含みます：4.いくつかの実施形態における、配列番号のアミノ酸配列順序を含むタンパク質をエンコードする、コドンに最適化された核酸配列：いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は、配列番号よりCpGジヌクレオチドの変更された数を含みます：13.いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は配列番号より少ないCpGジヌクレオチドを含みます：13.いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は配列番号より多くのCpGジヌクレオチドを含みます：13.いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10または5つのCpGジヌクレオチド未満を含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75または80のCpGジヌクレオチド以上を含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は0 - 80のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は5 - 75のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は10 - 70のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は15 - 65のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は20 - 60のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は25 - 55のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は30 - 50のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は35 - 45のCpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列は60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34の、33、32、31、30 CpGジヌクレオチドを含みます。いくつかの実施形態では、コドンに最適化された核酸配列はCpGジヌクレオチドを含んでいません。いくつかの実施形態では、3番目のシーケンスは、配列番号のシーケンスを含みます。SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: 18. 【0118】

幾つかの実施形態において、コーティングは更にポリマーを含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CMVプロモーター、CAGプロモーター、MNDU3プロモーター、PGKプロモーター、EF1aプロモーターまたは眼の特有のプロモーターです。

いくつかの実施形態では、眼に特有のプロモーターは、R P E 65 遺伝子プロモーター、ヒト網膜の結合蛋白質遺伝子プロモーター、ネズミ科の 11 - c i s レチノイド・アルコール脱水素酵素遺伝子プロモーター、ロドプシン・プロモーター、r h o d o p o s i n キナーゼ・プロモーター、コラーゲン分解酵素阻害 3 プロモーター、光受容体レチノール結合蛋白質プロモーター、卵黄様黄斑ジストロフィ 2 プロモーターと光受容体間類網膜の結合蛋白質プロモーターから構成される群から選択されます。

【0119】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、シーケンス、終端装置、タンパク質低下信号、内部リボソーム・エンタリー要素 (I R E S)、2 A シーケンスを詰めて、逆方向末端反復 (I T R)、エンハンサー、スプライシング信号、ポリアデニル化信号 (ポリ A) を含み、これらに限定されずに、さらに他の調節配列を含みます。いくつかの実施形態では、ポリ A シーケンスは、h G H ポリ (A)、シミアンウイルス 40 ポリ (A) または - グロビン・ポリ (A) です。

10

【0120】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはさらにエンハンサー領域を含みます。いくつかの実施形態では、エンハンサー領域はシミアンウイルス 40 エンハンサー、サイトメガロウィルス・エンハンサー、I R B P エンハンサー、免疫グロブリン遺伝子から誘導したエンハンサーを含みます。いくつかの実施形態では、エンハンサー領域は、C M V、C A G、M N D U 3、P G K または E F 1 a プロモーターの上流に位置します。いくつかの実施形態では、エンハンサーは眼に特有のプロモーターの上流に位置します。いくつかの実施形態では、エンハンサー領域は、C M V、C A G、M N D U 3、P G K、E F 1 a プロモーターに下流に位置します。いくつかの実施形態では、エンハンサーは、眼に特有のプロモーターに下流に位置します。

20

【0121】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはさらに逆方向末端反復シーケンス (I T R) を含みます。幾つかの実施形態では、印字ヘッドは、少なくとも 1 つのノズルを含む。いくつかの実施形態では、デバイスは 2 つのモードを含む。いくつかの実施形態では、第 1 および第 2 の経路は同じである。一実施形態において、2 つのペン先構成要素は互いから絶縁される。いくつかの実施形態では、I T R は A A V から誘導した I T R です。いくつかの実施形態では、I T R は、A A V 1、A A V 2 (A A V 3) (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74、A A V - 2 i 8 と他の既知の A A V から誘導しているかもしれません。いくつかの実施形態では、A A V 1、A A V 2 (A A V 3) (A A V 3 A および 3 B を含む)、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V - R h 10、A A V - R h 74、A A V - 2 i 8 と他の既知の A A V から野性型 I T R と比較して、I T R には 1 つ以上の塩基変異、挿入または欠失があります、しかし標的遺伝子複製、ウィルス・パッケージングおよび / または統合などの希望のターミナル反復配列作用を保持する。

30

【0122】

幾つかの実施形態において、組成物は更に、1 以上の E A C 保護剤を含む。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、C M V、C A G、M N D U 3、P G K または E F 1 a プロモーター・シーケンスの上流に位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、C M V、C A G、M N D U 3、P G K または E F 1 a プロモーター・シーケンスに下流に位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは眼に特有のプロモーターの上流に位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、眼に特有のプロモーターに下流に位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、5' I T R シーケンスの 5' 終わりに位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、5' I T R シーケンスの 3' 終わりに位置します。いくつかの実施形態では、充填材シーケンスは、3' I T R シーケンスの 5' 終わりに位置します。いくつかの実施形態では

40

50

、充填材シーケンスは、3' ITRシーケンスの3'終わりに位置します。

【0123】

いくつかの実施形態では、充填材シーケンスの長さは約0.1 kb - 5 kbかもしれませんが、のような、しかし、0.1 kbに限定的でなかった、0.2 kb、0.3 kb、0.4 kb、0.5 kb、0.6 kb、0.7 kb、0.8 kb、0.9 kb、あるkb、1.1 kb、1.2 kb、1.3 kb、1.4 kb、1.5 kb、1.6 kb、1.7 kb、1.8 kb、1.9 kb、2 kb、2.1 kb、2.2 kb、2.3 kb、2.4 kb、2.5 kb、2.6 kb、2.7 kb、2.8 kb、2.9 kb、3 kb、3.1 kb、3.2 kb、3.3 kb、3.4 kb、3.5 kb、3.6 kb、3.7 kb、3.8 kb、3.9 kb、4.0 kb、4.1 kb、4.2 kb、4.3 kb、4.4 kb、4.5 kb、4.6 kb、4.7 kb、kb (4.8)、または、または。(4.9) (5.0 kb)

【0124】

幾つかの実施形態において、コーティングは更にポリマーを含む。ある場合には、イントロンが、転写されるかもしれないが翻訳されないあらゆるシーケンスを表すかもしれませんが。ある場合には、イントロンが、転写されるあらゆるシーケンスを表すかもしれませんが。細胞の成熟したRNA転写物から取り除かれます。ある場合には、イントロンが約少なくともあるbp、50 bp、100 bp、150 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1000 bp、2000 bp、3000 bp、4000 bpまたは5000 bpを含むかもしれませんが。ある場合には、イントロンが約300 bpかもしれませんが。ある場合には、イントロンが約200 - 400 bpかもしれませんが。ある場合には、イントロンが約100 - 500 bpかもしれませんが。ある場合には、イントロンが約50 - 200 bpかもしれませんが。ある場合には、イントロンが完全な自然発生のイントロンまたはキメラ的なイントロンのいずれかかもしれませんが。いくつかの実施形態では、イントロンはコドンに最適化された核酸配列の上流に位置します。いくつかの実施形態では、イントロンは、プロモーターに下流に位置します。いくつかの実施形態では、ヒドロゲルはさらに造影剤を含む。いくつかの実施形態では、調整する要素はTPL (アデノウイルスから三者間のリーダー配列) とeMLP (アデノウイルス・マヨール後期プロモーターからエンハンサーエレメント) シーケンスを含みます。いくつかの実施形態では、調整する要素はコドンに最適化された核酸配列の上流に位置します。幾つかの実施形態において、外部要素は機器の一部ではない。幾つかの実施形態では、組成物はリボソームを含む。いくつかの実施形態では、コザック配列はコドンに最適化された核酸配列の上流に位置します。いくつかの実施形態では、コザック配列は、イントロンに下流に位置します。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはヒト足場を付属の領域 (SAR) シーケンスを含みます。いくつかの実施形態では、SARシーケンスは、コドンに最適化された核酸配列に下流に位置します。いくつかの実施形態では、SARシーケンスはポリA信号の上流に位置します。

【0125】

システム

別の態様では、本の開示は、本明細書に開示されたrAAV粒子を含むその必要性のある対象、薬学的に許容可能な担体または賦形剤の眼疾患を処置するためにシステムを提供します。

【0126】

本明細書で使用されるように、「薬学的にまたは治療的に許容可能な担体」とは、活性成分の生物学的活性の有効性に干渉せず、宿主または患者に毒性ではない担体媒体を指す。医薬製剤における用いられる担体の型は、治療の化合物の投与のどの方法が用いられるかに左右されるでしょう。様々な投与経路のために医薬組成物を調製する多くの方法が当該技術分野で周知である。「薬学的に許容可能な眼の担体」は、眼に、の上でまたはの近くで本明細書に直接にまたは間接的に発表されるようなrAAVウイルス粒子を送達するた

めに用いることができる、薬学的に許容可能な担体または賦形剤を表します。

【0127】

いくつかの実施形態では、システムは、適切な溶媒における本明細書に開示された r A A V ウイルス粒子を溶かすことにより調製されています。適切な溶媒は含むが、給水するために限定的ではありません、食塩水（例えば NaCl）、緩衝液または他の溶媒。特定の実施形態において、溶媒は THF である。

【0128】

システムの調製における用いられる懸濁の水溶液と希釈剤は、蒸留水または生理的塩類を含むかもしれません。様々な添加物は含むことができます。これらの添加物は接触または過度の毒性、不適合性、不安定性、刺激、アレルギーを伴わない眼のまわりの使用のために適している追加の成分、添加物または担体を含むかもしれません。典型的な添加物は溶媒、塩基、共同溶媒、懸濁化剤、シクナー、乳化剤、スタビライザー、緩衝剤、等張性アジャスター、pH アジャスター、キレート剤、無痛化剤、保存剤、香料、香料、着色剤、賦形剤、結合剤、潤滑剤、界面活性剤、吸収促進剤、分散剤、保存剤と可溶化剤を含みます。

【0129】

例えば、緩衝剤は、pH を一定に保つために加えられ、ホウ酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、酒石酸塩緩衝液、リン酸塩緩衝液、酢酸緩衝液、またはトリス - HCl 緩衝液（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンと HCl を含む）などの薬学的に許容可能な緩衝剤を含むことができる。

【0130】

緩衝剤に加えて、裂け目に等張の調製を調製するために、等張の作用薬はシステムに付加かもしれません。等張化剤としては、限定されないが、デキストロース、グルコース、スクロース、およびフルクトースなどの糖；マンニトールとソルビトールなどの糖アルコール；グリセリン、ポリエチレングリコールとプロピレングリコールなどのポリオール；ならびに、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム、塩化エフェドリン（ephedrine）、塩化カリウム、塩化プロカイン、クロラムフェニコール、およびコハク酸ナトリウムなどの塩が挙げられる。等張の作用薬は、目薬の浸透圧が裂け目の浸透圧に等しい量における付加です。

【0131】

上記のものに加えて、いくつかの実施形態では、限定されないが以下を含む追加薬剤を使用することが望ましい：亜硫酸ナトリウム、安定化剤、炭酸ナトリウム、およびプロピレングリコールなどの安定化剤；アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、トコフェロール、チオ硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；および / または、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、エチレングリコール - ビス - （2 - アミノエチル） - N, N, N, N - 四酢酸、およびクエン酸ナトリウムなどのキレート剤。

【0132】

本明細書に開示されたシステムは、無菌の手順による調製することができるか、または調製の適切な病期で代わりに殺菌することができます。例えば、システムは無菌的に無菌の成分を混合することにより調製することができます。代替的に、滅菌医薬組成物は、最初に材料を混合し、次いで最終的な調製物を滅菌することにより調製され得る。滅菌方法は、限定されないが、加熱滅菌、照射、及び濾過を含む。

【0133】

本明細書に開示された r A A V ウイルス粒子も、他の治療剤と結合して提供することができます。様々な実施形態では、本明細書に開示された化合物も、目の治療剤と結合して提供されるかもしれません、Acular（ケトプロフェン・トロメタミン点眼剤）から 0.5% 構成される群と Acuvail（ketorolactrometamin）、AK コンカナバリン A（ナファゾリン目薬）、Akten（塩酸リドカイン）、Alamast、Alphagan（bromidine）、Alrex、Astepro（塩酸）アゼラ

10

20

30

40

50

スチン鼻内噴霧、AzaSite (アジスロマイシン)、Bepreve (ベシル酸ベポタスチン点眼剤) から選択した、Besivance (besifloxacin眼科用懸濁液剤)、Betaxon、BSSの無菌の洗浄解決、Cosopt、Durezol (ジフルブレドナート)、Eylea (Abercept)、Lotemax、Luce ntis (ranibizumab)、Lumigan (bimatoprost点眼剤)、Macugen (pigatinib)、Ocuflox (oxyflurane) Saxine点眼剤0.3%、OcuHist、Ozurdex (デキサメサゾン)、Q uixin (レボフロキサシン)、レスキュラ (unoprostoneイソプロピル点眼剤) 0.15%、Restasis (シクロスポリンの眼のエマルジョン)、Sala genタブレット、Travatan (travoprost点眼剤)、Valcyte 10 (valganciclovir塩酸塩)、トリフルオロサイミジン (Viroptic)、Vistide (cidofovir)、ビスダイン (注入のverteporfin)、Vitraserit植込剤、formamivir注入、ZADITOR、Zio ptan (tafluprost点眼剤)、Zirgan (ガンシクロピルの眼のゲル)、Zymaxid (gatifloxacin点眼剤)、アトロピン、フルルビプロフェン、Physostigmine、Azopt、ゲンタミシン、プロパラカイン、バシトラ シン、Hypromellose点眼薬 (Goniosol)、ポリミキシンB、ポビド ンヨード (ベータダイン)、グラミシジン、ブレドニゾロン、betaxolol、Hu morsol、promethaine、betaxolol目薬 (ベトプティック)、20 Hylartin、贈り物、brinzolamide、高張性のNaCl、Pural ube、BSS、Indocyanineグリーン、ローズベンガル、カルバコール、イトラコナゾール、ヒアルロン酸ナトリウム、セファゾリン、ラタノプロスト、Sulo fen、Xiao Celluvisc、マンニトール、オキシテトラサイクリン、クロ ラムフェニコール、メタゾルアミド、眼球内血圧液圧減退剤、Ciloxan、ミコナゾール、トブラマイシン、シプロフロキサシン、Miostat、トリアムシノロン、Co sopt、Muro 128、trifluorouridine、デメカリウム、ネオ マイシン、topiramate、デキストラン・デキサメサゾン、ネプタザン、トルソ プト、Dipicolin、Ocuflox、(アデノシン)アラビノシッド。オフロキ サシン、ピラ-A、エピネフリン、オキシテトラサイクリン、トリフルオロサイミジン、30 蛍光フェニレフリンとキサラン)

【0134】

典型的な薬物は、血液造成阻害剤、anecotastat、トロンボスポンジン、V EGFレセプタ・チロシンキナーゼ阻害剤などの抗血管原性の作用薬を含むかもしれま せん；ranibizumab、ベバシズマブ、pegaptanib、sunitinibとsorafenibなどの抗血管内皮細胞増殖因子 (抗VEGF) 薬物と血管形成の 他の既知の小さな分子と転写阻害剤；アドレナリン作動性拮抗薬 (例えばacetbut olol、アテノロール、bisoprolol、カルベジロール、asmolol、ラ ベタロール、ナドロール、ペンブトロール、ピンドロール、プロプラノロール、meti pranolol、betaxolol、カルテオロール、levobetaxolol 40、levobunololと眼球内血圧液圧減退剤などの - 遮断薬；) などの緑内障作 用薬を含む点眼薬エピネフリン、dipivefrin、クロニジン、aparclo nidineとbrimonidineなどのアドレナリン作用のアゴニストまたは交感神 経興奮剤；ピロカルピン、カルバコール、ホスホリン・ヨウ素、フィゾスチグミン、サリ チル酸、塩化アセチルコリン、エゼリン、ジイソプロピルフルオロホスファート、臭化デ メカリウムなどの副交感神経興奮薬またはコリン作用性リセプタのアゴニスト；ムスカリ ン；acetazolamide、brinzolamide、dorzolamide、メタゾルアミド、ethoxzolamide、ダイアモックスとジクロルフェナミド などの地方の作用薬および/または全身の作用薬を含む炭酸脱水酵素阻害薬作用薬 () ア 50 トロピン、シクロペントレート、サクシニルコリン、ホマトロピン、フェニレフリン、ス コポラミンとトロピカミドなどの瞳孔拡大の毛様体筋麻痺の作用薬；プロスタグランジン

F 2 、抗プロスタグランジン、プロスタグランジン前駆体などのプロスタグランジン；または *bimatoprost*、ラタノプロスト、*travoprost* と *unoprostone* などのプロスタグランジン・アナログ作用薬。

【0135】

追加の典型的な薬物は、また例えば、グルココルチコイドと、ベタメタゾン、コルチゾン、デキサメサゾン、デキサメサゾン 21 のリン酸塩、メチルプレドニゾロンなどのコルチコステロイドを含む抗炎症薬を含むかもしれません。(プレドニゾロン 21 のリン酸塩、酢酸プレドニゾロン、プレドニゾロン、*flumiron*、*loteprednol*、メチルプレドニゾロン)(フルオシノロン、トリアムシノロン、トリアムシノロン、トリアムシノロン酢酸塩、ベクロメタゾン、ブデソニド、フルニソリド、フルメタゾン、*fluticasone*、フルドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、*loteprednol*、*rimetholone*) 非ステロイド系抗炎症薬、含んでいること、アスピリン、ジクロフェナク、フルルビプロフェン、イブプロフェン、*bromfenac*、*nepafenac*、ケトプロフェン、サリチラート、インドメタシン、*naxopren*、ピロキシカム、ナブメトン・ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、塩素酸塩、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメトン、オキサプロジン、ピロキシカム、*disalicylate*、スリンダクおよびトルメチン；*celecoxib*、ロフェコキシブと *valdecoxib* などの COX - 2 インヒビター；抗生物質(例えばテトラサイクリン、クロールテトラサイクリン、バシトラシン、ネオマイシン、ポリミキシン、*brevibacillin*、セファレキシン、オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール)、リファンピシン、シプロフロキサシン、トブラマイシン、ゲンタミシン、エリスロマイシン、ペニシリン、スルホンアミド、スルファダイアジン、スルファセタミド、スルファメトキサゾール、スルフイソキサゾール、ニトロフラゾン、プロピオン酸ナトリウム、ゲンタミシンなどのアミノグリコシド、トブラマイシン、アミカシンとストレプトマイシンなどの抗感染症または抗微生物薬；シプロフロキサシン、*gatifloxacin*、レボフロキサシン、*moxifloxacin*、ノルフロキサシン、オフロキサシンなどのフルオロキノロン；バシトラシン、エリスロマイシン、フシジン酸、ネオマイシン、ポリミキシン B、グラミシジン、アルファ *oxybenzidine* と *sulfamethoxamide*；アムホテリシン B、*caspofungin*、クロトリマゾール、フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール、*voriconazole*、テルビナフィン、ナイスタチンとミコナゾールなどの抗真菌物質；クロロキン、*atovaquone*、メフロキン、プリマキン、キニジンとキニーネなどの抗マラリア剤；エタンブトール、イソニアジド、ピラジナミド、リファンピンと *Rifabutin* などの抗ミコプラズマ菌の作用薬；アルベンダゾール、メベンダゾール、*thiobendazole*、*bisazolate* 坐薬、*thiuracil*、*atovaquone*、*iodoquinol*、イベルメクチン、パロモマイシン、ブラジカンテルと *trimatrexate* などの駆虫剤。

【0136】

方法

別の態様では、本の開示は、細胞または細胞または対象の組織へ組成物、rAAV 粒子、ポリヌクレオチドまたは本明細書に開示されたシステムのうちのいかなるものでも投与することを含む対象の組織の VEGF 阻害剤を示す方法を提供します。いくつかの実施形態では、組成物、rAAV 粒子、ポリヌクレオチドまたはシステムは当技術における既知のあらゆる適切な方法による対象に投与されるかもしれません。いくつかの実施形態では、細胞または組織は関連する眼です。いくつかの実施形態では、組成物、rAAV 粒子、ポリヌクレオチドまたはシステムは結膜下か、眼球後か、*periocular*、網膜下か、*suprachoroidal* か、眼内の経路による眼に適用することができます。

【0137】

別の *aspect* における、本の開示は、処置する目の疾患の方法を提供する、治療上

有効な量の組成物、rAAV粒子、ポリヌクレオチドまたは必要性への対象に本明細書に発表されたシステムを投与することを含みます。

【0138】

いくつかの実施形態では、システムは当技術における既知のあらゆる適切な方法による対象に投与されるかもしれません。いくつかの実施形態では、システムは結膜下か、眼球後か、periocular、網膜下か、suprachoroidalか、眼内の経路による眼に適用することができます。

【0139】

いくつかの実施形態では、目の疾患は含みます、しかし制限されない、加齢黄斑変性症（AMD）、滲出型AMD、萎縮型AMD、網膜新生血管、脈絡膜の新血管新生、糖尿病性網膜症、増殖性糖尿病性網膜症、網膜静脈閉塞、網膜中心静脈閉塞症、枝分かれさせられた網膜静脈閉塞、糖尿病の黄斑の浮腫、糖尿病の網膜虚血、虚血の網膜症、および糖尿病の網膜浮腫。

【0140】

いくつかの実施形態では、rAAVウイルス粒子を含むシステムは、医学的に毒性の合格水準で希望の生物学的作用を達成する、治療上有効な量における提供されます。組成物の量は、投与経路とその病気の重症度に依存して変動することもある。投与量は処置される各患者の体重、年齢、性別、および/または症状の程度に依存して調節されてもよい。患者の年齢と重量と、処置される条件の厳しさに応じて量のルーチン変化が作られる必要があるかもしれないことが理解されます。

【0141】

いくつかの実施形態では、治療上有効な量が、 1×10^5 - 1×10^{13} rAAVウイルス粒子に一般に関係しています。いくつかの実施形態では、治療上有効な量が、 1×10^6 - 1×10^{12} rAAVウイルス粒子に一般に関係しています。いくつかの実施形態では、治療上有効な量が、 1×10^7 - 1×10^{12} rAAVウイルス粒子に一般に関係しています。いくつかの実施形態では、治療上有効な量が、 1×10^8 - 1×10^{12} rAAVウイルス粒子に一般に関係しています。いくつかの実施形態では、治療上有効な量が、 1×10^9 - 1×10^{12} rAAVウイルス粒子に一般に関係しています。いくつかの実施形態では、治療上有効な量が、 1×10^{10} - 1×10^{12} rAAVウイルス粒子に一般に関係しています。

【0142】

いくつかの実施形態では、送達された体積は1つの眼当たり約0.005のmL - 0.5 mLです。いくつかの実施形態では、送達された体積は1つの眼当たり約0.05のmL - 0.5 mLです。いくつかの実施形態では、送達された体積は1つの眼当たり約0.1のmL - 0.5 mLです。いくつかの実施形態では、送達された体積は1つの眼当たり約0.2のmL - 0.5 mLです。

【0143】

いくつかの実施形態では、投与の度数は、少なくとも一度1日当たり2、3、4、または5倍を含む1日かもしれません。代替的に、処置レジメンは、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、32日、33日、34日、35日、36日、37日、38日、39日、40日、41日、42日、43日、44日、45日、46日、47日、48日、49日、50日、60日、70日、80日、90日、100日、150日、200日、250日、300日、400日、500日、750日、1000日、または1000日以上にわたって続くことがある。

【0144】

いくつかの実施形態では、rAAV粒子またはポリヌクレオチドの投与はまた生体外の投与を含むことができます。いくつかの実施形態では、生体外の投与は、対象へ(1)対象から興味のある細胞または組織の隔離、十分なレベルの遺伝子移入と不適当な悪影響を

10

20

30

40

50

伴わない発現を提供する細胞または組織をトランスフェクトするために(2)細胞または組織を十分な量におけるrAAVsに接触させること(3)移る細胞、または組織を後ろに含みます。いくつかの実施形態では、細胞または組織は培養されているかもしれませんが、数日の間体外、の前に、および/またはトランスフェクションの後に。いくつかの実施形態では、細胞または組織は関連する眼です。

【0145】

別のaspectでは、本の開示は、組成物、rAAV粒子、ポリヌクレオチドまたは本明細書に開示されたシステムのうちのどれかを有する細胞をトランスフェクトすることを含む組み換えのアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子を調製する方法を提供します。幾つかの実施形態において、宿主細胞は原核細胞又は真核細胞である。幾つかの実施形態において、細胞は分裂細胞である。幾つかの実施形態において、宿主細胞は原核細胞又は真核細胞である。幾つかの実施形態において、細胞は分裂細胞である。いくつかの実施形態では、方法はbacmid DNAおよび/またはバキュロウィルスを生成することを含みます。いくつかの実施形態では、方法はVEGF阻害剤発現シーケンス(本明細書に開示されたポリヌクレオチドのような)を含むbacmid DNAを生成することを含みます。いくつかの実施形態では、方法はbacmid DNA rAAVキャップ・レプ発現シーケンスを生成することを含みます。いくつかの実施形態では、方法は、バキュロウィルスを生成するためにbacmid DNAを有する細胞をトランスフェクトすることを含みます。いくつかの実施形態では、方法はバキュロウィルスを生成するためにVEGF阻害剤発現シーケンスを含むbacmid DNAを有する細胞をトランスフェクトすることを含みます。いくつかの実施形態では、方法は、rAAVキャップ・レプ発現シーケンスを含むバキュロウィルスを生成するためにbacmid DNAを有する細胞をトランスフェクトすることを含みます。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に開示された、パッケージにされたrAAV/VEGF阻害剤ウイルス粒子を得るために細胞(Sf9細胞のような)を感染させるためにバキュロウィルスを混合することをさらに含みます。

【0146】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示された組成物または本明細書に開示されたポリヌクレオチドは、当技術における既知のあらゆる方法による細胞へ送達することができます。いくつかの実施形態では、方法は含むが、エレクトロポレーションに限定的ではありません、リン酸カルシウム沈澱反応、およびリポソーム調停しました。いくつかの実施形態では、組成物またはポリヌクレオチドは、細胞へ安定してトランスフェクトされます。いくつかの実施形態では、組成物またはポリヌクレオチドは、細胞へ一時的にトランスフェクトされます。リポソーム、ナノカプセル剤、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞等などの伝達手段は、ベクター、組成物または細胞へポリヌクレオチドの導入のために用いられてもよい。特に、ベクター、組成物またはポリヌクレオチドは、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノ球体またはナノ粒子におけるカプセルに入れられた送達のための処方されるかもしれません。キット

【0147】

他方では、本の開示は眼疾患を処置するためにキットを提供します。それはrAAV粒子または本明細書に開示されたシステムと指示を含みます。いくつかの実施形態では、指示は目の疾患を処置するためにrAAV粒子またはシステムを投与する方法を示すために用いられます。

【0148】

幾つかの実施形態において、コーティングは更にポリマーを含む。いくつかの実施形態では、包装容器は本明細書に記載されたシステムを送達するように構成されます。いくつかの実施形態では、包装容器はバイアル、滴瓶、ボトル、チューブと注射器を含みます。特定の実施形態において、容器は、点眼剤を投与するための滴瓶である。特定の実施形態において、容器は、点眼剤を投与するための滴瓶である。

【0149】

10

20

30

40

50

本発明の幾つかの実施形態は、制限されるものとして解釈されるべきでない、以下の実施例により更に例示される。当業者は、実施形態のインプリメンテーションの中でうまくいくために、発明者が見つけた技術が本明細書に記述し従って、これらの実施形態をインプリメントするために用いられるものを構成すると考えることができる、と次の実施例において開示された技術が相当すると理解するでしょう。しかしながら、本の開示に基づいて、当業者は、本の発明の趣旨と範囲から外れずに、本明細書に開示された、特有の実施形態と同様なおける多くの変化を行なうことができるか同様の結果を今までどおり得ることができる、と理解するでしょう。

【実施例】

【0150】

10

次の実施例はさらに発明を説明します。これらの実施例は、単に本の発明を説明するように意図され、本の発明の制限として解釈されるべきではありません。

【0151】

実施例1 組み換えのAAVベクターの設計

それらの対応するプロモーターと共にAAV2から誘導したキャップおよびレプの暗号配列は、pUC57 (pFastBac1)へ合成されクローンを作られたか、またはpUC57を修飾したか、キャップおよびレプのタンパク質の暗号配列を含む最初のポリヌクレオチドを得るためにpFastBac1を修飾しました。

【0152】

緑の蛍光性のタンパク質 (GFP) をエンコードするヌクレオチド配列またはVEGF阻害剤afliberceptをエンコードする核酸配列は、pUC57 (pFastBac1)へ合成されクローンを作られたか、またはそれぞれ、pUC57を修飾したか、GFPまたはAfliberceptの暗号配列を含んでいる別のポリヌクレオチドを得るためにそれらの対応するプロモーターを有するpFastBac1を修飾しました。第2のポリヌクレオチドのconstructの設計は表2の中で見つけることができます。

【0153】

20

30

40

50

【表 2】

Table 2. Construct Design

Construct No.	Construct Design
1	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co1-SAR-hGHpA
2	CAG-Aflibercept-co1-SV40pA
3	CAG-Aflibercept-co1-rbGlobpA
4	MND-Aflibercept-co1-SV40pA
5	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co2-SAR-hGHpA
6	CAG-Aflibercept-co2-SV40pA
7	CAG-Aflibercept-co2-rbGlobpA
8	MND-Aflibercept-co2-SV40pA
9	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co3-SAR-hGHpA
10	CAG-Aflibercept-co3-SV40pA
11	CAG-Aflibercept-co3-rbGlobpA
12	MND-Aflibercept-co3-SV40pA
13	CMVep-TPL-eMLP-GFP-SAR-hGHpA-Stuffer
14	CAG-GFP-SV40pA-Stuffer
15	CAG-GFP-rbGlobpA-Stuffer
16	MND-GFP-sv40pA-Stuffer
17	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA
18	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA (scAAV)
19	MND-sv40i-GFP-sv40pA-Stuffer
20	MND-sv40i-GFP-sv40pA-Stuffer (scAAV)

10

20

30

【0154】

「co」は、「最適化されたコドン」を表します。例えば、「co1」はコドンに最適化されたシーケンス#1を表します。「CMVep」はCMVエンハンサーとプロモーターを表します。「sv40i」はシミアンウイルス40イントロンを表します。

40

【0155】

実施例2 プラスミド・トランスフェクション

発現激しさを測定するために、設計された、構築する、2個の×105 HEK293T細胞が接種されました、1つの、24-よく、プレート、および培養した、夜通し。各発現の0.5μgがプラスミドを構築します、1.5のμL Mirus TransT-VirusGEN(r)トランスフェクション試薬に混合された、につき、50のμL Opti-Mem媒体(DNA: Mirus試薬(ul) = 1:3(ug))におけるよく。48時間の後、GFPの発現は、細胞が発現カセットを有する成功裡にトランス

50

フェクトされたことを示唆して、蛍光顕微鏡とフロー血球計（図 1 A と 1 B）による検出されました。表面に浮かぶ培地は 48 時間後に a f l i b e r c e p t 検知のための収穫されました。

【 0 1 5 6 】

実施例 3 組み換え A A V ウイルス粒子の調製

実施例あるにおいて得られた最初のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドは組成物と助手プラスミドと組成物を形成するために混合されました、パッケージにされた r A A V 2 . 7 m 8 / A f l i b e r c e p t ウイルス粒子と r A A V 2 . 7 m 8 / G F P ウイルス粒子を得る H E K 2 9 3 T 細胞をトランスフェクトするために用いられました。A A V 技術への b a c による A A V 粒子を生成することができるかもしれませんが、つまり、最初に 2 つの b a c m i d s の含んでいるレブ・キャップとトランスジーン発現カセットをそれぞれ生成し、次に、これらの 2 b a c m i d s のバキュロウィルス生成する、S f 9 細胞のレブ・キャップとトランスジーン発現バキュロウィルスの両方を感染させることにより、r A A V を生成することができるかもしれません。組み換えの A A V 2 . 7 m 8 / A f l i b e r c e p t ウイルス粒子と A A V 2 . 7 m 8 / G F P ウイルス粒子は、勾配超遠心分離を用いて、H E K 2 9 3 T 細胞から分離され精製されました。

10

【 0 1 5 7 】

実施例 4 トランスフェクトされた細胞から A f l i b e r c e p t の発現レベル

細胞培養上澄液への A f l i b e r c e p t の発現レベルは定量的 E L I S A による測定されました。E L I S A プレートは 100 を有するコートされました、u L / 緩衝剤のコートにおいてある u g / m L の濃縮で組み換えのヒト V E G F A (r h V E G F A) によく、および 4 ° C で夜通し培養しました。洗濯緩衝剤を有する洗った後に、プレートは 300 を有するブロックされました、u L / タンパク質なしのブロッキング緩衝剤によく。後で、プレートは洗浄されました。そして、試料は 1 : 1000 希釈で付加で (100 u L / ウェル)、室温で 2 時間で培養されました。その後、プレートは再び洗浄されました、および 100、u L / よく、I g G (F c) の抗ヒト F c 領域に、P B S の中で B S A における 500 n g / m L でホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (H R P) にある % 変化する - 特異抗体は、ウェルに付加でした。洗浄の後に、100、u L / よく、S u p e r S i g n a l E L I S A ピコに、化学発光の基質はウェルに付加でした。そして、ルミネセンス信号はマイクロプレート・リーダーを用いて測定されました。結果を表 8 に示す。

20

30

【 0 1 5 8 】

40

50

【表 3】

Table 3. ELISA Data

Construct No.	Construct Design	Aflibercept concentration (ng/ml) n=3
1	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co1-SAR-hGHpA	A
2	CAG-Aflibercept-co1-SV40pA	B
3	CAG-Aflibercept-co1-rbGlobpA	A
4	MND-Aflibercept-co1-SV40pA	C
5	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co2-SAR-hGHpA	B
6	CAG-Aflibercept-co2-SV40pA	C
7	CAG-Aflibercept-co2-rbGlobpA	B
8	MND-Aflibercept-co2-SV40pA	C
9	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co3-SAR-hGHpA	A
10	CAG-Aflibercept-co3-SV40pA	B
11	CAG-Aflibercept-co3-rbGlobpA	A
12	MND-Aflibercept-co3-SV40pA	C
13	CMVep-TPL-eMLP-GFP-SAR-hGHpA-Stuffer	D
14	CAG-GFP-SV40pA-Stuffer	D
15	CAG-GFP-rbGlobpA-Stuffer	D
16	MND-GFP-sv40pA-Stuffer	D
17	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA	C
18	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA (different ITRs)	C
19	MND-sv40i-GFP-sv40pA-Stuffer	D
20	MND-sv40i-GFP-sv40pA-Stuffer (scAAV)	D

10

20

30

【0159】

生化学的アッセイIC50データは以下の範囲内に指定される：Aflibercept濃縮（ng/ml）：15,000 B 10,000 C 1000 D

【0160】

実施例5 rAAVからAfliberceptの活性レベル

HUVEC増殖反応測定法は293T細胞のrAAV形質導入の後に示されたafliberceptの活動レベルを測定するために利用されました。特に、ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）懸濁が投薬された100μl、基本培地（約5000、細胞/よく）における、1つの、96-よく、プレート。96ウェルのプレートを、48時間インキュベートした。表面に浮かぶ試料の100x希釈、ある時間基本培地におけるVEGF（80ng/ml）を有する調製され、かえされた。希釈の100μlがHUVECへ付加でした。プレートは4日間培養されました。細胞計測キット-8（CCK-8）解決の20μlが、プレートに各々によく付加でした。プレートを暗所で4時間インキュベートした。プレートを450nmで読み取った。

40

【0161】

HUVECの上のafliberceptの抑制する活動は次の方程式に基づいてcalculatedされました：阻害% = $\frac{OD(GFP抑制) - OD(ブランク)}{OD(GFP抑制) - OD(試料)} \times 100\%$

【0162】

50

当業者による感謝されるように、非放射性の C C K - 8 は細胞増殖への生細胞の数の決定の高感度な比色測定法を許可します。そして、細胞傷害性は分析します。オレンジの有色の生成物（ホルマザン）を与えるために、W S T - 8 は細胞の脱水素酵素による低減されます。それは組織培養培地において可溶です。生成されたホルマザンの量は生細胞の数に正比例し、460nmで吸収率による測定されます。細胞計測キット8（W S T - 8 / C C K 8）（a b 2 2 8 5 5 4）は、細胞の生存率アッセイを果たす便利で丈夫な面を提供します。キットは、電子伝達体が存在する状態の中でバイオ低減上のオレンジのホルマザン染料を生成することにより、ライブ細胞の数の量を計るために水溶性のテトラゾリウム塩を用います。

【0163】

結果は、分泌された a f l i b e r c e p t が V E G F に引き起こされた H U V E C 増殖を抑制したことを示しました。言い換えれば、分泌された a f l i b e r c e p t は保持しました、生物学的に、活動。結果を表4に示す。

【0164】

【表4】

Table 4. HUVEC Proliferation Assay Data

Construct No.	Construct Design	Inhibition of HUVEC cell proliferation, n=9
1	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co1-SAR-hGHpA	A
2	CAG-Aflibercept-co1-SV40pA	B
3	CAG-Aflibercept-co1-rbGlobpA	A
4	MND-Aflibercept-co1-SV40pA	D
5	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co2-SAR-hGHpA	A
6	CAG-Aflibercept-co2-SV40pA	B
7	CAG-Aflibercept-co2-rbGlobpA	B
8	MND-Aflibercept-co2-SV40pA	D
9	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co3-SAR-hGHpA	A
10	CAG-Aflibercept-co3-SV40pA	A
11	CAG-Aflibercept-co3-rbGlobpA	A
12	MND-Aflibercept-co3-SV40pA	D
13	CMVep-TPL-eMLP-GFP-SAR-hGHpA-Stuffer	D
14	CAG-GFP-SV40pA-Stuffer	D
15	CAG-GFP-rbGlobpA-Stuffer	D
16	MND-GFP-sv40pA-Stuffer	D
17	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA	B
18	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA (scAAV)	B
19	MND-sv40i-GFP-sv40pA-Stuffer	D
20	MND-sv40i-GFP-sv40pA-Stuffer (scAAV)	D

【0165】

生化学的アッセイ I C 5 0 データは以下の範囲内に指定される：H U V E C 細胞増殖の阻害： 4 0 B 2 5 C 1 0 D

【0166】

実施例6．生体外の A A V 感染症

6 個の × 1 0 5 細胞 / m L 2 9 3 T 細胞（6 × 1 0 4 / よく）の 1 0 0 u L、種は

10

20

30

40

50

、DMEM完全培地における各々よくまかれた、における、1つの、96 - よく、プレート。細胞はある時間培養されていました。次に、媒体が切り捨て。MOI 5.56 × 10³ および 1.67 × 10⁴ の 7 m 8 AAVベクターを有する30のuL DMEM完全培地が、各々によく付加で、夜通し培養しました。MOIは飛沫デジタルPCR (ddPCR) 滴定濃度に基づいて計算されました。明日、70のuL DMEM完全培地が付加でした。細胞は全体において48時間培養されていました。

【0167】

次に、細胞培養上澄液へのAfliberceptの発現レベルは定量的ELISAによる測定されました。ELISAプレートは100を有するコートされました、uL / 緩衝剤のコートにおいてあるug / mLの濃縮で組み換えのヒトVEGFA (rhVEGFA) によく、および4 ° Cで夜通し培養しました。洗濯緩衝剤を有する洗った後に、プレートは300を有するブロックされました、uL / タンパク質なしのブロッキング緩衝剤によく。後で、プレートは洗浄されました。そして、試料は1 : 1000希釈で付加で (100 uL / ウェル)、室温で2時間で培養されました。その後、プレートは再び洗浄されました、および100、uL / よく、IgG (Fc) の抗ヒトFc領域に、PBSの中でBSAにおける500 ng / mLでホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) にある%変化する - 特異抗体は、ウェルに付加でした。洗浄の後に、100、uL / よく、SuperSignal ELISAピコに、化学発光の基質はウェルに付加でした。そして、ルミネセンス信号はマイクロプレート・リーダーを用いて測定されました。結果を表5に示す。

【0168】

【表5】

Table 5. Aflibercept ELISA data

Construct No.	Construct Design	Aflibercept concentration (ng/ml) n=4, MOI=1.67E+4	Aflibercept concentration (ng/ml) n=4, MOI= 5.56E+3
1	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co1-SAR-hGHpA	A	A
2	CAG-Aflibercept-co1-SV40pA	B	C
3	CAG-Aflibercept-co1-rbGlobpA	A	A
9	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co3-SAR-hGHpA	A	A
10	CAG-Aflibercept-co3-SV40pA	D	C
11	CAG-Aflibercept-co3-rbGlobpA	A	A
15	CAG-GFP-rbGlobpA-Stuffer	D	D
17	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA	A	C
18	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA (scAAV)	A	C

【0169】

生化学的アッセイIC50データは以下の範囲内に指定される：左のカラム (MOI = 1.67Eの+4)、Aflibercept濃縮 (ng / ml) のための： 3, 000 B 2, 000 C 1, 000 D ; 正しいカラム (MOI = 5.56Eの+3)、Aflibercept濃縮 (ng / ml) のための： 1, 500 B 1, 000 C 500 D。

【0170】

実施例7 rAAVからAfliberceptの活動の測定

20のuL DMEM完全培地 (2つのug / mL VEGFを含んで) を有する表面に浮かぶ試料が調合されたafliberceptの20 uL、およびある時間かえさ

れました。試料希釈の25 uLが、製造のVEGF生物検定(Promega GA2001)の指示によるあらかじめめっきした細胞の25 uLに分配されました。Afliberceptの活動は次の方程式に基づいてcalculatedされます：阻害 = RLU / RLU (細胞だけ - 背景) (細胞だけ - アッセイ試料) を折り重ねます。(RLU：相対的な軽い単位)

【0171】

rAAVから発現されたafliberceptによるVEGFの阻害の結果は、培養液上清への分泌されたafliberceptが生物学的に活発であることを示唆しました。データを表2に示す。

【0172】

【表6】

Table 6. Aflibercept Activity Data

Construct No.	Construct Design	Inhibition of VEGF (Luciferase-reporter) n=4, MOI=1.67E+4	Inhibition of VEGF (Luciferase-reporter) n=4, MOI=5.56E+3
1	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co1-SAR-hGHpA	A	A
2	CAG-Aflibercept-co1-SV40pA	C	D
3	CAG-Aflibercept-co1-rbGlobpA	A	A
9	CMVep-TPL-eMLP-Aflibercept-co3-SAR-hGHpA	A	B
10	CAG-Aflibercept-co3-SV40pA	C	D
11	CAG-Aflibercept-co3-rbGlobpA	A	D
15	CAG-GFP-rbGlobpA-Stuffer	D	D
17	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA	D	D
18	MND-sv40i-Aflibercept-co1-sv40pA (scAAV)	D	D

【0173】

生化学的アッセイIC50データは以下の範囲内に指定される：左のカラム(MOI = 1.67Eの+4)、VEGF(ルシフェラーゼ・リポーター)の阻害のための：60 B 40 C 20 D；正しいカラム(MOI = 5.56Eの+3)、VEGF(ルシフェラーゼ・リポーター)の阻害のための：35 B 25 C 15 D。マウスへのVEGF阻害剤の

【0174】

実施例8 送達と発現

マウスは2つの群へ分割されます：対照群および目標実験群。両方の群におけるマウスは、実施例3において精製されたAAV2.7m8/VEGF阻害剤のウイルス粒子をintravitreallyにそれぞれ注入されます。眼組織はELISAによるafliberceptの測定濃縮に集められます。

【0175】

実施例9 生体内の本の適用の組成物の有効性

レーザーに引き起こされた脈絡膜の新血管新生(LCNV)は、ぬれた加齢黄斑変性症の前臨床のモデルとして用いられる脈絡膜の血管形成のモデルです。2つの前臨床実験は、抑制(この適用の記載されたシステムの有効性を証明するためにこの適用のAAV2.7m8/VEGF阻害剤ウイルス粒子を含んでいるシステム)を用いて行なわれます。

【0176】

10

20

30

40

50

配列表

SEQ ID NO: 1	A f l i b e r c e p t の - アミノ酸配列順序	
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTS P N I T V T		
L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E		
A T V N G H L Y K T N Y L T H R Q T N T I I D V V L S P S H G I E L S V G E K L		
V L N C T A R T E L N V G I D F N W E Y P S S K H Q H K K L V N R D L K T Q S G		
S E M K K F L S T L T I D G V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K K N S T F V		
R V H E K D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R		
T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q		
Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A、L P A P I E K		10
T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P		
S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K		
S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G		
SEQ ID NO: 2	VEGFレセプタある (VEGFR1) 領域2 - VEGFレセ プタの - アミノ酸配列順序、2つの (VEGFR2) 領域3融合タンパク質	
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTS P N I T V T		
L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E		
A T V N G H L Y K T N Y L T H R Q T N T I I D V V L S P S H G I E L S V G E K L		
V L N C T A R T E L N V G I D F N W E Y P S S K H Q H K K L V N R D L K T Q S G		
S E M K K F L S T L T I D G V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K K N S T F V		20
R V H E D P I E G R		
SEQ ID NO: 3	VEGFレセプタある (VEGFR1) 領域2の - アミノ酸配 列順序	
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTS P N I T V T		
L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E		
A T V N G H L Y K T N Y L T H R Q T N T I I D		
SEQ ID NO: 4	VEGFレセプタ2 (VEGFR2) 領域3の - アミノ酸配列順序	
V V L S P S H G I E L S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I D F N W E Y P S S		
K H Q H K K L V N R D L K T Q S G S E M K K F L S T L T I D G V T R S D Q G L		
Y T C A A S S G L M T K K N S T F V R V H E D P I E G R		30
SEQ ID NO: 5	重鎖のCDR1の - アミノ酸配列順序	
G Y D F T H Y G M N		
SEQ ID NO: 6	重鎖のCDR2の - アミノ酸配列順序	
W I N T Y T G E P T Y A A D F K R		
SEQ ID NO: 7	重鎖のCDR3の - アミノ酸配列順序	
Y P Y Y Y G T S H W Y F D V		
SEQ ID NO: 8	軽鎖のCDR1の - アミノ酸配列順序	
S A S Q D I S N Y L N		
SEQ ID NO: 9	軽鎖のCDR1の - アミノ酸配列順序	
F T S S L H S		40
SEQ ID NO: 10	軽鎖のCDR2の - アミノ酸配列順序	
Q Q Y S T V P W T		
SEQ ID NO: 11	重鎖 (VH) の可変的な領域の - アミノ酸配列順序	
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y D F T H Y G M N W V R Q A		
P G K G L E W V G W I N T Y T G E P T Y A A D F K R R F T F S L D T S K S T A Y		
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K Y P Y Y Y G T S H W Y F D V W G Q G T L V T		
V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V		
T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G		
T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H L		
SEQ ID NO: 12	軽鎖 (VL) の可変的な領域の - アミノ酸配列順序	50

DIQLTQSPSSLSASVGD RVTITCSASQDISNYLNWYQQKP
 GKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
 EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPS VFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKS FNRGEC

SEQ ID NO: 13 - VEGFトラップ (a f l i b e r c e p t) 核酸配列
 (WO2005000895)

ATGGTCA GCTACTGGGACACCGGGGTCTCTGCTGTGCGCGCGC 10
 TGCTCAGCTGTCTGTCTGCTTCTCTCACAGGATCTAGTTTCCGGAAG
 TGATACCGGTAGACCTTTCTGTAGAGATGTACAGTGA AATC
 CCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCA
 TTCCCTGCGGGGTACGTCACTTAACATCACTGTT、ACTT
 TAAAAAAGTTTCCACTTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAA
 ACGCATATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTTCATCATATCA
 AATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGTACCTGTGAAG
 CAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCAC
 ACATCGACAAACCAATACAAATCATAGATGTGGTTCTGTAGT
 CCGTCTCATGTGAATTGAACCTATCTGTGTGGAGAAAAGCTTG 20
 TCTTAAATTGTACAGCAAGAACTGAACCTAAATGTGGGGAT
 TGACTTCAACTGGGAATACCTTCTTCTCG、AAGCATCAGCA
 TAAGAAACTTTGTAAACCGAGACCTAA AAAACCCAGTCTGGG
 AGTGAGATGAAGAAATTTTGTAGCACCTTAACCTATAGATG
 GTGTAAACCCGGAGTGACCAAGGATTTGTACACCTGTGCGAGC
 ATCCAGTGGGCTGTGTGACCAAGAAAGAACAGCACATTTGTCT
 AGGGTCCATGAAAAGGACAAAACTCACACATGCCCAACCGT
 GCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGGACCGTCTAGTCTTCTCT
 CTTCCCCCAAAAACCCAAAGGACACCTCATGTCTCCCGG
 ACCCTGTAGGTCTACATGCGTG、GTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCTGTAGGTCAAGTTTCAACTGGGTACGTGGACGGCG 30
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
 GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCTACCGGTC
 CTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
 CATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTG
 TACACCTGTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCC
 AGGTCAAGCCTGACC、TGCTGTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGGA
 GAACAACCTACAAGACCACGCTCTCCGTGTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA 40
 GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCTCATGTCTCCGTGAT
 GCATGAGGCTCTGCAACAACCACTACACGCGAGAAAGAGCCTC
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 14のa f l i b e r c e p tのコドンに最適化された#1 (Cp
 G計算 = 57)

ATGGT TTTCTTACTGGGATACCGGCGTGCTGTGTGTGCCC
 TGCTGTCTTGTCTGTCTGTGACCGGCTCTAGCAGCGGGCTC
 TGATACCGGCGAGACCTTCTGTGGAAATGTACAGCGAGATC
 CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCGAGAGAGCTGGTCA
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA 50

T G A A G A A G T T C C C T C T G G A C A C A C T G A T C C C C G A C G G C A A
G A G A A T C A T C T G G G A C A G C C G G A A G G G C T T C A T C A T C A G C
A A C G C C A C C T A C A A A G A G A T C G G C C T G C T G A C C T G T G A A G
C C A C C G T G A A T G G C C A C C T G T A C A A G A C C A A C T A C C T G A C
A C A C A G A C A G A C C A A C A C C A T C A T C G A C G T G G T G C T G A G C
C C T A G C C A C G G C A T T G A A C T G T C T G T G G G C G A G A A G C T G G
T G C T G A A C T G T A C C G C C A G A A C C G A G C T G A A C G T G G G C A T
C G A C T T C A A C T G G G A G T A C C C C A G C A G C、A A G C A C C A G C A
C A A G A A A C T G G T C A A C C G G G A C C T G A A A A C C C A G A G C G G C
A G C G A G A T G A A G A A A T T C C T G A G C A C C C T G A C C A T C G A C G 10
G C G T G A C C A G G T C T G A C C A G G G C C T G T A C A C A T G T G C C G C
C A G C T C T G G C C T G A T G A C C A A G A A A A A C A G C A C C T T C G T G
C G G G T G C A C G A G A A G G A C A A G A C C C A C A C C T G T C C T C C A T
G T C C T G C T C C A G A A C T G C T C G G C G G A C C T T C C G T G T T C C T
G T T T C C T C C A A A G C C T A A G G A C A C C C T G A T G A T C A G C A G A
A C C C C T G A A G T G A C C T G C G T G、G T G G T G G A T G T G T C C C A C
G A G G A T C C C G A A G T G A A G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G
T G G A A G T G C A C A A C G C C A A G A C C A A G C C T A G A G A G G A A C A
G T A C A A T A G C A C C T A C A G A G T G G T G T C C G T G C T G A C C G T G
C T G C A C C A G G A T T G G C T G A A C G G C A A A G A G T A C A A G T G C A 20
A G G T G T C C A A C A A G G C C C T G C C T G C T C C T A T C G A G A A A A C
C A T C T C C A A G G C C A A G G G C C A G C C C A G G G A A C C C C A G G T T
T A C A C A C T G C C T C C A A G C A G G G A C G A G C T G A C A A A G A A C C
A G G T G T C C C T G A C C、T G C C T G G T C A A G G G C T T C T A C C C T T
C C G A T A T C G C C G T G G A A T G G G A G A G C A A T G G C C A G C C T G A
G A A C A A C T A C A A G A C A A C C C C T C C T G T G C T G G A C A G C G A C
G G C T C A T T C T T C C T G T A C A G C A A G C T G A C A G T G G A C A A G A
G C A G A T G G C A G C A G G G A A A C G T G T T C A G C T G C A G C G T G A T
G C A C G A G G C C C T G C A C A A C C A C T A C A C C C A G A A G T C C C T G
A G C C T G T C T C C T G G C A A G T G A 30
S E Q I D N O : 1 5 の a f l i b e r c e p t の コ ド ン に 最 適 化 さ れ た # 2 (C p
G 計 算 = 5 4)
A T G G T C A G C T A T T G G G A T A C G G G G C G T C C T C C T T T G T G C C C
T T C T G A G T T G T C T C T T G T T G A C G G G A A G T A G T T C C G G A A G
T G A C A C T G G C C G A C C A T T T G T A G A A A T G T A C A G T G A G A T C
C C G G A A A T C A T C C A C A T G A C C G A A G G C C G G G A G T T G G T T A
T A C C A T G C C G G G T G A C A T C C C C G A A C A T T A C C G T T、A C A C
T G A A G A A A T T C C C A T T G G A C A C T T T G A T A C C T G A T G G A A A
G A G A A T C A T C T G G G A T T C C A G A A A A G G C T T T A T T A T C T C A
A A T G C T A C A T A C A A A G A A A T C G G T C T T C T T A C G T G T G A A G 40
C A A C C G T G A A T G G T C A T T T G T A C A A G A C T A A C T A C C T C A C
C C A C A G G C A G A C C A A T A C A A T A A T C G A C G T C G T T C T C A G C
C C C T C C C A C G G A A T T G A G C T T A G T G T G G G G G A G A A A T T G G
T C T T G A A T T G T A C C G C C C G G A C A G A G T T G A A T G T T G G C A T
T G A C T T C A A T T G G G A G T A T C C A T C T A G T、A A G C A C C A A C A
C A A A A A G C T T G T T A A T C G G G A C C T G A A G A C T C A A A G C G G A
T C A G A A A T G A A A A A G T T T C T C T C A A C G T T G A C A A T A G A C G
G C G T G A C G C G C T C T G A T C A G G G T C T T T A C A C C T G C G C T G C
C A G C T C T G G G T T G A T G A C G A A A A A A A A T T C T A C A T T T G T G
C G G G T T C A T G A A A A A G A T A A G A C A C A T A C C T G T C C C C C G T 50

G T C C A G C G C C G G A A T T G C T T G G G G G C C C C A G C G T A T T C C T
T T T C C C C C C C A A G C C T A A A G A C A C G C T C A T G A T C T C T A G A
A C G C C G G A G G T C A C C T G T G T G、 G T G G T G G A C G T G T C T C A T
G A A G A T C C C G A G G T T A A A T T C A A T T G G T A C G T A G A T G G A G
T C G A A G T T C A C A A T G C A A A G A C A A A G C C G A G A G A A G A G C A
G T A C A A T A G C A C C T A C C G A G T T G T A A G T G T A C T T A C T G T C
C T G C A C C A A G A T T G G T T G A A T G G A A A A G A G T A T A A G T G T A
A G G T C T C A A A T A A G G C A C T C C C A G C T C C C A T A G A A A A A A C
G A T A T C T A A A G C G A A G G G T C A G C C C A G A G A G C C T C A A G T G
T A C A C G C T C C C T C C C T C A C G G G A T G A G C T G A C A A A A A A C C 10
A G G T T T C A C T G A C T、 T G T T T G G T A A A G G G T T T T T A T C C A T
C T G A C A T C G C T G T C G A G T G G G A A A G C A A T G G T C A A C C G G A
G A A C A A C T A T A A G A C A A C C C C C C C G G T T C T C G A T T C A G A T
G G C T C C T T C T T C C T C T A T T C T A A G C T C A C T G T T G A T A A A T
C T C G G T G G C A A C A A G G G A A T G T T T T C T C T T G C T C T G T T A T
G C A C G A A G C A T T G C A T A A T C A T T A T A C A C A A A A A T C T C T T
T C C C T T A G T C C A G G T A A A T G A
S E Q I D N O : 1 6 の a f l i b e r c e p t の コ ド ン に 最 適 化 さ れ た # 3 (C p
G 計 算 = 0)
A T G G T G T C C T A C T G G G A C A C A G G G G T G C T G C T G T G T G C C C 20
T G C T G T C T T G T C T G C T G C T G A C T G G C T C T A G C T C T G G C T C
T G A C A C A G G C A G A C C C T T T G T G G A A A T G T A C T C T G A G A T C
C C T G A G A T C A T C C A C A T G A C A G A G G G C A G A G A G C T G G T C A
T C C C C T G C A G A G T G A C A A G C C C C A A C A T C A C A G T G、 A C C C
T G A A G A A G T T C C C T C T G G A C A C A C T G A T C C C T G A T G G C A A
G A G A A T C A T C T G G G A C A G C A G A A A G G G C T T C A T C A T C A G C
A A T G C C A C C T A C A A A G A G A T T G G C C T G C T G A C C T G T G A A G
C C A C A G T G A A T G G C C A C C T G T A C A A G A C C A A C T A C C T G A C
A C A C A G A C A G A C C A A C A C C A T C A T T G A T G T G G T G C T G A G C
C C C A G C C A T G G C A T T G A G C T G T C T G T G G G A G A G A A G C T G G 30
T G C T G A A C T G C A C A G C C A G A A C A G A G C T G A A T G T G G G C A T
T G A C T T C A A C T G G G A G T A C C C C A G C A G C、 A A G C A C C A G C A
C A A G A A A C T G G T C A A C A G G G A C C T G A A A A C C C A G A G T G G C
T C T G A G A T G A A G A A A T T C C T G A G C A C C C T G A C C A T T G A T G
G G G T C A C C A G A T C T G A C C A G G G C C T G T A C A C A T G T G C T G C
C A G C T C T G G A C T G A T G A C C A A G A A A A A C A G C A C C T T T G T C
A G A G T G C A T G A G A A G G A C A A G A C C C A C A C C T G T C C T C C A T
G T C C T G C A C C T G A G C T G C T T G G A G G C C C C T C T G T G T T C C T
G T T T C C T C C A A A G C C T A A G G A C A C C C T G A T G A T C A G C A G A
A C A C C T G A A G T G A C C T G T G T G、 G T G G T G G A T G T G T C C C A T 40
G A G G A C C C A G A A G T G A A G T T C A A T T G G T A T G T G G A T G G G G
T T G A A G T G C A C A A T G C C A A G A C C A A G C C T A G A G A G G A A C A
G T A C A A C T C C A C C T A C A G A G T G G T G T C A G T G C T G A C A G T G
C T G C A C C A G G A C T G G C T G A A T G G C A A A G A G T A C A A G T G C A
A G G T G T C C A A C A A G G C C C T G C C T G C T C C T A T T G A G A A A A C
C A T C T C C A A G G C C A A G G G C C A G C C T A G G G A A C C C C A G G T T
T A C A C A C T G C C A C C T A G C A G G G A T G A G C T G A C A A A G A A C C
A G G T G T C C C T G A C C、 T G C C T G G T C A A G G G C T T C T A C C C C T
C T G A C A T T G C T G T G G A A T G G G A G A G C A A T G G C C A G C C T G A
G A A C A A C T A C A A G A C A A C C C C T C C T G T G C T G G A C T C T G A T 50

GGCTCATTTCTTCTGTTACAGGTAACAGCTGACTGTTGGTGGACCAAGAG
GCAGATGGGCAGCAGGGAAATGTGTTCAGCTGCTCTGTGAT
GCATGAGGCCCTGCAACAACCACTACACCCAGAAAAAGCCTG
AGCCTGTCTCTCCTGGGCAAGTGA
SEQ ID NO: 17のafliberceptのコドンに最適化された#4 (Cp
G計算 = 56)

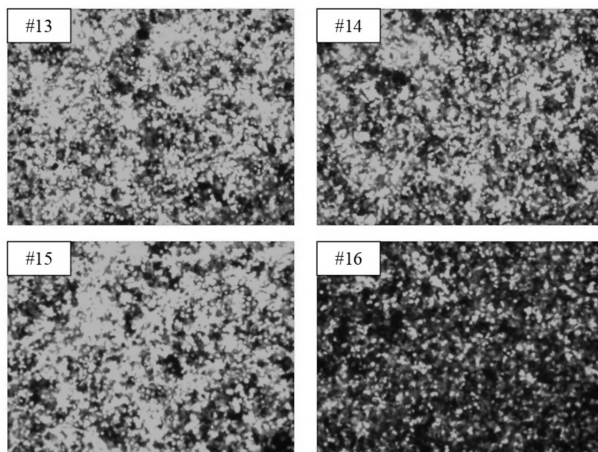
ATGGTTTCTTACTGGGATACCGGCGTGCTGCTGTGTGCCC
TGCTGTCTTGTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
ACGCCACCTACAAAGAGATCGGCCCTGCTGACC、TGTGAAG
CCACCGGTGAATGGCCACCTGTACAAAGACCAAACTACCTGAC
ACACAGACAGACCAACACCCATCATCGACGTGGTGCTGAGC
CCTAGCCACGGCATTTGAACCTGTCTGTGGGCGAGAAAGCTGG
TGCTGAACCTGTACCGCCAGAAACCGAGCTGAACGTGGGGCAT
CGACTTCAAACTGGGAGTACCCCCAGCAGCAAGCACCCAGCAC
AAGAAACTGGGTCAAAACCGGGACCTGAAAAACCCAGAGCGGGCA
GCGAGATGAAGAAATTCCTGAGCACCCCTGACCATCGACGG
CGTGACCAAGGTCTGACCAAGGGCCTG、TACACATGTGCCGC
CAGCTCTGGCCCTGATGACCAAGAAAAAACAGCACCTTTCGTG
CGGGTGCAACGAGAAAGGACAAAGACCCACACCTGTCTCTCAT
GTCCTGTCTCCAGAACTGTCTCGGCGGACCTTCCCGTGTTCCT
GTTTCTCTCCAAGCCCTAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGA
ACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCCACG
AGGATCCCGAAGTGAAAGTTCAAACTGGGTACGTGGACGGCGT
GGAAGTGCAACAACGCCAAGACCAAGCCCTAGAGAGGAAACAG
TACAATAGCACCTACAGA、GTGGTGTCTCCGTGCTGACCGTG
CTGCACCAAGGATTTGGCTGAACGGCAAAAGAGTACAAAGTGCA
AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCTGCTCCTATCGAGAAAAAC
CATCTCCAAGGCCAAGGGGCCAGCCCCAGGGAAACCCCAAGGTT
TACACAACTGCCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAAACC
AGGTGTCCCTGACCTGCCCTGGTCAAGGGGCTTCTTACCCCTTC
CGATATCGCCGTGGAAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCCTGAG
AACAACTACAAAGACAAACCCCTCCTGTGTCTGGACAGCGACG
GCTCATTTCTTC、CTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAAGA
GCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGAT
GCACGAGGCCCTGCAACAACCACTACACCCAGAAAGTCCCTG
AGCCTGTCTCTCCTGGGCAAGTGA
SEQ ID NO: 18のafliberceptのコドンに最適化された#5 (Cp
G計算 = 56)

ATGGTGTCTCTACTGGGATACAGGCGTGCTGCTGTGTGCCC
TGCTGTCTTGTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC
TGATACCGGCAGACCCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATC
CCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGGCAGAGAGCTGGGTCA
TCCCCCTGCAAGAGTGACAAAGCCCCCAACATCACCCGTGACTCT
GAAGAAAGTTCCCTCTGGACACAACTGATCCCCGACGGCAAG
AGAATCATCTGGGGACAGCCGGGAAGGGGCTTTCATCATCAGCA
AGGATGTCCTCTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTC

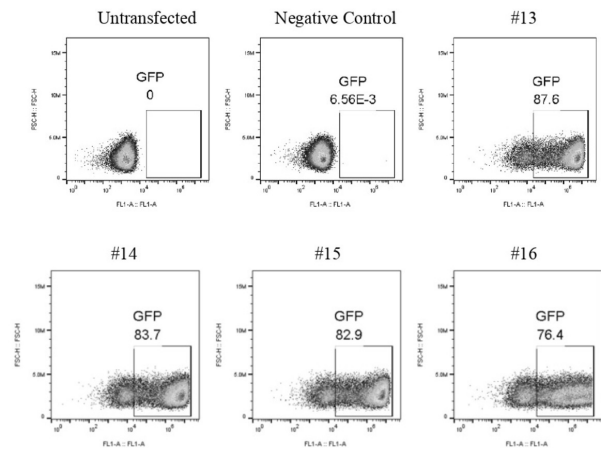
A C G C C A C C T A C A A A G A G A T C G G C C T G C T G A C C 、 T G T G A A G
 C C A C C G T G A A T G G C C A C C T G T A C A A G A C C A A C T A C C T G A C
 A C A C A G A C A G A C C A A C A C C A T C A T C G A C G T G G T G C T G A G C
 C C T A G C C A C G G C A T T G A A C T G T C T G T G G G C G A G A A G C T G G
 T G C T G A A C T G T A C C G C C A G A A C C G A G C T G A A C G T G G G C A T
 C G A C T T C A A C T G G G A G T A C C C C A G C A G C A A G C A C C A G C A C
 A A G A A A C T G G T C A A C C G G G A C C T G A A A A C C C A G A G C G G C A
 G C G A G A T G A A G A A A T T C C T G A G C A C C C T G A C C A T C G A C G G
 C G T G A C C A G A T C T G A C C A G G G C C T G 、 T A C A C A T G T G C C G C
 C A G C T C T G G C C T G A T G A C C A A G A A A A A C A G C A C C T T C G T G 10
 C G G G T G C A C G A G A A G G A C A A G A C C C A C A C C T G T C C T C C A T
 G T C C T G C T C C A G A A C T G C T C G G C G G A C C T T C C G T G T T C C T
 G T T T C C T C C A A A G C C T A A G G A C A C C C T G A T G A T C A G C A G A
 A C C C C T G A A G T G A C C T G C G T G G T G G T G G A T G T G T C C C A C G
 A G G A T C C C G A A G T G A A G T T C A A T T G G T A C G T G G A C G G C G T
 G G A A G T G C A C A A C G C C A A G A C C A A G C C T A G A G A G G A A C A G
 T A C A A T A G C A C C T A C A G A 、 G T G G T G T C C G T G C T G A C C G T G
 C T G C A C C A G G A T T G G C T G A A C G G C A A A G A G T A C A A G T G C A
 A G G T G T C C A A C A A G G C C C T G C C T G C T C C T A T C G A G A A A A C
 C A T C T C C A A G G C C A A G G G C C A G C C T A G G G A A C C C C A G G T T 20
 T A C A C A C T G C C T C C A A G C A G G G A C G A G C T G A C A A A G A A C C
 A G G T G T C C C T G A C C T G C C T G G T C A A G G G C T T C T A C C C T T C
 C G A T A T C G C C G T G G A A T G G G A G A G C A A T G G C C A G C C T G A G
 A A C A A C T A C A A G A C A A C C C C T C C T G T G C T G G A C A G C G A C G
 G C T C A T T C T T C 、 C T G T A C A G C A A G C T G A C A G T G G A C A A G A
 G C A G A T G G C A G C A G G G A A A C G T G T T C A G C T G C A G C G T G A T
 G C A C G A G G C C C T G C A C A A C C A C T A C A C C C A G A A G T C C C T G
 A G C C T G T C T C C T G G C A A G T G A

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



30

40

50

【配列表】
2023540464000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2021/000498
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS,CNTXT,SIPOABS,DWPI,WOTXT,EPTXT,USTXT,CNKI, NCBI, EBI, STN: SEQ ID NO:1-18,INSPIRAR, AAV,capsid protein, adeno-associated virus, AAV rep, codon-optimized nucleic acid,vegfc,pg dinucleotides,VEGF		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108347932 A (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION et al.) 31 July 2018 (2018-07-31) abstract, description paragraphs 96-100	1-2, 10-38, 55-58
Y	CN 108347932 A (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION et al.) 31 July 2018 (2018-07-31) abstract, description paragraphs 96-100	3-9, 41-54
X	CN 105026433 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 04 November 2015 (2015-11-04) abstract, description paragraphs 116-118	39-40
Y	CN 105026433 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 04 November 2015 (2015-11-04) abstract, description paragraphs 116-118	3, 5-38, 41-58
Y	CN 101035899 A (GENEART GMBH) 12 September 2007 (2007-09-12) claim 1	6-38, 42-58
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 December 2021		Date of mailing of the international search report 30 December 2021
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer HUANG,Rui Telephone No. 86-(10)-53961958

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/000498

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUMAR, D. et al. "Cloning vector pRNBZMB, complete sequence, GenBank: MH507507.1" <i>NCBI</i> , 10 April 2019 (2019-04-10), the whole document	4, 9-38, 54-58
X	LEPPANEN, V.M. et al. "Chain L, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, PDB: 2X1W_L" <i>NCBI</i> , 10 October 2012 (2012-10-10), the whole document	39
Y	LEPPANEN, V.M. et al. "Chain L, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, PDB: 2X1W_L" <i>NCBI</i> , 10 October 2012 (2012-10-10), the whole document	3, 9-39, 44-58
A	WO 2019195423 A1 (STRIDE BIO, INC.) 10 October 2019 (2019-10-10) the whole document	1-58
A	WANG, D. et al. "Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery" <i>NAT REV DRUG DISCOV.</i> , Vol. 18, No. 5, 31 May 2019 (2019-05-31), pages 358-378	1-58

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/000498

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/000498

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **55-57**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claim 55-57 relates to a method of treating eye disease and therefore do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). An international search is still carried out on the basis of the composition in the manufacture of a medicament for treating or preventing a disease.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2021/000498

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108347932	A	31 July 2018	EP	3261440	A1	03 January 2018
				SG	11201706755S	A	28 September 2017
				US	2018142259	A1	24 May 2018
				AU	2016219789	B2	25 March 2021
				BR	112017017867	A2	10 April 2018
				KR	20180012734	A	06 February 2018
				CA	2977355	A1	25 August 2016
				WO	2016134375	A1	25 August 2016
				JP	2018506980	A	15 March 2018
				JP	6873907	B2	19 May 2021
				EP	3261440	A4	31 October 2018
				US	10472650	B2	12 November 2019
				AU	2016219789	A1	28 September 2017
CN	105026433	A	04 November 2015	TW	201609803	A	16 March 2016
				WO	2015109898	A1	30 July 2015
				CN	105026433	B	19 October 2018
CN	101035899	A	12 September 2007	DE	102004037611	B4	02 October 2013
				US	2011033429	A1	10 February 2011
				WO	2006013103	A3	01 June 2006
				CN	101035899	B	02 May 2012
				US	8691533	B2	08 April 2014
				WO	2006013103	A2	09 February 2006
				JP	2008507290	A	13 March 2008
				EP	1774008	A2	18 April 2007
				DE	102004037611	A1	16 March 2006
				CA	2575480	A1	09 February 2006
WO	2019195423	A1	10 October 2019	CN	112533644	A	19 March 2021
				BR	112020020341	A2	05 January 2021
				AU	2019247191	A1	15 October 2020
				KR	20210006358	A	18 January 2021
				IL	277667	D0	30 November 2020
				SG	11202009450S	A	29 October 2020
				CA	3094465	A1	10 October 2019
				EA	202092362	A1	11 January 2021
				EP	3773743	A1	17 February 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

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)

C 0 7 K	16/22 (2006.01)	C 0 7 K	16/22	
C 0 7 K	14/015 (2006.01)	C 0 7 K	14/015	
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 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	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
A 6 1 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N

G,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,
 GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,
 MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,
 RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

1 2 5 スイート 2 3 0 3

F ターム (参考) 4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA13 NA14 ZA331
 4C085 AA14 BB11 CC23 DD62 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA17 EA18 MA02 MA04 NA14 ZA33
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 CA40 DA50 DA76 EA20
 FA74